

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL II

FAUR ALIN



# TEZĂ DE DOCTORAT

CONTRIBUȚII LEGATE DE EFECTUL EXTRACTELOR  
DIN PLANTÉ CU POTENȚIAL TERAPEUTIC ASUPRA  
CULTURILOR CELULARE ȘI MEMBRANEI  
CORIOALANTOIDE

– R E Z U M A T –

Conducător Științific  
PROF. UNIV. DR. RAICA MARIUS

Timișoara  
2022

# CUPRINS

Lista lucrărilor științifice publicate .....	V
Lista cu abrevieri și simboluri .....	VI
Lista figurilor .....	VII
Lista tabelelor .....	XI
Dedicatie.....	XII
Mulțumiri .....	XIII
INTRODUCERE.....	XV

## PARTEA GENERALĂ

CAPITOLUL 1. NOȚIUNI CURENTE LEGATE DE BIOLOGIA ȘI EVOLUȚIA BOLILOR MALIGNĂ .....	1
1.1 Introducere.....	1
1.2 Angiogeneza asociată tumorilor maligne.....	6
1.3 Terapia angiogenică actuală .....	10
CAPITOLUL 2. EXTRACTE DIN PLANTE CU EFECTE ANGIOGENICE.....	14
2.1 Introducere .....	14
2.2 Efecte biologice atribuite plantelor medicinale și constituenților activi.....	15
2.3 Angiogeneza și plantele medicinale.....	20
CAPITOLUL 3. MODELE DE TESTARE A COMPUȘILOR CU ROL ANGIOGENIC .....	23
3.1 Introducere .....	23
3.1 Modele de testare a eficienței terapiei în angiogeneza asociată tumorii .....	28

## PARTEA SPECIALĂ

CAPITOLUL 4. EVALUAREA ACTIVITĂȚII BIOLOGICE PRIN METODE <i>IN VITRO</i> , <i>IN OVO</i> ȘI <i>IN VIVO</i> A EXTRACTULUI DE <i>OCIMUM BASILICUM</i> L.....	34
4.1 Introducere .....	34
4.2 Materiale și metode .....	35
4.2.1 Materiale.....	35
4.2.2 Metode .....	36
4.3 Rezultate și discuții.....	41
4.3.1 Compoziția chimică a extractelor de <i>Ocimum basilicum</i> L.....	41
4.3.2 Bioactivitatea extractelor de <i>Ocimum basilicum</i> L. ....	45
4.4 Concluzii .....	62

CAPITOLUL 5. EVALUAREA ACTIVITĂȚII BIOLOGICE PRIN METODE <i>IN VITRO</i> A EXTRACTULUI DE <i>HELLEBORUS PURPURESCENS</i> .....	63
5.1 Introducere .....	63
5.2 Materiale și metode .....	65
5.3 Rezultate și discuții.....	68
5.3.1 Compoziția chimică a extractului de <i>Helleborus purpurescens</i> .....	68
5.3.2 Bioactivitatea extractului de <i>Helleborus purpurescens</i> .....	69
5.4 Concluzii .....	79
CAPITOLUL 6. EFECTUL EXTRACTELOR VEGETALE ASUPRA MEMBRANEI CORIOALANTOIDE (MCA) A OULUI EMBRIONAT .....	80
6.1 Introducere .....	80
6.2 Materiale și metode .....	85
6.3 Rezultate și discuții.....	87
6.4 Concluzii .....	103
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE .....	104
BIBLIOGRAFIA.....	108

## REZUMAT

În prezent, fitoterapia a devenit o știință modernă, o ramură a științelor medicale. Acest lucru a fost posibil numai pe măsura dezvoltării altor științe, cum ar fi: histologia, histopatologia, farmacologia celulară, biochimia și altele.

Fără a subestima rolul chimioterapiei (tratamentul bolilor cu ajutorul medicamentelor de sinteză), fitoterapia în special, și terapia naturală, în general, vin să completeze ansamblul de metode preventive și curative practicate în prezent. Dar nu numai să le completeze, deoarece numeroase substanțe active din plante, cele cu acțiune puternică, sunt considerate tratamente de bază și nu doar adjuvante, în terapia modernă. Se consideră că multe dintre medicamentele de sinteză sunt nocive, fie prin efectele secundare nedorite de cauză toxică, de multe ori imprevizibile, fie prin natura alergică, pentru că substanțele de sinteză se comportă ca un corp străin introdus în organism, în timp ce plantele medicinale și substanțele de biosinteză sunt apreciate ca inofensive, pe care organismul le recunoaște drept „prieteni”.

Utilizarea diferitelor plante în medicină nu este nouă, nu este o surpriză, ci o necesitate. Extractele din plante nu sunt utile doar ca remedii, ci și ca modele pentru producerea de medicamente sau substanțe biologic active. Utilizarea fitoterapiei cuprinde un spectru larg de afecțiuni umane, pentru multe dintre ele fiind cunoscute mecanismele de acțiune, precum și efectele asupra simptomelor. Mai puțin cunoscut este impactul morfologic și molecular al acestor substanțe. Datele referitoare la efectul extractelor din plante asupra vaselor sanguine preexistente sau de neoformație sunt rare, insuficient demonstrate sau, în unele cazuri, lipsesc.

Domeniul fitoterapiei este unul de mare interes în perioada actuală, iar scopul politicilor sociale și de sănătate europene, dar și naționale este îmbunătățirea calității vieții inclusiv prin asigurarea calității superioare a produselor farmaceutice și parafarmaceutice. În viitor, competitivitatea industriei europene de produse parafarmaceutice care conțin compuși vegetali va depinde de studiul *in vitro* și ulterior *in vivo* al unor noi extracte vegetale cu efect multițintit (de exemplu asupra angiogenezei), care pot fi ulterior încorporate în diferite produse terapeutice.

Scopul principal al acestei lucrări constă în evaluarea activității biologice și a profilului de siguranță a anumitor tipuri de produse vegetale medicinale (busuioc, cimbru, spânz, tuia, vâsc), influența acestora în angiogeneză prin promovarea eficacității și a siguranței. Motivația alegerii acestor substanțe rezidă din faptul că toate sunt utilizate într-o formă sau alta în fitoterapie, dar mecanismele de acțiune și efectele la nivel tisular sunt insuficient studiate sau necunoscute. Prin urmare, menținând proprietăți asemănătoare substanțelor active de sinteză pentru extractele vegetale supuse studiului, s-au evaluat mecanismele de acțiune și profilurile de siguranță, și de asemenea s-a încercat evidențierea eficacității acestor produse. S-au utilizat produse vegetale care îndeplinesc standardele actuale de calitate, siguranță și eficacitate, și s-a analizat eficiența lor în studiile *in vitro* (asupra culturilor celulare sănătoase și tumorale), *in ovo* (asupra angiogenezei, pe ou embrionat), și unde a fost cazul, *in vivo* (asupra pielii voluntarilor sănătoși). Cercetarea de față este inovativă deoarece în cadrul acesteia se realizează pentru prima dată evaluarea *in ovo*, pe ou embrionat, a unor macerate ale produselor vegetale cu efect asupra angiogenezei.

**Partea generală**, însumează trei capitole principale. În primul capitol se tratează biologia și evoluția bolilor maligne – angiogeneza asociată tumorilor maligne și aspecte legate de terapia angiogenică actuală; în cel de-al doilea capitol sunt prezentate aspecte corelate extractelor din plante cu efecte angiogenice – efectele biologice atribuite plantelor medicinale și constituenților activi precum și angiogeneza și plantele medicinale; iar în ultimul capitol sunt discutate modele de testare a compușilor cu rol angiogenic.

**Partea specială** cuprinde trei direcții principale. Prima direcție este legată de evaluarea activității potențiale a două extracte hidroalcoolice, obținute din planta *Ocimum basilicum* L. Au fost realizate studii experimentale care s-au axat asupra: (a) caracterizării extractelor pentru stabilirea compoziției chimice (în ceea ce privește conținutul total de compuși fenolici, conținutul total de flavonoizi și flavonoli și respectiv, taninuri condensate, conținutul în polifenoli predominanți), (b) analizei activității antioxidante (prin prisma efectului de captare a radicalilor liberi), (c) impactului corelat viabilității celulare (potențialul citotoxic pe patru linii celulare normale umane și murine și pe o linie celulară tumorală - melanom uman), (d) potențialului antiangiogenic *in ovo* (studiul pe membrană corioalantoidă de ou embrionat) și (e) efectului asupra pielii sănătoase

(măsurarea neinvazivă *in vivo* a parametrilor biofizici ai pielii. Ce ade-a doua direcție de cercetare a fost reprezentată de evaluarea activității biologice prin metode *in vitro* a extractului de *Helleborus purpureus* care redă: (a) evaluarea compoziției chimice a extractului hidroalcoolic de *H. purpureus*, (b) determinarea activității antioxidante, (c) evaluarea efectului citotoxic pe patru linii de celule tumorale (carcinom scuamos, melanom murin și două linii pentru cancerul de sân) și pe două linii celulare sănătoase (keratinocite umane și celule epidermice murine) și (d) analiza expresiei genelor apoptotice. Ultima direcție de cercetare a presupus analiza efectului extractelor vegetale standardizate asupra membranei corioalantoide (MCA) a oului embrionat. S-a pus la punct un experiment *in ovo* în care s-a evaluat potențialul angiogen a cinci tipuri de plante medicinale diferite (*Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Helleborus purpureus*, *Thuja Occidentalis* și *Viscum album*), în vederea stabilirii caracterului toxic sau netoxic. S-a avut în vedere pe de o parte potențiala eficiență a probelor (macerate preparate în cadrul unei companii de profil – Laboratoarele Favisan), și pe de altă parte, s-au urmărit efectele nocive pe care le pot induce asupra membranei corioalantoide și a embrionului.

În cadrul primului studiu, care a presupus evaluarea activității biologice potențiale a două extracte hidroalcoolice obținute din partea aeriană (fără frunze) și din frunze de *Ocimum basilicum* L. s-au desfășurat experimente *in vitro*, *in ovo* și *in vivo* care s-au completat unele pe altele. Extractele hidroalcoolice au fost investigate prin cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă, evaluate spectrofotometric din punct de vedere al compoziției chimice pentru conținutul total de compuși fenolici, conținutul total de flavonoizi și flavonoli și respectiv taninuri condensate. Ambele extracte hidroalcoolice s-au dovedit a fi bogate în compuși polifenolici, dintre care predomină kaempferolul și quercetina. Rezultatele obținute pe celule sănătoase au fost comparate cu activitatea antitumorală *in vitro* împotriva liniei celulare tumorale A375. În plus, a fost investigat și potențialul antiangiogenic *in ovo*, indus de extractele hidroalcoolice de busuioc. Pentru studiul *in vivo* au fost selectate femei voluntare cu piele normală sănătoasă, iar evaluarea s-a făcut prin măsurarea neinvazivă *in vivo* a parametrilor biofizici ai pielii. Extractul hidroalcoolic de *Ocimum basilicum* L. obținut din frunze a indus o activitate antioxidantă semnificativă, rezultatele fiind apropiate de valoarea acidului ascorbic, folosit ca referință standard. Rezultatele

studiului curent coroborează utilizarea tradițională a *Ocimum basilicum* L. ca antioxidant și sugerează că efectul antioxidant ridicat se datorează cantității mari de compuși polifenolici. Potențiala citotoxicitate a extractelor hidroalcoolice de busuioc a fost evaluată prin metoda MTT consacrată, urmărindu-se viabilitatea celulară, în prezența extractelor, a diferite tipuri de celule sănătoase și tumorale - keratinocitele umane imortalizate (HaCaT), fibroblastele umane de piele (1BR3), epiderma de șoareci (JB6Cl41-5a), melanocitele umane primare (HEMa), celulele de melanom uman A375. Evaluările *in vitro* au arătat că extractul de *Ocimum basilicum* este o sursă de compuși activi netoxici asupra celulelor legate de piele și poate acționa ca un posibil agent de protecție împotriva melanomului. Extractele nu au indus un efect citotoxic semnificativ asupra niciunei linii celulare normale selectate, dar au arătat activitate relevantă asupra celulelor A375. Studiul profilului toxicologic a continuat prin evaluarea activității extractelor asupra membranei corioalantoide. Având în vedere valorile scăzute obținute în ceea ce privește efectele iritative în membrana corionalantoidă a oului pe vasele de sânge, putem sublinia că ambele extracte pot fi considerate ingrediente biocompatibile. Ambele extracte hidroalcoolice de busuioc prezintă o bună biocompatibilitate și toleranță asupra plexului vascular în curs de dezvoltare, așa cum este indicat de testul HET-CAM. Extractele hidroalcoolice aplicate în gama de concentrații testate par a fi ingrediente benefice optime pentru vindecarea rănilor și medicina regenerativă și pot fi incluse chiar și în formulările nutraceutice dacă extractele din plante sunt caracterizate din punct de vedere al compușilor activi și al profilului biologic. În ceea ce privește activitatea potențială a extractelor hidroalcoolice asupra pielii umane s-au evaluat prin metode neinvazive parametrii biofizici ai pielii. Scăderea valorilor eritemului după aplicarea extractelor indică potențialul antiinflamator al *Ocimum basilicum* L. Rezultatele obținute din evaluările *in vivo* și ale parametrilor biofizici ai pielii au indicat că *Ocimum basilicum* L. prezintă activitate antiinflamatoare și proprietăți promițătoare de vindecare a rănilor.

Apoptoza reprezintă moartea celulară programată care în condiții fiziologice contribuie la menținerea homeostaziei și la eliminarea celulelor nedorite. În ceea ce privește cancerul, apoptoza joacă un rol important în prevenirea formării tumorilor. Pierzând controlul apoptotic, celulele canceroase devin mai rezistente la tratament și, prin urmare, supraviețuiesc mai mult,

devenind mai invazive și mai agresive. *H. purpurascens*, o plantă medicinală cu efecte terapeutice utilizată în medicina tradițională încă din cele mai vechi timpuri. În cadrul celui de-al doilea studiu s-a avut în vedere evaluarea compoziției unui extract hidroalcoolic de *Helleborus purpurascens* (HPex) în ceea ce privește compoziția polifenolilor, a fost determinată activitatea antioxidantă, a fost evaluat efectul citotoxic potențial pe patru linii de celule canceroase diferite (carcinom scuamos-A431; melanom murin - B164A5; și cancer de sân - MCF-7 și MDA-MB-231) comparativ cu efectul asupra două linii celulare sănătoase (linii celulare de keratinocite umane - HaCaT și celule epidermice murine - JB6) și a fost determinată expresia principalelor gene implicate în procesul de apoptoză, oferind astfel o posibilă explicație pentru efectul citotoxic al extractului de *H. purpurascens*. Analiza LC-MS a arătat că, extractul conține niveluri ridicate de flavonoide, în special quercetină, kaempferol și epicatechină. În primul rând, extractul hidroalcoolic a exercitat un puternic efect antioxidant, apropiat de cel al acidului ascorbic. În continuare, pornind de la rolul benefic jucat de antioxidanți în terapia antitumorală, extractul hidroalcoolic și-a dovedit efectele citotoxice selective în cele patru linii de celule tumorale utilizate, proliferarea celulelor sănătoase nefiind afectată de stimularea cu extract de *H. purpurascens*. În cele din urmă, influența HPex asupra creșterii expresiei genelor pro-apoptotice (Bad și Bax) și scăderii expresiei genelor anti-apoptotice (Bcl-2) a fost evidențiată în linia celulară a cancerului de sân - MCF-7. Extractul are o valoare terapeutică importantă pentru viitorul terapiei oncologice, dar, cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pentru a elucida mecanismul de acțiune și a identifica fitoconstituenții cheie care explică aceste efecte biologice.

Metoda de studiu a efectului diferitelor substanțe sau celule pe membrana corioalantoidă are o serie de avantaje. Marea majoritate a modelelor animale de studiu a țesuturilor și celulelor implică utilizarea de animale cu imunosupresie pentru a putea realiza transplante heterotopice viabile. Pe de altă parte, aceste modele sunt dificil de abordat mai ales atunci când se utilizează celule umane, datorită compatibilității limitate inter-specie. Membrana corioalantoidă este în mod natural imunodeficientă, astfel încât implantarea de celule, țesuturi sau tumori de la diferite specii este ușor acceptată, fără a genera răspuns imun. MCA este un mediu propice pentru creșterea celulară normală sau/și tumorală, fiind foarte bine vascularizată. Conexiunile vasculare strânse cu embrionul fac ca



experimentele să se refere la întregul ansamblu de structuri. Toate modificările induse de implantare pot fi observate cu ochiul liber, sau și mai bine, și preferabil cu stereomicroscopul special construit în acest scop, care permite chiar localizarea și evoluția celulelor implantate. În plus, rata de supraviețuire a celulelor implantate este mult mai mare pe MCA decât pe model murin, fără leziuni semnificative. Pentru aceste avantaje, la care se adaugă și prețul de cost redus și repetabilitatea practic indefinită, s-a luat în considerare această metodă pentru studiul de față.

La fel ca oricare altă metodă de studiu din medicină și biologie, metoda MCA are și anumite limite. Experimentul poate prezenta (mai rar) suprainfecții nespecifice, dar care apar rareori atunci când implantul se realizează timpuriu după incubare. Din acest motiv, în experimentele de față, s-a ales ziua a cincea pentru implantarea pe suprafața MCA a substanței de testat. Aceasta pentru că timpuriu la oul de găină embrionat, sistemul imun este imatur și nu se dezvoltă reacția gazdă contra grefă, indiferent de tipul substanței implantate. Durata propriu zisă a experimentului este relativ scurtă, de aproximativ 7-10 zile, deci este puțin probabil ca tumora implantată pe MCA să producă diseminare la distanță înainte de terminare experimentului. Există disponibil un lot relativ redus de markeri moleculari specifici pentru țesuturile aviare așa încât uneori este dificilă caracterizarea procesului de dezvoltare a celulelor sau substanțelor implantate. Practic, pe sau în MCA poate fi implantată orice substanță, celulă sau țesut în prima săptămână de evoluție naturală. S-au folosit aceste particularități pentru cercetarea de față, avînd în vedere acuratețea metodei, repetabilitatea și aplicarea secvențială a unor experimente cu durată scurtă. Această metodă a fost aplicată extensiv pentru studiul angiogenezei în condiții normale și patologice, așa cum s-a menționat mai sus. Sunt foarte puține articole referitoare la efectul unor substanțe extrase din plante cu aparentă utilitate în terapia medicală neconvențională.

Pornind de la rezultatele obținute în studiile prin metodele biochimice, farmacologice și de toxicitate, s-a pus la punct un experiment *in ovo* bazat pe aplicarea a cinci tipuri de preparate din plante medicinale diferite (*Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Helleborus purpureus*, *Thuja Occidentalis* și *Viscum album*) utilizate în studiul prezent, în vederea stabilirii caracterului toxic sau netoxic al acestor substanțe într-un experiment *in vivo*. S-a avut în vedere pe

de o parte potențiala eficiență a cinci tipuri de probe (macerate preparate în cadrul unei companii de profil – Laboratoarele Favisan) și pe de altă parte, s-au urmărit efectele nocive pe care le pot induce asupra membranei corioalantoide și a embrionului. Studiul comportamentului membranei corioalantoide pe care au fost plasate extracte standardizate de busuioc, spânz, vâsc, cimbru și tuia permit tragerea următoarelor concluzii: (a) supraviețuirea specimenelor supuse experimentului este strict dependentă de substanța utilizată pentru stimulare; (b) cel mai puternic efect toxic a fost remarcat pentru extractul de spânz; (c) cel mai puțin toxic pentru membrana corioalantoidă a fost extractul de busuioc, urmat de speciemenele tratate cu extract de cimbru; (d) metoda de studiu care utilizează membrana corioalantoidă s-a demonstrat a fi un indicator fidel al toxicității extractelor cu care s-a realizat stimularea; (e) considerăm că această metodă poate fi utilizată ca etapă preliminară pentru testarea activității potențial toxice a unui mare număr de substanțe cu efecte posibil terapeutice.

**Studiile viitoare** care ar trebui conduse se referă la aprofundarea mecanismelor de acțiune a plantelor prezentate în studiul de față alături de găsirea unor formulări optime care să dea dovadă de eficacitate crescută, cu păstrarea efectelor biologice și fără exercitarea de efecte toxice. Un potențial experiment pe modele *in vitro* și *in vivo* care să studieze efectul extractelor de plante pe implantul de celule tumorale, ar putea fi o continuare interesantă a acestui studiu. Această metodologie ar putea constitui bazele experimentale pentru introducerea unor mari varietăți de substanțe cu efect antitumoral în practica medicală oncologică.