

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY FROM
TIMISOARA
FACULTY OF PHARMACY
ACADEMIC DEPARTMENT OF
PHARMACOGNOSY-PHYTOTHERAPY
Department II**

BUDA V. VALENTINA-OANA



PHD THESIS

**EVALUATION AND QUANTIFICATION OF THE EFFECTS AND
MECHANISMS OF ACTION ON THE VASCULAR ENDOTHELIUM
OF SEVERAL STANDARDIZED EXTRACTS OBTAINED FROM
ARONIA MELANOCARPA (MICHX.) ELLIOTT**

A B S T R A C T

Scientific Coordinator:

Prof. Dr. CORINA DANCIU

Timișoara

2025

ABSTRACT

Cardiovascular disease (CVD), particularly arterial hypertension, is the leading global cause of death, with a significant impact in Romania. Its prevalence is increasing due to aging populations, socioeconomic factors, and rising obesity rates, exacerbated by unhealthy lifestyles and diets. Endothelial dysfunction contributes to hypertension and is often associated with risk factors like sedentary behavior, smoking, and type 2 diabetes, heightening the risk of complications and mortality. Current hypertension treatments involve dual or triple drug therapies, but managing co-morbidities can complicate care and increase healthcare costs. While new medications have emerged, concerns about side effects limit their use, emphasizing the need to address modifiable risk factors for CVD prevention. Phytotherapy is gaining attention for its potential as a safer, cost-effective treatment, particularly through plant-based diets rich in fruits and vegetables, known for their anti-inflammatory and antioxidant properties. Berries, especially *Aronia melanocarpa* (black chokeberry), are highlighted for their health benefits, including antioxidant, anti-inflammatory, and lipid-lowering effects, making them promising for CVD and metabolic disorder prevention. With Romania's low life expectancy and high CVD mortality rates linked to poor dietary habits and lifestyle choices, comprehensive therapeutic strategies targeting hypertension and associated risk factors are essential for improving cardiovascular and metabolic health in the population.

The doctoral research titled "Evaluation and Quantification of the Effects and Mechanisms of Action on the Vascular Endothelium of Several Standardized Extracts Obtained from *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott" aims to thoroughly characterize and assess the efficacy and safety of various black chokeberry extracts and juice sourced from a certified organic plantation in Western Romania. This study seeks to explore the cardio-metabolic benefits of these extracts through in vitro and in vivo research, focusing on endothelial function. The endothelium is crucial for maintaining vascular health, regulating blood flow, and managing inflammation, making this research significant for improving cardiovascular health in Romanian patients.

This doctoral thesis is divided into two main sections: the general part and the special part. The general section includes two chapters, with the first providing an overview of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott as a medicinal plant, and the second addressing 21st-century

challenges related to cardio-metabolic dysregulations. The special section presents original research with four studies.

The first study focuses on the phytochemical characterization of three types of BCK extracts from dried and frozen berries and evaporated juice, examining total phenolic content and heavy metal presence. The antiproliferative and pro-apoptotic effects were assessed using the Human Pulmonary Artery Endothelial Cells (HPAEC) cell line. Results showed significant variations in the chemical composition based on processing methods. The frozen berry extract (FrozAr) had the highest total phenolic content, rich in anthocyanins and flavonols, while the dried berry extract (DryAr) followed closely. The evaporated juice extract (EvArJ) had the lowest total phenolic concentration but retained beneficial compounds. Inorganic element analysis detected metals like aluminum, cadmium, chromium, copper, iron, manganese, and zinc. MTT assays indicated antiproliferative effects on HPAECs, with cell cycle analysis revealing changes in the G2/M phase. The DryAr extract showed a slight reduction in G0-G1 phase cells and a minor increase in necrotic cells. The study's novelty lies in assessing BCK extracts' effects on the HPAEC line and comparing the three extract types, enhancing understanding of their safety profile.

The second study examines the *in vitro* vaso-protective effects of two extracts from dried and frozen BCK berries using an animal model. It focuses on their antioxidant properties and catalase-like scavenging effects on isolated aortic rings from mice subjected to conditions simulating neurohormonal changes in cardio-metabolic diseases, induced by angiotensin 2, lipopolysaccharide, and glucose. Both extracts reduced levels of H₂O₂ and superoxide in a concentration-dependent manner, starting at 50 µg/mL or 100 µg/mL. At higher concentrations (100 µg/mL, 150 µg/mL, and 500 µg/mL), they showed significant scavenging effects on H₂O₂, comparable to catalase. Additionally, at 100 µg/mL, both extracts significantly improved vascular relaxation in all stimulated aortic rings. In summary, the BCK extracts demonstrated antioxidant and vascular protective effects on isolated murine aortas by reducing hydrogen peroxide and superoxide levels and enhancing endothelial-dependent relaxation under conditions mimicking the activation of the renin-angiotensin system, inflammation, and hyperglycemia.

The third study was a clinical trial evaluating the effects of BCK juice on blood pressure, endothelial function, and metabolic status in prehypertensive and grade I hypertensive subjects with low cardiovascular risk who had not received antihypertensive treatment. It included 100 participants, with 70 in the BCK group and 30 in the control group. Assessments

were made at baseline and after three months of consuming 100 mL/day of BCK juice, alongside lifestyle modifications. Blood pressure levels decreased from 143.33/92.24 mmHg to 132.20/78.90 mmHg ($p < 0.01$) in the BCK group, while the control group exhibited levels of 113.20/78.90 mmHg. Significant changes were observed in biomarkers of endothelial dysfunction: ADMA levels decreased from 101.814 ± 16.067 mcg/L to 87.857 ± 14.479 mcg/L ($p < 0.001$), and PTX3 levels increased from 0.791 ± 1.117 ng/mL to 0.974 ± 1.083 ng/mL ($p < 0.001$). Various metabolic parameters, including glucose, uric acid, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, and blood urea nitrogen, also significantly decreased ($p < 0.05$) after treatment. The study concluded that BCK juice, combined with lifestyle education, effectively lowered blood pressure and improved endothelial function, enhancing overall cardio-metabolic health. The novelty lies in its evaluation of BCK juice's effects on ADMA and PTX3 levels, indicators of endothelial dysregulation.

The final study investigates advancements in nanoformulations and drug delivery systems by encapsulating two BCK extracts from dried and frozen berries within MCM-41-type mesoporous silica to enhance the bioavailability and targeted delivery of total phenolic content. The study assessed the pharmacological activity of these novel formulations compared to free extracts, focusing on their antiradical and antioxidant activities, antimicrobial potential, and their effects on the A375 human melanoma cell line versus normal HaCaT human keratinocytes. Chromatographic analysis revealed high levels of polyphenols and flavonoids, along with significant radical scavenging activity. Both the free BCK extract and the encapsulated extract showed notable antioxidant capacity. Antibacterial activity was observed only against Gram-positive bacteria, with the extract loaded onto ZnO-modified MCM-41 silica displaying a stronger effect, likely due to the synergistic action of ZnO nanoparticles. Cell viability tests indicated a dose- and time-dependent effect on the melanoma cell line, with good cytocompatibility at doses up to 100 μ g/mL. Loading the BCK extract into mesoporous silica matrices enhanced its antiproliferative and antimigratory potential while maintaining low selectivity against non-tumor cells. The study concludes that mesoporous silica matrices are effective carriers for BCK extract, improving its antioxidant, antibacterial, and antitumor properties. This preliminary research opens new strategies for optimizing these novel formulations.

This thesis employs contemporary scientific techniques to rigorously investigate BCK extracts and juice. It offers a comprehensive pharmacological assessment through a range of studies, including pre-clinical evaluations with cell lines and animal models, as well as a

clinical trial. The research also explores innovative strategies to enhance the biological activity of polyphenols via nanoformulations and drug delivery systems. By integrating these methodologies, the thesis provides a thorough evaluation of the effects and mechanisms of action of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott extracts. This multifaceted approach clarifies the pharmacological properties and mechanisms involved, contributing to the understanding of their potential in promoting cardiovascular and metabolic health. The findings highlight BCK extracts as a promising natural intervention and emphasize the need for further exploration of their applications in clinical practice and public health.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
CATEDRA UNIVERSITARĂ DE FARMACOGNOZIE-FITOTERAPIE
Departamentul II

BUDA V. VALENTINA-OANA



TEZĂ DE DOCTORAT

EVALUAREA ȘI CUANTIFICAREA EFECTELOR ȘI MECANISMELOR DE
ACȚIUNE LA NIVELUL ENDOTELIULUI VASCULAR AL UNOR EXTRACTE
STANDARDIZATE OBȚINUTE DE LA SPECIA *ARONIA MELANOCARPA*
(MICHX.) ELLIOTT

REZUMAT

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. CORINA DANCIU

Timișoara

2025

REZUMAT

Bolile cardiovasculare (BCV), în special hipertensiunea arterială, reprezintă principala cauză de deces la nivel global, având un impact semnificativ în România. Prevalența acestora este în continuă creștere ca urmare a îmbătrânirii populației, factorilor socioeconomiici și a ratei crescute a obezității, agravate de stiluri de viață și diete nesănătoase. Disfuncția endotelială joacă un rol esențial în dezvoltarea hipertensiunii arteriale și este adesea asociată cu factori de risc, cum ar fi comportamentul sedentar, fumatul și diabetul de tip 2, sporind riscul de complicații și mortalitate. Tratamentele curente pentru hipertensiune implică adesea administrarea concomitentă a mai multor substanțe antihipertensive, însă gestionarea comorbidităților poate complica schemele de tratament și poate conduce la creșterea costurilor asociate îngrijirii medicale. Deși au apărut medicamente noi, îngrijorările legate de efectele secundare limitează utilizarea acestora, subliniind necesitatea abordării factorilor de risc modificabili pentru prevenirea BCV. Fitoterapia câștigă atenție datorită potențialului său ca tratament mai sigur și mai rentabil, în special prin diete bazate pe plante, bogate în fructe și legume, cunoscute pentru proprietățile lor antiinflamatorii și antioxidante. Fructele de pădure, în special *Aronia melanocarpa* (aronia neagră/scorușul negru), sunt recunoscute pentru multiplele lor beneficii asupra sănătății, inclusiv efecte antioxidante, antiinflamatorii și hipolipemiante, ceea ce le recomandă ca fiind o opțiune promițătoare pentru prevenirea BCV și a tulburărilor metabolice. Cu o speranță de viață scăzută în România și rate ridicate ale mortalității din cauza BCV strâns legate de obiceiuri alimentare nesănătoase și alegeri de stil de viață sedentar, strategii terapeutice multi-target care vizează hipertensiunea și factorii de risc asociați sunt esențiale pentru îmbunătățirea sănătății cardiovasculare și metabolice a populației.

Prezenta teză de doctorat intitulată „Evaluarea și cuantificarea efectelor și mecanismelor de acțiune asupra endotelului vascular a mai multor extracte standardizate obținute din *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott” își propune să caracterizeze și să evalueze în mod temeinic eficacitatea și siguranța diferitelor extracte și sucuri de scoruș negru provenite dintr-o plantație organică certificată din vestul României. Acest studiu urmărește să exploreze beneficiile cardio-metabolice ale acestor extracte prin cercetări *in vitro* și *in vivo*, concentrându-se pe funcția endotelială. Endoteliul vascular este crucial pentru menținerea sănătății aparatului

cardiovascular, reglând fluxul sanguin și gestionând inflamația, făcând această cercetare semnificativă pentru îmbunătățirea sănătății aparatului cardiovascular la pacienții români.

Această teză de doctorat este împărțită în două secțiuni principale: partea generală și partea specială. Partea generală include două capitole, primul oferind o prezentare generală asupra scorușului negru, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, ca plantă medicinală, iar al doilea abordând provocările secolului XXI legate de dereglările/disfuncțiile cardio-metabolice. Partea specială prezintă cercetări originale, mai exact patru studii distincte, care constau în evaluări biologice ale diverselor extracte sau suc de scoruș negru (BCK).

Primul studiu se concentrează pe caracterizarea fitochimică a trei tipuri de extracte BCK, obținute din fructe uscate și congelate și suc evaporat, examinând conținutul total de fenoli și prezența/abiența metalelor grele. Efectele antiproliferative și pro-apoptotice au fost evaluate utilizând linia celulară a celulelor endoteliale a arterei pulmonare umane (HPAEC). Rezultatele au arătat variații semnificative în compoziția chimică în funcție de metodele de procesare. Extractul de fructe congelate (FrozAr) a avut cel mai mare conținut total de fenoli, bogat în antociani și flavonoide, în timp ce extractul de fructe uscate (DryAr) a fost aproape la fel de bogat. Extractul de suc evaporat (EvArJ) a avut cea mai mică concentrație totală de fenoli, dar a păstrat compușii benefici. Analiza elementelor anorganice a detectat metale precum aluminiul, cadmiul, cromul, cuprul, fierul, manganul și zincul. Testele MTT au indicat efecte antiproliferative asupra liniei celulare analizate (HPAEC), analiza ciclului celular arătând modificări în faza G2/M. Extractul DryAr a arătat o ușoară reducere a celulelor din faza G0-G1 și o creștere minoră a procentului de celule necrotice. Noutatea studiului constă în evaluarea efectelor extractelor BCK asupra liniei HPAEC și compararea celor trei tipuri de extracte, sporind astfel înțelegerea profilului de siguranță a extractelor examinate.

Al doilea studiu evaluează efectele vaso-protectoare *in vitro* a două extracte BCK din fructe uscate și congelate utilizând un model animal. Studiul se concentrează pe evaluarea proprietăților lor antioxidante și efectele lor de "captare" asemănătoare catalazei asupra inelelor aortice izolate de la șoareci, care au fost în prealabil supuși la condiții care simulează modificări neurohormonale în bolile cardio-metabolice (induse cu ajutorul angiotensinei 2, lipopolizaharidă și glucoză). Ambele extracte au redus nivelurile de H₂O₂ și superoxizi într-o manieră dependentă de concentrație, începând de la 50 μg/mL sau 100 μg/mL. La concentrații mai mari (100 μg/mL, 150 μg/mL și 500 μg/mL), au arătat efecte semnificative de neutralizare a H₂O₂, comparabile cu cele ale catalazei. În plus, la 100 μg/mL, ambele extracte au îmbunătățit semnificativ relaxarea vasculară la toate inelele aortice stimulate. În concluzie,

extractele BCK au demonstrat efecte antioxidante și vaso-protectoare asupra aortelor murine izolate prin reducerea nivelurilor de peroxid de hidrogen și superoxid și îmbunătățind relaxarea dependentă de endoteliu în condiții care mimau activarea sistemului renină-angiotensină, inflamația și hiperglicemia.

Al treilea studiu a constatat într-un studiu clinic care a evaluat efectele sucului BCK asupra tensiunii arteriale, funcției endoteliale și stării metabolice la subiecți prehipertensivi și hipertensivi de grad I cu risc cardiovascular scăzut care nu primiseră anterior tratament antihipertensiv. Au fost incluși 100 de participanți, 70 în grupul BCK și 30 în grupul de control. Evaluările au fost efectuate la început și după trei luni de consum de 100 mL/zi de suc BCK, asociat modificărilor deschimbare ale stilului de viață. Nivelurile tensiunii arteriale au scăzut de la 143.33/92.24 mmHg la 132.20/78.90 mmHg ($p < 0.01$) în grupul BCK, în timp ce grupul de control a rămas la 113.20/78.90 mmHg. S-au observat schimbări semnificative în biomarkerii disfuncției endoteliale: nivelurile de ADMA au scăzut de la 101.814 ± 16.067 mcg/L la 87.857 ± 14.479 mcg/L ($p < 0.001$), iar nivelurile de PTX3 au crescut de la 0.791 ± 1.117 ng/mL la 0.974 ± 1.083 ng/mL ($p < 0.001$). Diferiți parametrii metabolici, inclusiv glucoza, acidul uric, colesterolul total, colesterolul LDL, trigliceridele și azotul ureic din sânge, au scăzut de asemenea semnificativ ($p < 0.05$) după tratament. Studiul a concluzionat că sucul BCK, asociat cu educația pentru un stil de viață sănătos, a redus eficient tensiunea arterială și a îmbunătățit funcția endotelială, sporind sănătatea cardio-metabolică generală. Noutatea constă în evaluarea efectelor sucului BCK asupra nivelurilor de ADMA și PTX3, indicatori ai dereglărilor endoteliale.

Studiul final investighează progresele în nanoformulări și sisteme de livrare a medicamentelor prin encapsularea a două extracte BCK (obținute din fructe uscate și congelate) în silice mesoporoasă de tip MCM-41 pentru a îmbunătăți bio-disponibilitatea și livrarea targetată a conținutului total de polifenoli. Studiul a evaluat activitatea farmacologică a acestor formulări noi în comparație cu extractele libere, concentrându-se pe activitățile lor antiradicali liberi și antioxidante, potențialul antimicrobian și efectele lor asupra liniei celulare A375 de melanom uman în comparație cu keratinocitele umane normale HaCaT. Analiza cromatografică a arătat niveluri ridicate de polifenoli și flavonoide, împreună cu o activitate semnificativă de neutralizare a radicalilor liberi. Atât extractul BCK liber, cât și extractul encapsulat au arătat o capacitate antioxidantă notabilă. Activitatea antibacteriană a fost observată doar împotriva bacteriilor Gram-pozitive, extractul încărcat pe silice MCM-41 modificată cu ZnO având un efect mai puternic, probabil datorită acțiunii sinergice a

nanoparticulelor ZnO. Testele de viabilitate celulară au indicat un efect dependent de doză și timp asupra liniei celulare de melanom, având o bună citocompatibilitate la doze de până la 100 µg/mL. Încărcarea extractului BCK în matricele de silice mesoporoase a îmbunătățit potențialul său antiproliferativ și antimigrator, menținând în același timp o selectivitate scăzută împotriva celulelor non-tumorale. Studiul concluzionează că matricele de silice mesoporoase pot fi transportatori eficienți pentru extractul BCK, îmbunătățind proprietățile sale antioxidante, antibacteriene și antitumorale. Această cercetare preliminară deschide noi strategii pentru optimizarea acestor formulări inovatoare.

Această teză utilizează tehnici științifice contemporane pentru a investiga în mod riguros extractele și sucul BCK. Oferă o evaluare farmacologică cuprinzătoare printr-o serie de studii, inclusiv evaluări preclinice pe linii celulare și modele animale, precum și un studiu clinic. Cercetarea explorează, de asemenea, strategii inovatoare pentru a îmbunătăți activitatea biologică a polifenolilor prin intermediul nanoformulărilor și sistemelor de livrare a medicamentelor. Prin integrarea acestor metodologii, teza oferă o evaluare temeinică a efectelor și mecanismelor de acțiune ale extractelor *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. Această abordare multifacetată clarifică proprietățile farmacologice și mecanismele implicate, contribuind la înțelegerea potențialului lor în promovarea sănătății cardiovasculare și metabolice. Rezultatele subliniază potențialul extractelor/a sucului de BCK ca fiind o intervenție naturală promițătoare și evidențiază necesitatea unei explorări suplimentare a aplicațiilor lor în practica clinică și sănătatea publică.