

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
“VICTOR BABEȘ” IN TIMIȘOARA  
FACULTY OF MEDICINE  
DEPARTMENT IV – BIOCHEMISTRY AND  
PHARMACOLOGY  
Discipline of Pharmacology**

**BRICIU C. DIANA-MARIA**



# **DOCTORAL THESIS**

**EXPERIMENTAL PHARMACO-TOXICOLOGICAL  
RESEARCH ON COMPOUNDS WITH CARDIAC  
STIMULATING ACTIVITY**

Scientific Coordinator  
**PROF. UNIV. DR. VICTOR DUMITRAȘCU**

Timișoara  
2026

## CONTENTS

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS.....	1
1. INTRODUCTION .....	1
2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	2
3. AIM AND OBJECTIVES .....	3
4. PERSONAL CONTRIBUTIONS.....	4
4.1. MEDICINAL PLANTS AND PHYTO-COMPOUNDS IN HEART PROTECTION.....	4
4.2. EVALUATION OF THE BIOSAFETY PROFILE OF <i>GALIUM VERUM</i> IN VITRO ON CARDIOMYOCYTES AND IN OVO ON THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE .....	6
4.3. THE ANTICANCER ACTIVITY OF DIGOXIN ON CUTANEOUS MELANOMA: A DRUG REPURPOSING APPROACH.....	8

## SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

### 1. INTRODUCTION

In this research, we started from the idea that, although cardiovascular medicine had progressed greatly, residual cardiovascular risk remained a real problem, especially in contexts such as ischemia–reperfusion, where oxidative stress, inflammation, and microvascular/mitochondrial dysfunction could continue to cause damage even when perfusion was restored. I viewed cardioprotection as a complementary therapeutic necessity, not as an experimental "luxury." At the same time, I also followed the field of oncology, particularly skin melanoma, where modern therapies had brought benefits, but where non-response and acquired resistance remained significant obstacles. In this area, it seemed logical to explore a pragmatic strategy: drug repurposing, i.e., the use of already approved compounds in new indications, based on mechanistic reasoning and a known pharmacological profile. From these two axes (cardiology + oncology), we developed an approach in which we tried not to separate bioactivity from biosafety. We considered that natural products could be promising precisely because they acted in a "multi-target" manner, but we took equally seriously the idea that "natural" did not automatically mean "safe," especially in the context of polypharmacy.

Therefore, the doctoral thesis entitled **"Experimental pharmacotoxicological research on compounds with cardiac stimulatory activity"** stems from two major biomedical needs:

(1) the burden of cardiovascular disease, which remains the leading cause of morbidity and mortality, given the existence of residual cardiovascular risk fueled by oxidative stress, chronic inflammation, endothelial dysfunction, and mitochondrial injury, and

(2) the need for complementary options in oncology, particularly for melanoma, where non-response and resistance to therapies persist in some patients.

In this context, two modern approaches are integrated: the use of medicinal plants/phytochemicals (with multimodal action) and the drug

repurposing. The thesis proposes a unified framework in which bioactivity, biosafety/tolerability, and translational relevance are pursued coherently, and the transition to evidence-based medicine involves characterizing effects, understanding mechanisms, assessing biosafety, and a realistic translational pathway.

## **2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE**

During the documentation phase, we viewed tradition as a starting point, not as proof. We insisted on concrete questions: what was known experimentally, how was the effect measured, and where did the chain of translation break? We noticed that recurring difficulties were related to standardization (species, chemotype, plant part, solvent, processing), bioavailability, and batch variability, which meant that results that were similar in theory were not always comparable in practice.

Cardioprotection is defined as the set of responses/interventions that reduce myocardial damage and preserve cardiac function in the face of stressors (especially ischemia/reperfusion), as assessed by infarct size, biomarkers, functional parameters, and clinical events. In the literature reviewed, phytochemical compounds are discussed as modulators of oxidative stress, inflammation, endothelial function, mitochondrial integrity, apoptosis, and remodeling, but translation to the clinic is limited by the variability of preparations and bioavailability/PK-PD. We framed cardioprotection within the ischemia–reperfusion paradigm, where we looked at several "conserved" nodes in pathogenesis: oxidative stress (and the antioxidant response), inflammation, endothelial/NO dysfunction,  $\text{Ca}^{2+}$  imbalances, and especially the role of mitochondria (including mPTP, as a common final effector in many models). We used this mechanistic map as a filter to evaluate the plausibility of plant/phytochemical interventions.

In recent years, interest in natural products has been sustained both by traditional use and by the fact that many modern medicines have originated from natural compounds/derivatives. However, "evidence-based" use requires standardization, biological validation, mechanisms, safety, and translational integration. We treated biosafety as a mandatory condition. We explicitly noted

that a plant extract is in fact a complex chemical matrix, and that the active compounds could also produce undesirable effects or interactions (pharmacokinetic or pharmacodynamic) with standard therapies. Therefore, we considered it justified to integrate tolerability/irritability models and cytocompatibility measurements into the evaluation of a plant candidate. *Galium verum* is a plant with a phytochemical profile dominated by phenolic compounds, flavonoids, iridoid glycosides, and organic acids, whose synergy can support antioxidant and anti-inflammatory activities, but its chemical complexity requires biosafety assessments before discussing therapeutic applications.

Drug repurposing is presented as an attractive strategy, particularly in oncology, as existing drugs already have pharmacokinetic and safety profile data; however, reproducible preclinical evidence with mechanistic plausibility and selectivity assessment is required. In this regard, we viewed the advantage as being a shortcut: an approved compound already had a history of use and a described pharmacological profile. However, we considered that changing the indication required sufficiently clear preclinical evidence (viability, cell death phenotype, plausible mechanisms) so that it would not remain mere speculation. In my thesis, I used digoxin as a case study in this logic.

Overall, the thesis highlights mechanistic overlaps between cardiology and oncology: digoxin (through modulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) has a mechanism that is also exploited in oncology, but with a narrow window between therapeutic signaling and toxic ionic imbalance, which requires caution in translation. In addition, phytochemicals can influence CYP/P-gp and other systems, with an impact on efficacy and toxicity in cardiology/oncology.

### 3. AIM AND OBJECTIVES

After this groundwork stage, I formulated my goal as an integrated approach, in which I sought to:

- to summarize the mechanisms and barriers to translation of cardioprotection mediated by plants/phytochemicals,
- to evaluate the biosafety of a plant extract with cardioprotective potential (*Galium verum*) in complementary models,

- to test the reorientation of digoxin as a potential anticancer agent in melanoma, through cell analyses focused on viability and phenotype.

**The overall aim of the thesis** is to substantiate and evaluate, within an integrated framework, the bioactive potential of relevant biomedical interventions (natural products/phytochemicals and drug repositioning), by:

- (i) mechanistic and translational analysis of cardioprotection mediated by plants/phytochemicals,
- (ii) assessment of the biosafety of a plant product (*Galium verum*) in alternative in vitro and in ovo models, and
- (iii) investigating the anticancer potential of digoxin through drug repurposing in cutaneous melanoma.

**Scientific objectives include:**

- ✓ mechanistic mapping of cardioprotection (antioxidant, anti-inflammatory, mitochondrial, NO/endothelial,  $\text{Ca}^{2+}$ , apoptosis, angiogenesis/remodeling);
- ✓ formulation of a translational direction (standardization, bioavailability, biomarkers, preclinical validation, safety/interactions);
- ✓ in vitro biosafety assessment of a *Galium verum* extract on a myoblast cell line;
- ✓ evaluation of the in ovo biosafety of *Galium verum* extract on the CAM model, using the HET-CAM test;
- ✓ evaluation of the anticancer activity of digoxin on a skin melanoma cell line (A375).

## 4. PERSONAL CONTRIBUTIONS

### 4.1. MEDICINAL PLANTS AND PHYTO-COMPOUNDS IN HEART PROTECTION

In the first study, we constructed the theoretical framework of the thesis. We started from the idea that a credible cardioprotective intervention had to be connected to measurable mechanistic nodes (redox, inflammation, endothelium/NO, mitochondria, apoptosis, remodeling). We then looked at how this plausibility translated into evidence and what was blocking its translation

into clinical practice. As a practical anchor, we selected and discussed ten medicinal plants with cardioprotective potential, looking at botanical families, parts used, type of preparation, and dominant mechanisms (antioxidant/anti-inflammatory, endothelial effects, effects on lipids or platelet aggregation, etc.). In terms of human evidence, we found that the most consistent signals were frequently linked to blood pressure and endothelial function, but we also highlighted the heterogeneity of the studies (doses, standardization, populations).

Therefore, the aim of the study was:

- (a) to summarize the main mechanisms through which plants/phytochemicals can mediate cardioprotection,
- (b) identify plant sources/compounds supported by preclinical evidence (and, where available, clinical evidence), and
- (c) propose a realistic translational pathway, targeting standardization and bioavailability barriers.

Key results/ideas summarized:

- the cardioprotective effects of phytochemicals are presented as multi-targeted, with an emphasis on modulating oxidative stress and inflammation, preserving endothelial function/NO, maintaining mitochondrial integrity, influencing  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and apoptosis, as well as effects on angiogenesis/remodeling;
- plants with complementary cardioprotective properties (e.g., hawthorn, garlic, olive, ginkgo, etc.) were discussed, but we emphasized that clinical evidence is often heterogeneous and must be anchored in clear indications (blood pressure, endothelial function, exercise tolerance, etc.);
- we have charted a translational course by prioritizing standardization (chemotype/marker), optimizing PK/PD-guided bioavailability, selecting biomarkers and clinical designs with adequate power, and evaluating safety/interactions in polypharmacy - as a prerequisite for transforming experimental evidence into robust clinical applications.

My personal contribution to this study was that I tried to force a realistic path: I formulated a translational direction in which I emphasized chemical standardization, bioavailability/systemic exposure, the choice of comparable biomarkers, relevant preclinical validation, and systematic evaluation of safety

and interactions. The result of this study was that we obtained a synthesis linking the mechanisms to practical barriers and justifying why (before talking about cardioprotective potential), we also needed to have a credible biosafety profile for botanical candidates.

#### **4.2. EVALUATION OF THE BIOSAFETY PROFILE OF *GALIUM VERUM* IN VITRO ON CARDIOMYOCYTES AND IN OVO ON THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE**

In the second study, we moved from theory to an experimental evaluation explicitly focused on biosafety. We chose *Galium verum* because the literature had described a rich phytochemical profile for this plant (e.g., polyphenols/flavonoids and iridoids) and a series of biological effects that could be relevant for cardioprotection. Given the importance of cardiovascular diseases and cardiac ischemia, the study aims to provide an integrated biosafety characterization for the ethanolic extract of *Galium verum* (Gv\_EtOH), combining a relevant cardiac in vitro model (H9C2 (2-1) cell line) with an alternative in ovo model (CAM/HET-CAM - The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane).

In terms of in vitro experiments, we evaluated the ethanolic extract (Gv\_EtOH) on the H9C2(2-1) line, monitoring viability (MTT), confluence, cell number, morphology, and structural/nuclear integrity (immunofluorescence). We interpreted these measurements as a convergent set for cytocompatibility. Regarding the in ovo experiments, we continued with the CAM/HET-CAM model, where we monitored vascular phenomena (hemorrhage, lysis, coagulation) and calculated the irritation score (IS) in comparison with the negative control – distilled H<sub>2</sub>O and positive controls – 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and 1N NaOH.

The main results obtained were:

- cell viability increased significantly ( $P < 0.0001$ ), with the extract exhibiting dose-dependent stimulatory activity: ~170% at 55 µg/mL, decreasing to ~135% at 200 µg/mL;
- confluence and cell number increased particularly at low-medium concentrations (up to 178.4% for number and 177.1% for confluence),



then decreased slightly at 100–200 µg/mL (e.g., 145.6% and 142.0% at 200 µg/mL);

- the morphology of H9C2(2-1) cells remained generally normal (cells retained their elongated shape), with no major toxic signs; immunofluorescence showed normal-looking nuclei and only slight reorganization/condensation of actin;
- the HET-CAM (irritation) test revealed an IS irritation score for SDS 1% = 18.501 (classified as severely irritating), for H<sub>2</sub>O = 0.070 (non-irritating), and for Gv\_EtOH extract 200 µg/mL = 5.230 (moderate irritant, close to mild irritant); only slight coagulation (~128 s) of blood vessels was observed in the case of Gv\_EtOH extract.;
- regarding the anti-irritant/vascular modulator effect, pretreatment of the CAM (chorioallantoic membrane) with the extract reduced SDS-induced hemorrhage/lysis/coagulation, suggesting a potential protective role on vascular integrity in this experimental model.

Overall, the results clearly pointed me towards the idea of cytocompatibility: viability increased significantly after 24 hours compared to the control. At the same time, I observed increases in confluence and cell number, with no morphological signs typical of severe stress or structural collapse. In immunofluorescence, we did not identify any changes suggestive of damage to actin filaments or nuclei under the conditions evaluated. Compared to positive controls (1% SDS and 0.1 N NaOH), the Gv\_EtOH ethanol extract (200 µg/mL) had a much milder profile. We observed that, unlike SDS (which rapidly caused hemorrhage and coagulation), the extract did not induce hemorrhage or lysis, and coagulation occurred late. An additional experimental step was to perform an anti-irritant test: we pretreated CAM with the extract and induced vascular aggression with SDS. We observed an attenuation of the response, including a decrease in IS (e.g., for SDS 1%, IS decreased to 12.202, and for SDS 0.5% to 11.731 after pretreatment).

In conclusion, the Gv\_EtOH extract showed a favorable biosafety profile in vitro (no cytotoxicity, with a stimulating effect), tolerability in ovo with low-moderate irritation potential, plus a signal of a modulating/anti-irritant effect on experimentally induced vascular aggression. Therefore, based on the results obtained, we can say that the ethanolic extract of *Galium verum*

deserves to be investigated in further research regarding its role in cardioprotection/vascular protection.

#### **4.3. THE ANTICANCER ACTIVITY OF DIGOXIN ON CUTANEOUS MELANOMA: A DRUG REPURPOSING APPROACH**

In the third study, I sought to test a drug repurposing scenario in practice. We chose digoxin as a model because it was a cardiac glycoside with long-standing clinical use, and the literature suggested that it could influence tumor proliferation and programmed cell death through multiple mechanisms (including pathways such as PI3K/Akt, MAPK/ERK, HIF-1 $\alpha$ , apoptotic processes, and antiangiogenic effects). Therefore, within the paradigm of drug repurposing, this research study evaluates whether digoxin can exhibit anticancer activity on a skin melanoma cell line (A375), in the context of therapeutic needs and plausible mechanisms discussed (including the relevance of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and associated signaling).

From an experimental point of view, A375 cells were treated for 24 hours with digoxin at doses of 10 nM, 25 nM, and 50 nM. Cell viability was assessed using the MTT test, and morphological aspects regarding cell confluence, mitochondrial and nuclear labeling (MitoTracker + Hoechst), and cell death phenotype (AO/PI) were investigated by differential staining for apoptotic/necrotic populations, and the apoptotic index was also calculated.

The main results obtained were:

- cell viability decreased in a dose-dependent manner: 55.41% (10 nM), 52.36% (25 nM), 43.13% (50 nM) compared to control;
- cell morphology supported the antiproliferative/cytotoxic effect (by reducing confluence, rounded and detached cells, which we interpreted as signs compatible with severe impairment of cell status after exposure to digoxin);
- mitochondrial and nuclear alterations were compatible with the initiation of apoptosis (chromatin/mitochondrial condensation, nuclear fragmentation, apoptotic bodies) and the appearance of apoptotic/necrotic populations in differential staining;

- in AO/PI, we observed a reduction in the "viable" signal (intense green) and an increase in cells with red or mixed signals, indicating loss of membrane integrity and the presence of apoptotic/necrotic cells;
- the apoptotic index showed a dose-dependent increase (from approximately ~13% in the control to ~33% in the 50 nM digoxin sample).

In conclusion, the results obtained showed that digoxin exerts antitumor activity in vitro on the A375 cell line (melanoma) (decreased viability + structural/functional signals compatible with apoptosis), but we remained cautious in our interpretation. In the absence of in-depth molecular tests, we believe that further validation is needed regarding the mechanism, selectivity, and safety as an antitumor agent/adjuvant in more complex systems.

The originality of the doctoral thesis is based on the results obtained and their publication in three prestigious specialist journals, in which I am the main author, as follows:

- **The data presented in Chapter 2 are the subject of an ISI article published in the Life-Basel Journal (MDPI), Journal Rank Q1 (I.F.= 3.4).**
- **The data presented in Chapter 3 are the subject of another ISI article published in the World Journal of Cardiology, Journal Rank Q2 (I.F. = 2.8).**
- **The data presented in Chapter 4 are the subject of the third ISI article, published in Farmacia Journal, Journal Rank Q4 (I.F. = 1.3).**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL IV – BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE  
Catedra Universitară Farmacologie**

**BRICIU C. DIANA-MARIA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**CERCETĂRI EXPERIMENTALE FARMACO-  
TOXICOLOGICE PE COMPUȘI CU ACTIVITATE  
STIMULATOARE CARDIACĂ**

Coordonator Științific  
**PROF. UNIV. DR. VICTOR DUMITRAȘCU**

Timișoara  
2026

## CUPRINS

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT.....	1
1. INTRODUCERE .....	1
2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	2
3. SCOP ȘI OBIECTIVE .....	3
4. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	4
4.1. PLANTE MEDICINALE ȘI FITOCOMPUȘI ÎN PROTECȚIA CARDIACĂ.....	4
4.2. EVALUAREA PROFILULUI DE BIOSIGURANȚĂ AL <i>GALIUM VERUM</i> IN VITRO PE CARDIOMIOCITE ȘI IN OVO PE MEMBRANA CORIOALANTOIDĂ.....	6
4.3. ACTIVITATEA ANTICANCEROASĂ A DIGOXINULUI PE MELANOMUL CUTANAT: O ABORDARE DE REORIENTARE MEDICAMENTOASĂ.....	8

## REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

### 1. INTRODUCERE

În această cercetare am pornit de la ideea că, deși medicina cardiovasculară progresase mult, riscul cardiovascular rezidual rămăsese o problemă reală, mai ales în contexte precum ischemia–reperfuzia, unde stresul oxidativ, inflamația și disfuncția microvasculară/mitocondrială puteau continua să producă leziuni chiar și atunci când perfuzia era restabilită. Am privit cardioprotecția ca pe o nevoie terapeutică complementară, nu ca pe un „lux” experimental. În același timp, am urmărit și domeniul oncologiei, în special melanomul cutanat, unde terapiile moderne aduseseră beneficii, dar unde non-răspunsul și rezistența dobândită rămăseseră obstacole importante. În această zonă, mi s-a părut logic să explorez o strategie pragmatică: reorientarea medicamentoasă (drug repurposing), adică utilizarea unor compuși deja aprobați în indicații noi, pe baza unui raționament mecanicist și a unui profil farmacologic cunoscut. Din aceste două axe (cardiologie + oncologie) am construit un demers în care am încercat să nu separ bioactivitatea de biosiguranță. Am considerat că produsele naturale pot fi promițătoare tocmai pentru că acționau „multi-țintă”, dar am tratat la fel de serios și ideea că „natural” nu însemna automat „sigur”, mai ales în context de polimedicatie.

Prin urmare, teza de doctorat intitulată **„Cercetări experimentale farmaco-toxicologice pe compuși cu activitate stimulatorie cardiacă”** pornește de la două nevoi biomedicale majore:

(1) povara bolilor cardiovasculare, care rămân principala cauză de morbiditate și mortalitate, în condițiile existenței unui risc cardiovascular rezidual alimentat de stres oxidativ, inflamație cronică, disfuncție endotelială și injurie mitocondrială, și

(2) nevoia de opțiuni complementare în oncologie, în special pentru melanom, unde persistă non-răspunsul și rezistența la terapii la o parte dintre pacienți.

În acest context sunt integrate două direcții moderne: valorificarea plantelor medicinale/fitocompușilor (cu acțiune multimodală) și reorientarea

medicamentoasă. Teza propune un cadru unitar în care bioactivitatea, biosiguranța/tolerabilitatea și relevanța translațională sunt urmărite coerent, iar tranziția spre medicina bazată pe dovezi presupune caracterizarea efectelor, înțelegerea mecanismelor, evaluarea biosiguranței și un parcurs translațional realist.

## 2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În etapa de documentare, am privit tradiția ca pe un punct de plecare, nu ca pe o dovadă. Am insistat pe întrebări concrete: ce se știa experimental, cum se măsura efectul și unde se rupea lanțul de translație? Am observat că dificultățile recurente țineau de standardizare (specie, chemotip, parte de plantă, solvent, procesare), de biodisponibilitate și de variabilitatea loturilor, care făceau ca rezultate similare din punct de vedere teoretic să nu fie mereu comparabile în practică.

Cardioprotecția este definită ca ansamblul răspunsurilor/intervențiilor care reduc leziunea miocardică și conservă funcția cardiacă în fața factorilor de stres (în special ischemie/reperfuzie), fiind evaluată prin dimensiunea infarctului, biomarkeri, parametri funcționali și evenimente clinice. În literatura analizată, compușii fitochimici sunt discutați ca modulatori ai stresului oxidativ, inflamației, funcției endoteliale, integrității mitocondriale, apoptozei și remodelării, dar translația către clinică este limitată de variabilitatea preparatelor și de biodisponibilitate/PK-PD. Am încadrat cardioprotecția în paradigma ischemie–reperfuzie, unde am urmărit câteva noduri „conservate” în patogeneză: stres oxidativ (și răspunsul antioxidant), inflamație, disfuncție endotelială/NO, dezechilibre de  $\text{Ca}^{2+}$ , și mai ales rolul mitocondriilor (inclusiv mPTP, ca efector final comun în multe modele). Am folosit această hartă mecanicistă ca filtru pentru a evalua plauzibilitatea intervențiilor din plante/fitocompuși.

În ultimii ani, interesul pentru produse naturale este susținut atât de tradiția utilizării, cât și de faptul că numeroase medicamente moderne au provenit din compuși naturali/derivați. Totuși, utilizarea „bazată pe dovezi” cere standardizare, validare biologică, mecanisme, siguranță și integrare translațională. Am tratat biosiguranța ca o condiție obligatorie. Am reținut

explicit că un extract vegetal este de fapt o matrice chimică complexă, iar compușii activi puteau produce și efecte nedorite sau interacțiuni (farmacocinetice ori farmacodinamice) cu terapiile uzuale. De aceea, am considerat justificată integrarea unor modele de tolerabilitate/iritabilitate și a unor măsurători de citocompatibilitate în evaluarea unui candidat vegetal. *Galium verum* este o plantă cu profil fitochimic dominat de compuși fenolici, flavonoizi, glicozide iridoide și acizi organici, a căror sinergie poate susține activități antioxidante și antiinflamatorii, dar complexitatea chimică impune evaluări de biosiguranță înaintea discuției privind aplicațiile terapeutice.

Reorientarea medicamentoasă este prezentată ca o strategie atractivă în special în oncologie, deoarece medicamentele existente au deja date privind farmacocinetica și profilul de siguranță; totuși, sunt necesare dovezi preclinice reproductibile, cu plauzibilitate mecanistică și evaluarea selectivității. În această direcție, am privit avantajul ca fiind scurtarea drumului: un compus aprobat avea deja un istoric de utilizare și un profil farmacologic descris. Totuși, am considerat că schimbarea indicației cerea dovezi preclinice suficient de clare (viabilitate, fenotip de moarte celulară, mecanisme plauzibile) ca să nu rămână doar o speculație. În teză, am folosit digoxinul ca studiu de caz în această logică.

În ansamblu, teza evidențiază suprapuneri mecanistice între cardiologie și oncologie: digoxinul (prin modularea  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazei) are un mecanism exploatat și în oncologie, dar cu fereastră îngustă între semnalizarea terapeutică și dezechilibrul ionic toxic, ceea ce impune precauție în translație. În plus, fitocompușii pot influența CYP/P-gp și alte sisteme, cu impact asupra eficacității și toxicității în cardiologie/oncologie.

### 3. SCOP ȘI OBIECTIVE

După această etapă de fundamentare, mi-am formulat scopul ca un demers integrat, în care am urmărit:

- să sintetizez mecanismele și barierele de translație ale cardioprotecției mediate de plante/fitocompuși,
- să evaluez biosiguranța unui extract vegetal cu potențial cardioprotector (*Galium verum*) în modele complementare,



- să testeze reorientarea digoxinului ca agent cu potențial anticancer în melanom, prin analize celulare orientate pe viabilitate și fenotip.

**Scopul general al tezei** este fundamentarea și evaluarea, într-un cadru integrat, potențialul bioactiv al unor intervenții relevante biomedical (produse naturale/fitocompuși și reorientare medicamentoasă), prin:

- (i) analiza mecanistică și translațională a cardioprotecției mediate de plante/fitocompuși,
- (ii) evaluarea biosiguranței unui produs vegetal (*Galium verum*) în modele alternative in vitro și in ovo, și
- (iii) investigarea potențialului anticancer al digoxinului prin reorientare medicamentoasă în melanom cutanat.

**Obiectivele științifice includ:**

- ✓ cartografiere mecanistică a cardioprotecției (antioxidant, antiinflamator, mitocondrial, NO/endotelial,  $\text{Ca}^{2+}$ , apoptoză, angiogeneză/remodelare);
- ✓ formularea unei direcții translaționale (standardizare, biodisponibilitate, biomarkeri, validare preclinică, siguranță/interacțiuni);
- ✓ evaluarea biosiguranței in vitro a unui extract de *Galium verum* pe o linie celulară de mioblaste;
- ✓ evaluarea biosiguranței in ovo a extractului de *Galium verum* pe model CAM, utilizând testul HET-CAM;
- ✓ evaluarea activității anticanceroase a digoxinului pe o linie celulară de melanom cutanat (A375).

## 4. CONTRIBUȚII PERSONALE

### 4.1. PLANTE MEDICINALE ȘI FITOCOMPUȘI ÎN PROTECȚIA CARDIACĂ

În primul studiu, am construit scheletul teoretic al tezei. Am pornit de la ideea că o intervenție cardioprotectoare credibilă trebuia să se conecteze la noduri mecaniciste măsurabile (redox, inflamație, endotelium/NO, mitocondrii, apoptoză, remodelare). Am urmărit apoi cum se traducea această plauzibilitate în dovezi și ce anume bloca translația către clinică. Ca ancoră practică, am selectat și am discutat zece plante medicinale cu potențial cardioprotector,

urmărind familiile botanice, părțile utilizate, tipul de preparat și mecanismele dominante (antioxidant/antiinflamator, efecte endoteliale, efecte asupra lipidelor sau agregării plachetare, etc.). În planul dovezilor umane, am constatat că semnalele cele mai coerente se legau frecvent de tensiunea arterială și funcția endotelială, dar am subliniat și heterogenitatea studiilor (doze, standardizare, populații).

Prin urmare, scopul studiului a fost:

(a) să sintetizăm mecanismele principale prin care plantele/fitocompușii pot media cardioprotecția,

(b) să identificăm surse vegetale/compuși susținuți de dovezi preclinice (și, unde există, dovezi clinice), și

(c) să propunem un traseu translațional realist, ținând barierele de standardizare și biodisponibilitate.

Rezultate/idei-cheie sintetizate:

- cardioprotecția fitocompușilor este prezentată ca multi-țintă, cu accent pe modularea stresului oxidativ și a inflamației, conservarea funcției endoteliale/NO, menținerea integrității mitocondriale, influențarea semnalizării  $\text{Ca}^{2+}$  și a apoptozei, precum și efecte asupra angiogenezei/remodelării;
- au fost discutate plante cu profil cardioprotector complementar (ex. păducel, usturoi, măslin, ginkgo, etc.), dar am subliniat că dovezile clinice sunt adesea eterogene și trebuie ancorate în indicații clare (tensiune arterială, funcție endotelială, toleranță la efort etc.).
- am trasat o direcție translațională prin: prioritizarea standardizării (chemotip/marker), optimizarea biodisponibilității ghidate de PK/PD, alegerea biomarkerilor și designuri clinice cu putere adecvată, plus evaluarea siguranței/interacțiunilor în polifarmacie – ca premisă pentru transformarea dovezilor experimentale în aplicații clinice robuste.

Contribuția mea personală în acest studiu a fost că am încercat să forțez un traseu realist: am formulat o direcție translațională în care am pus accent pe standardizare chimică, biodisponibilitate/expunere sistemică, alegerea biomarkerilor comparabili, validare preclinică relevantă și evaluare sistematică a siguranței și interacțiunilor. Rezultatul acestui studiu a fost că am obținut o sinteză care lega mecanismele de barierele practice și care a

justificat de ce (înainte de a vorbi despre potențial cardioprotector), trebuia să am și un profil de biosiguranță credibil pentru candidații botanici.

#### **4.2. EVALUAREA PROFILULUI DE BIOSIGURANȚĂ AL *GALIUM VERUM* IN VITRO PE CARDIOMIOCITE ȘI IN OVO PE MEMBRANA CORIOALANTOIDĂ**

În al doilea studiu, am trecut de la teorie la o evaluare experimentală orientată explicit pe biosiguranță. Am ales *Galium verum* deoarece literatura descrisese pentru această plantă un profil fitochimic bogat (de exemplu polifenoli/flavonoide și iridoide) și o serie de efecte biologice care puteau fi relevante pentru cardioprotecție. Pornind de la importanța bolilor cardiovasculare și a ischemiei cardiace, studiul urmărește o caracterizare integrată de biosiguranță pentru extractul etanolic de *Galium verum* (Gv\_EtOH), combinând un model in vitro relevant cardiac (linia celulară H9C2 (2-1)) cu un model alternativ in ovo (CAM/HET-CAM).

Din punct de vedere al experimentelor in vitro, am evaluat extractul etanolic (Gv\_EtOH) pe linia H9C2(2-1), urmărind viabilitatea (MTT), confluența, numărul celular, morfologia și integritatea structurală/nucleară (imunofluorescență). Am interpretat aceste măsurători ca un set convergent pentru citocompatibilitate. În ceea ce privește experimentele in ovo, am continuat cu modelul CAM/HET-CAM, unde am urmărit fenomenele vasculare (hemoragie, liză, coagulare) și am calculat scorul de iritație (IS) în comparație cu martorul negativ – H<sub>2</sub>O distilată și cu martorii pozitivi – soluția de docdecil sulfat de sodiu 1% (SDS) și NaOH 1N.

Rezultatele principale obținute au fost:

- viabilitatea celulară a crescut semnificativ ( $P < 0,0001$ ), extractul având activitate stimulatorie dependentă de doză: ~170% la 55 µg/mL, cu scădere la ~135% la 200 µg/mL;
- confluența și numărul de celule au crescut în special la concentrații mici-medii (până la 178,4% pentru număr și 177,1% pentru confluență), apoi au scăzut ușor la 100–200 µg/mL (ex. 145,6% și 142,0% la 200 µg/mL);

- morfologia celulelor H9C2(2-1) a rămas în general normală (celulele și-au păstrat forma alungită), fără semne toxice majore; imunofluorescența a arătat nucleii cu aspect normal și doar o ușoară reorganizare/condensare a actinei;
- testul HET-CAM (iritare) a relevat un scor de iritare IS pentru SDS 1% = 18,501 (clasificat ca iritant sever), pentru H<sub>2</sub>O = 0,070 (neiritant), iar pentru extractul de Gv\_EtOH 200 μg/mL = 5,230 (iritant moderat, aproape de slab iritant); s-a observat doar o coagulare ușoară (~128 s) a vaselor de sânge în cazul extractului Gv\_EtOH;
- în ceea ce privește efectul anti-iritant/modulator vascular, pretratarea CAM (membranei corioalantoide) cu extract a redus hemoragia/liza/coagularea induse de SDS, sugerând un potențial rol protector asupra integrității vasculare în acest model experimental.

În ansamblu, rezultatele m-au orientat clar spre ideea de citocompatibilitate: viabilitatea a crescut semnificativ după 24 h, comparativ cu controlul. În același timp, am observat creșteri ale confluentei și ale numărului celular, fără semne morfologice tipice de stres sever sau colaps structural. În imunofluorescență, nu am identificat modificări sugestive pentru afectarea filamentelor de actină sau a nucleilor în condițiile evaluate. În comparație cu martorii pozitivi (SDS 1% și NaOH 0,1 N), extractul etanolic Gv\_EtOH (200 μg/mL) a avut un profil mult mai blând. Am observat că, spre deosebire de SDS (care producea rapid hemoragie și coagulare), extractul nu a indus hemoragie sau liză, iar coagularea a apărut tardiv. Un pas suplimentar din punct de vedere experimental, a fost efectuarea unui test anti-iritativ: am pretratat CAM cu extract și am indus agresiune vasculară cu SDS. Am observat o atenuare a răspunsului, inclusiv prin scăderea IS (de exemplu, pentru SDS 1% IS a scăzut la 12,202, iar pentru SDS 0,5% la 11,731 după pretratament).

În concluzie, extractul Gv\_EtOH a prezentat un profil de biosiguranță favorabil in vitro (fără citotoxicitate, cu efect stimulator), tolerabilitate in ovo cu potențial iritativ redus-moderat, plus un semnal de efect modulator/anti-iritativ asupra agresiunii vasculare induse experimental. Prin urmare, pe baza rezultatelor obținute putem afirma că, extractul etanolic de *Galium verum* merită să fie investigat în cercetări ulterioare privind rolul său orientat către cardioprotecție/vascular.

#### **4.3. ACTIVITATEA ANTICANCEROASĂ A DIGOXINULUI PE MELANOMUL CUTANAT: O ABORDARE DE REORIENTARE MEDICAMENTOASĂ**

În al treilea studiu, am urmărit să testez practic un scenariu de reorientare medicamentoasă. Am ales digoxinul ca model deoarece era un glicozid cardiac cu utilizare clinică îndelungată, iar literatura sugerase că putea influența proliferarea tumorală și moartea celulară programată prin mecanisme multiple (incluzând căi precum PI3K/Akt, MAPK/ERK, HIF-1 $\alpha$ , procese apoptotice și efecte antiangiogenice). Prin urmare, în paradigma de reorientare medicamentoasă, acest studiu de cercetare evaluează dacă digoxinul poate manifesta activitate anticanceroasă pe o linie de melanom cutanat (A375), în contextul nevoilor terapeutice și al mecanismelor plauzibile discutate (inclusiv relevanța Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazei și semnalizări asociate).

Din punct de vedere experimental, celule A375 au fost tratate 24h cu digoxin, la doze de 10 nM, 25 nM și 50 nM. A fost evaluată viabilitatea celulară, utilizând testul MTT, respectiv au fost investigate aspecte morfologice privind confluența celulară, marcajul mitocondrial și nuclear (MitoTracker + Hoechst), și fenotipul morții celulare (AO/PI) prin colorarea diferențială pentru populații apoptotice/necrotice, fiind de asemenea calculat și indicele apoptotic.

Rezultatele principale obținute au fost:

- viabilitatea celulară a scăzut dependent de doză: 55,41% (10 nM), 52,36% (25 nM), 43,13% (50 nM) față de control;
- morfologia celulară a susținut efectul antiproliferativ/citotoxic (prin reducerea confluenței, celule rotunjite și detașate, ceea ce am interpretat ca semne compatibile cu afectare severă a statusului celular după expunerea la digoxin);
- alterările mitocondriale și nucleare au fost compatibile cu inițierea apoptozei (condensarea cromatinei/mitocondrii, fragmentarea nucleară, corpuri apoptotice) și apariția populațiilor apoptotice/necrotice la colorări diferențiale;
- în AO/PI, am observat reducerea semnalului „viabil” (verde intens) și creșterea celulelor cu semnal roșu sau mixt, indicând pierderea integrității membranare și prezența celulelor apoptotice/necrotice;

- indicele apoptotic a arătat o creștere dependentă de doză (aproximativ de la ~13% în control la ~33% la proba cu digoxin 50 nM).

În concluzie, rezultatele obținute au arătat că digoxinul exercită activitate antitumorală in vitro pe linia celulară A375 (melanom) (scădere de viabilitate + semnale structurale/funcționale compatibile cu apoptoza), însă am păstrat interpretarea prudentă, în lipsa unor teste moleculare aprofundate consider că sunt necesare validări suplimentare privind mecanismul, selectivitatea și siguranța ca agent/adjuvant antitumoral în sisteme mai complexe.

Caracterul original al tezei de doctorat se bazează pe rezultatele obținute și prin publicarea lor în trei jurnale prestigioase de specialitate, în care subsemnata este autor principal, astfel:

**- Datele prezentate în Capitolul 2, fac obiectul unui articol ISI, publicat în Jurnalul Life-Basel (MDPI), Journal Rank Q1 (I.F.= 3.4).**

**- Datele prezentate în Capitolul 3, fac obiectul unui alt articol ISI, publicat în Jurnalul World Journal of Cardiology, Journal Rank Q2, (I.F. = 2.8).**

**- Datele prezentate în Capitolul 4, fac obiectul celui de-al treilea articol ISI, publicat în Jurnalul Farmacia, Journal Rank Q4, (I.F. = 1.3).**