

**„UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENT I**

SCURTU A. ALEXANDRA-DENISA



REZUMAT

**EVALUĂRILE FARMACOTOXICOLOGICE
EXPERIMENTALE ALE SPECIILOR *GALIUM VERUM*
L. ȘI *GALIUM MOLLUGO* L. ÎN CANCERUL DE PIELE**

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. DEHELEAN CRISTINA-ADRIANA

**Timișoara
2024**

CUPRINS

1. INTRODUCERE	3
2. SCOP ȘI CONTRIBUȚII	4
3. REZULTATE	5
3.1. SCREENING-UL FITOCHIMIC AL SPECIILOR <i>GALIUM VERUM</i> L. ȘI <i>GALIUM MOLLUGO</i> L.....	5
3.2. EVALUAREA MICROBIOLOGICĂ A EXTRACTELOR DE <i>GALIUM</i> <i>VERUM</i> L. ȘI <i>GALIUM MOLLUGO</i> L.....	7
3.3. EVALUARE BIOLOGICĂ EXPERIMENTALĂ A EXTRACTELOR DE <i>GALIUM VERUM</i> L. ȘI <i>GALIUM MOLLUGO</i> L.	8
3.4. EVALUAREA <i>IN OVO</i> A EXTRACTELOR DE <i>GALIUM VERUM</i> L. ȘI <i>GALIUM MOLLUGO</i> L.	10
4. CONCLUZII	12

REZUMAT

1. INTRODUCERE

Melanomul este o formă de cancer care apare din proliferarea necontrolată a melanocitelor. Melanomul cutanat este considerat cauza majoră de mortalitate în rândul cancerelor de piele, ceea ce arată o creștere continuă a incidenței sale. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) raportează că melanomul este al cincilea cel mai frecvent tip de cancer la bărbați și al șaselea la femei. Managementul melanomului are multe implicații, astfel încât pot exista diferite abordări, de la excizie, terapii adjuvante (radiații, chimioterapie și/sau chirurgie), stadializare tumorală și chiar terapie prin consiliere și modificarea stilului de viață.

În zilele noastre, datorită apariției rezistenței la chimioterapicele existente și a efectelor adverse grave care apar în urma administrării acestora, se dorește înlocuirea acestora cu terapii mai puțin toxice. Prin urmare, interesul pentru tratamentul compușilor din plante a luat amploare. Diferite extracte și fitocompuși obținuți din scoarța plantelor, rădăcini, frunze, tulpini și flori au demonstrat un efect promițător în tratamentul cancerului, un pas important în sinteza de noi medicamente anti-melanom. Compușii fitochimici exercită o varietate de acțiuni antiinflamatorii și antioxidante și, în plus, au un potențial puternic de a induce efecte chimiopreventive în melanom. Fitocompușii, cum ar fi polifenolii și terpenozii, prezintă activitate antitumorală promițătoare, putând fi astfel utilizați în tratamentul melanomului.

Din cele mai vechi timpuri, speciile *Galium* au fost folosite în medicina tradițională, fiind o sursă bogată de compuși activi precum flavonozii, acizii fenolici, terpenele, glicozidele și uleiurile esențiale. Astfel, datorită compoziției vaste, speciile *Galium* au dezvăluit proprietăți diuretice, laxative, cicatrizante, antireumatice,

sedative și antiinflamatorii; iar în ultimii ani s-a pus accent pe investigarea plantei în terapia cancerului.

2. SCOP ȘI CONTRIBUȚII

Scopul acestei teze a fost evaluarea fitochimică a extractelor de *Galium verum* L. și *Galium mollugo* L. și investigarea *in vitro* a capacității anticanceroase pe liniile de melanom uman și murin; fiind un pas important în managementul melanomului, o patologie cu o incidență crescută în ultimii ani.

Prima parte a acestei teze oferă informații din literatura de specialitate recentă despre managementul melanomului și rolul plantelor și compușilor naturali în terapia melanomului. Ulterior, a fost abordată acțiunea anticanceroasă a speciilor de *Galium* și a compușilor acestora.

Contribuția personală a constat, în primul rând, în investigarea fitochimică a extractelor de *Galium verum* L. și *Galium mollugo* L. (procurate din farmacie dar colectate și din flora spontană a României) realizate cu diferiți solvenți. Am folosit diferite metode pentru a investiga cele mai promițătoare extracte, cum ar fi cromatografia lichidă cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS) pentru a determina conținutul de compuși, dar și spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) pentru a contura spectrul acestora, alături de testul DPPH pentru a determina potențialul antioxidant al extractelor. Ulterior, am investigat activitatea antimicrobiană folosind metoda difuziei pe disc, pentru a le stabili potențialul acestora pe cele mai cunoscute tulpini bacteriene.

Următorul pas a fost determinarea acțiunii *in vitro* a extractelor. Inițial, nivelul de siguranță a fost evaluat pe linia celulară de keratinocite umane sănătoase (HaCaT) și apoi a fost investigat efectul anticanceros asupra liniilor celulare de melanom uman (A375) și melanom murin (B164A5). Astfel, celulele au fost evaluate din punct de vedere al modificărilor morfologice și al impactului asupra confluenței,

viabilității (testul MTT), citotoxicității (metoda LDH), mai mult a fost determinată potențiala amplitudine apoptotică (testul Hoechst) și capacitatea de migrare a celulelor (testul Scratch).

Ultimul pas a fost investigarea *in ovo* cu ajutorul testului membranei corioalantoice și testului membranei corioalantoice pe ou de găină a extractelor colectate din flora spontană, pentru a determina profilul de toleranță în plexul vascular și acțiunea iritantă.

3. REZULTATE

3.1. SCREENING-UL FITOCHIMIC AL SPECIILOR *GALIUM VERUM* L. ȘI *GALIUM MOLLUGO* L.

Folosind LC-MS, s-a obținut că extractele de *Galium* sp. prezintă cantități semnificative de compuși polifenolici. În extractul GvEtOH (din materialul vegetal achiziționat de la drogherie) au fost identificați 7 compuși, în cel mai mare procent s-au găsit izoquercitrină și rutina (17.765 µg/mL, respectiv 14.811 µg/mL); similar cu GvEtOH, în extractul GvEtOAc a fost identificată izoquercitrina în cantitatea cea mai mare (20.384 µg/mL), împreună cu alți compuși fenolici. În cazul GvDEE au fost detectați 7 compuși, și în plus, a fost identificată prezența unor noi fitocompuși (acid p-cumaric și acid ferulic), cel mai abundent de această dată fiind quercetolul; în timp ce în faza GvBuOH s-a constatat prezența izoquercitrinei, rutinei și acidului clorogenic în cantități mici. Mai mult, în faza GvPEE au fost prezenți 4 compuși polifenolici, dar nu au fost cuantificați găsindu-se sub limita de detecție (0,1 µg/mL), în timp ce în faza GvH₂O au fost cuantificați 2 compuși. Pe de altă parte, în extractul GvEtOH din *Galium verum* L. recoltat din flora spontană au fost identificați 6 compuși (rutină - 25,945 µg/mL), inclusiv hiperozidă, compus neidentificat în celelalte extracte; iar în GmEtOH din *Galium mollugo* L. au fost identificați 4 compuși, dintre care 3 au fost cuantificați (acid clorogenic, rutina și izoquercitrină).

În plus, prezența epicatechinei a fost identificată în extractele GvEtOH și GvDEE, în timp ce în faza GvEtOAc, prezența acidului galic a fost cuantificată în cantitate mică (0,34 µg/mL). De asemenea, TPC din extractul GvEtOH a fost de 1,30 mg GAE/g extract uscat în comparație cu TPC din extractul GvEtOAc de 1,39 mg GAE/g extract uscat. În ceea ce privește conținutul total de flavonoide, s-a observat aceeași ușoară variație. TFC în extractul GvEtOH a fost de 1,42 mg CE/g extract uscat în comparație cu TFC în GvEtOAc de 1,37 mg CE/g extract uscat.

Având în vedere potrivirea dintre benzile de absorbție înregistrate la un anumit număr de undă și apoi comparându-le cu frecvența benzii de absorbție din bibliotecă, am putut identifica principalii polifenoli conținuți în extractele uscate, prin metoda de investigare calitativă FT-IR, datele care au fost în acord cu rezultatele obținute prin metoda LC-MS.

Analizând capacitatea antioxidantă, s-a constatat că toate extractele testate de *Galium* sp. posedă potențial antioxidant în comparație cu standardul (acid ascorbic). În ceea ce privește concentrația cea mai mare testată (1 mg/mL), activitatea antioxidantă a fiecărui extract respectă liniaritatea GvEtOAc > GvDEE > GvEtOH > GvBuOH > GvH₂O > GvPEE (Figura 1).

Prin urmare, rezultatele fitochimice indică prezența compușilor bioactivi; rutina este principalul compus identificat, cea mai mare concentrație se găsește în extractele etanolicе de *G. verum* L. (GvEtOH > GvEtOH), urmate de GvBuOH. Mai mult, cantități semnificative de izoquercitrină și acid clorogenic au fost identificate în toate extractele. Toate extractele testate au prezentat o potență antioxidantă semnificativă, într-o manieră dependentă de concentrație, cea mai semnificativă fiind pentru extractul GvEtOAc.

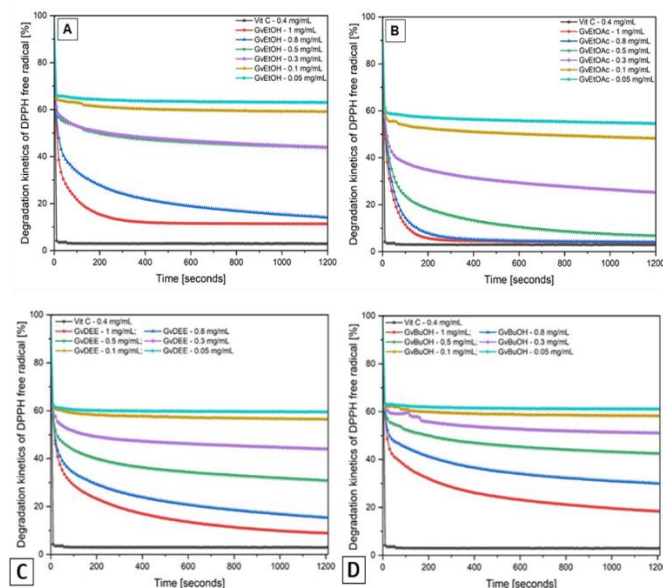


Figura 1. Cinetica de degradare dependentă de timp a radicalilor liberi DPPH este furnizată de extractele de etanol (A), acetat de etil (B), eter dietilic (C) și butanol (D) ale *Galium verum* L. precum și de soluția etanolică de vitamina C (linia neagră).

3.2. EVALUAREA MICROBIOLOGICĂ A EXTRACTELOR DE *GALIUM VERUM* L. ȘI *GALIUM MOLLUGO* L.

Metoda de difuzie pe disc oferă dovezi că extractele prezintă o acțiune antimicrobiană importantă, în special asupra tulpinilor bacteriene Gram-pozitive și mai puțin asupra celor negative. Mai mult, s-a subliniat că extractul GvEtOH poseda cea mai puternică activitate asupra *Streptococcus pyogenes* și *Staphylococcus aureus*, împreună cu GvDEE. Prin comparație, putem observa că extractul GvEtOH (procurat de la drogherie) are un efect antimicrobian mai mic decât GvEtOH (din flora spontană), în plus, GmEtOH exercită o activitate mai puternică decât GvEtOH.

3.3. EVALUARE BIOLOGICĂ EXPERIMENTALĂ A EXTRACTELOR DE *GALIUM VERUM* L. ȘI *GALIUM MOLLUGO* L.

În urma studiilor *in vitro* efectuate pe keratinocite, se poate concluziona că extractele studiate nu scad semnificativ viabilitatea celulelor sănătoase și nici nu interferează cu morfologia celulară până la o concentrație de $\approx 55 \mu\text{g/mL}$, după această concentrație, o scădere a viabilității este evidentă pentru extractele GVetOH și GmEtOH (Figura 2).

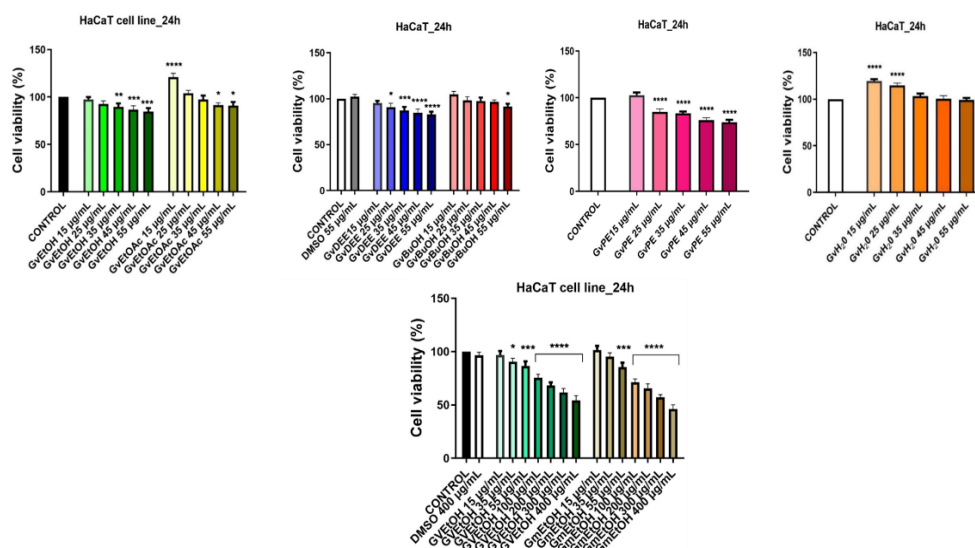


Figura 2. Procentul de viabilitate al celulelor HaCaT după stimularea cu extractele de *G. verum* L. și *G. mollugo* L. la 24 de ore post-stimulare.

La nivelul celulelor tumorale, s-a observat că la concentrația de $55 \mu\text{g/mL}$, GvPE scade viabilitatea celulelor A375 în cea mai mare proporție (55,4%), dar acest lucru se poate datora solventului deoarece, deoarece din punct de vedere fitochimic, nu au fost identificați compuși polifenolici care să ateste efectul acestuia. În conformitate cu compoziția, GvEtOAc a scăzut procentul de celule viabile, urmat de GVetOH. Între cele două extracte etanolice de *G. verum* L., nu au fost observate

diferențe semnificative la cea mai mare concentrație testată în ambele cazuri – 55 µg/mL (GVEtOH – 70,2% vs GvEtOH - 77,8%) (Figura 3).

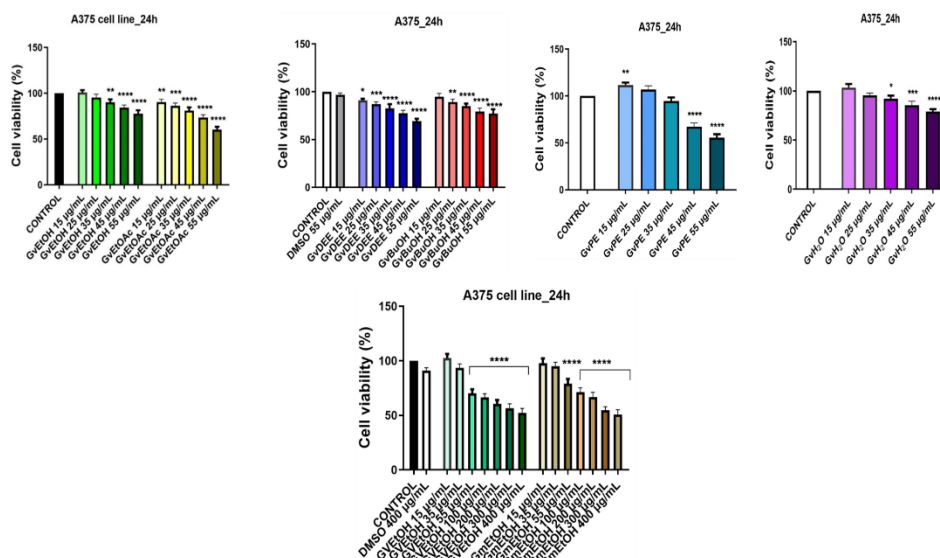


Figura 3. Procentul de viabilitate al celulelor A375 după stimularea cu extractele de *G. verum* și *G. mollugo* L. la 24 de ore post-stimulare.

Extractele nu au produs modificări semnificative în morfologia celulară a HaCaT, celulele rămânând similare cu celulele martor netratate și nu au avut niciun impact negativ asupra aderenței sau confluenței celulelor până la concentrația de 55 µg/mL.

În cazul celulelor tumorale au fost vizibile modificări de formă și confluență, în funcție de extract și de concentrația testată. La cea mai mare concentrație testată, forma lor a devenit rotundă și s-a micșorat. S-au observat mai multe semne de moarte celulară, celulele au devenit stresate, s-au desprins de pe placă și confluența a scăzut. Mai mult, au fost evidente semne de apoptoză celulară, cu condensare nucleară și apariția de corpi apoptotici la 55 µg/mL.

În ceea ce privește celulele de melanom murin, s-a observat că GVEtOH are o acțiune citotoxică mai puternică pe linia celulară B164A5 decât pe A375. De asemenea, până la concentrația de 200 $\mu\text{g/mL}$, GVEtOH a demonstrat un efect inhibitor mai semnificativ asupra celulelor B164A5 decât extractul GmEtOH, dar odată cu creșterea concentrației, GmEtOH devine mai citotoxic. La concentrația de 15 $\mu\text{g/mL}$, nu se observă celule care au suferit modificări, ci doar o scădere ușoară a confluentei pentru GmEtOH. La doza de 55 $\mu\text{g/mL}$, confluența scade vizibil, mai ales pentru extractul GVEtOH, urmând aceeași cale la concentrațiile de 200 și 400 $\mu\text{g/mL}$. La cele mai mari concentrații se observă modificări celulare, celulele alungite devin mai rotunjite și se desprind de pe placă. Mai mult, în urma testului Hoechst, putem observa la 55 $\mu\text{g/mL}$ că forma nucleului se modifică și începe să nu mai aibă un aspect normal. La 200 $\mu\text{g/mL}$, se văd semne pro-apoptotice, cum ar fi condensarea cromatinei. De asemenea, este expusă o ușoară dezintegrare a nucleului observată prin membrane în valuri. Pe măsură ce doza crește, aceeași tendință continuă, și sunt afectați mai mulți nuclei, cu semne apoptotice mai proeminente.

3.4. EVALUAREA *IN OVO* A EXTRACTELOR DE *GALIUM VERUM* L. ȘI *GALIUM MOLLUGO* L.

Evaluarea GVEtOH și GmEtOH la concentrații de 400 $\mu\text{g/mL}$ pe membranele corioalantoice în curs de dezvoltare a fost luată în considerare în timpul unei perioade de creștere rapidă a ramificării vaselor, pentru a estima efectul inhibitor potențial asupra procesului angiogenic. După 24 de ore de la inocularea extractelor, observarea membranelor în curs de dezvoltare a indicat un proces angiogen normal, intens pentru această perioadă de administrare, fără semne de diminuare a modelului de ramificare a vaselor (Figure 4).

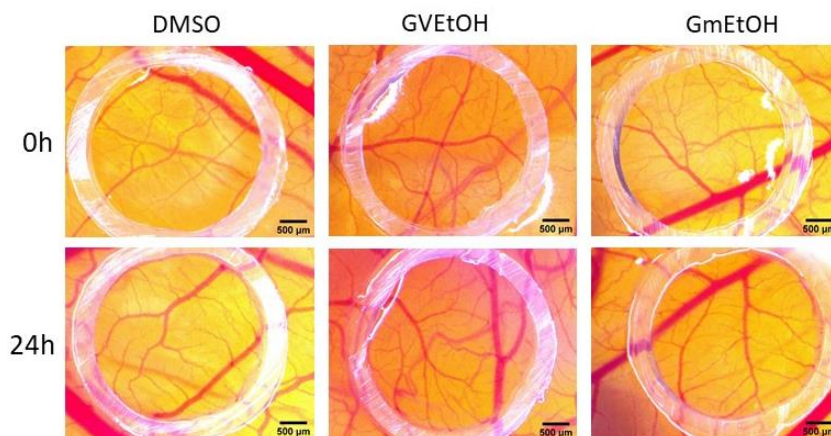


Figura 4. Efectele extractelor GVEtOH și GmEtOH asupra angiogenezei normale.

Ambele extracte de *Galium* sp. au fost evaluate la concentrația de 400 $\mu\text{g/mL}$ pentru potențiala iritabilitate față de țesuturile epiteliale, utilizând testul HET-CAM. Pe membrana corioalantoidă nu a fost înregistrat niciun semn de toxicitate în ceea ce privește hemoragia, liza vasculară și coagulabilitatea, comparativ cu controlul pozitiv, SDS, care a indus un puternic efect iritant.

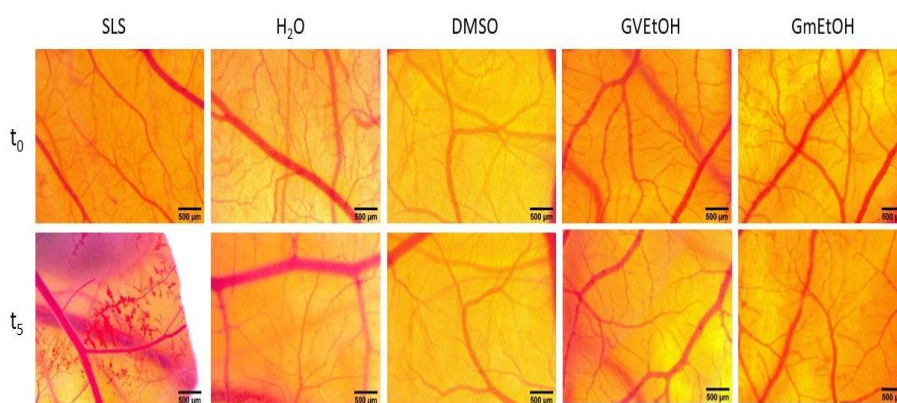


Figure 5. Imagini stereomicroscopice ale metodei HET-CAM care ilustrează efectul inițial (t_0) și la 5 min (t_5) după aplicarea probelor: control negativ (H_2O), control pozitiv (SDS) și extractele de *Galium* sp. (GVEtOH și GmEtOH)

4. CONCLUZII

În urma analizelor, putem afirma că extractele au activitate antioxidantă, antimicrobiană și citotoxică, fiind un posibil candidat pentru terapia melanomului. Cu toate acestea, sunt necesare investigații suplimentare ale extractelor și fitocompușilor acestora pentru a stabili în detaliu mecanismul de acțiune care stă la baza acestui efect citotoxic.

Noutatea studiului constă în faptul că, deși *Galium verum* L. a demonstrat un important potențial antitumoral pe diferite linii celulare canceroase, eficacitatea acestuia în cancerul de piele nu a fost încă stabilită și, mai mult, *Galium mollugo* L. nu a fost încă studiat în ceea ce privește acțiunea sa anticanceroasă. Considerăm că rezultatele obținute în studiul de față vor completa lipsa de informații din literatura de specialitate.