

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

LOMBREA C.F. ADELINA-ELENA



REZUMAT

**EVALUAREA *IN VITRO* A POTENȚIALULUI
ANTICANCEROS ȘI A
MECANISMULUI DE ACȚIUNE PENTRU DERIVAȚI DE ACID
BETULONIC**

Conducător de doctorat

Prov. Univ. Dr. Danciu Corina

**Timișoara
2024**

CUPRINS

1.INTRODUCERE	3
2.SCOP ȘI CONTRIBUȚII	4
3.Rezultate	5
3.1 SINTEZA CHIMICĂ ȘI CARACTERIZAREA DERIVAȚILOR SEMISINTETICI AI ACIDULUI BETULINIC	5
3.2. EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR ANTIMICROBIENE ȘI ANTIFUNGICE ALE DERIVAȚILOR SEMISINTETICE DE ACID BETULINIC	6
3.3. TESTE DE EVALUARE <i>IN VITRO</i> : EVALUAREA EFECTULUI ANTIPROLIFERATIV ȘI SELECTIV A COMPUȘILOR BA1-BA4 ȘI BI FOLOSIND LINII DE CELULE DE MELANOM (B164A5 ȘI A375) ÎN COMPARAȚIE CU KERATINOCITELE UMANE (HaCaT)	6
3.4. EVALUAREA POTENȚIALULUI CITOTOXIC AL BA1, BA2, BA3, BA4 ȘI BI PRIN UTILIZAREA TESTULUI LACTAT DEHIDROGENAZĂ (LDH)	7
3.5. EVALUAREA EFECTULUI ANTI-MIGRATOR AL BA1, BA2, BA3, BA4 ȘI BI PRIN UTILIZAREA TESTULUI SCRATCH.....	7
3.6. DETERMINAREA EFECTELOR CITOTOXICE ALE BA1, BA2, BA3, BA4 ȘI BI FOLOSIND TESTUL ROȘU NEUTRU (NR)	8
3.7. DETECȚIA POTENȚIALULUI PRO-APOPTOTIC AL BA1-BA4 ȘI BI PRIN UTILIZAREA COLORAȚIEI HOECHST 3342	8
4.CONCLUZII	8

1. INTRODUCERE

De-a lungul istoriei, remediile pe bază de plante au jucat un rol vital în combaterea bolilor, formând baza multor tratamente medicinale moderne. Astăzi, plantele medicinale sunt procesate în diferite forme, cum ar fi extracte totale, extracte standardizate, compuși puri izolați sau molecule modificate chimic, contribuind în mod semnificativ la fitoterapia modernă. Fitocompușii, derivați din plante, prezintă o gamă largă de activități farmacologice și sunt utilizați pe scară largă atât în prevenirea, cât și în tratamentul diferitelor boli, inclusiv boli infecțioase, afecțiuni cardiovasculare, diabet și cancer. Acești compuși pe bază de plante au un potențial mare în dezvoltarea de noi medicamente mai eficiente prin modificări structurale, oferind o biodisponibilitate și o activitate biologică îmbunătățită.

Dintre acești fitocompuși, triterpenele se remarcă prin importanța lor farmacologică. Au fost identificate peste 20.000 de triterpene, care se încadrează în principal în două categorii: triterpene tetraciclice și pentaciclice. Triterpenele pentaciclice (PT), sunt recunoscute pentru activitatea lor biologică, cu subtipuri notabile, inclusiv structuri de tipul lupan, olean și ursan. Compușii bioactivi cheie din această clasă includ lupeol, betulina, acidul betulinic, acidul betulonic, acidul oleanolic, acidul maslinic și acidul ursolic. Acești compuși posedă o serie de proprietăți terapeutice, inclusiv activități antiinflamatorii, antimicrobiene, antivirale și anticanceroase, printre altele.

Acidul betulinic (BI), o triterpenă pentaciclică de tip lupan, se găsește în plante precum mesteacănul și eucaliptul. Acest compus a atras o atenție semnificativă pentru diversele sale acțiuni biologice, în special pentru proprietățile sale anticancerigene. BI prezintă citotoxicitate specifică împotriva celulelor tumorale, făcându-l un candidat promițător pentru tratamentul cancerului. Acidul betulonic, o altă triterpenă de tip lupan, se găsește în diferite specii de plante și posedă o gamă similară de efecte terapeutice, inclusiv proprietăți antiinflamatorii, antioxidante, antivirale și anticancerigene. Acidul betulonic este, de asemenea, utilizat ca precursor pentru derivații semisintetici, având ca scop îmbunătățirea solubilității în apă și creșterea eficacității biologice.

Cercetări recente au arătat că atât acidul betulinic, cât și acidul betulonic oferă un potențial semnificativ ca și compuși părinți pentru dezvoltarea de noi medicamente mai puternice, în special pentru tratamentul cancerului. Cercetătorii se concentrează pe îmbunătățirea solubilității în apă a acestor compuși prin modificări chimice, cu scopul de a dezvolta terapii anticanceroase mai eficiente.

La scară globală, cancerul rămâne principala cauză de deces, iar incidența bolii este estimată să crească cu 70% în următoarele două decenii. Una dintre cele mai agresive forme de cancer este melanomul malign, care are o rată mare de mortalitate. Deși progresele recente în terapiile anticanceroase au îmbunătățit rezultatele tratamentului, este încă nevoie de noi abordări. Compușii naturali derivați din plante, cum ar fi triterpenoidele pentaciclice rămân o sursă cheie de noi agenți anticanceroși, fiind promițătoare pentru dezvoltarea de noi medicamente.

2. SCOP ȘI CONTRIBUȚII

Scopul acestei teze de doctorat a fost acela de a sintetiza patru derivați chimici, doi dintre ei fiind nou sintetizați și de a stabili modul în care fragmentul indol fuzionat la poziția C-2/C-3 a acidului betulonic și a lanțului peptidic la grupul său carboxilic (C-28) influențează citotoxicitatea acestuia asupra liniilor celulare de melanomului murin și uman. Este important de menționat că niciunul dintre cei patru derivați nu au mai fost supuși screening-ului anticanceros împotriva acestor linii celulare de melanom (B164A5 și A375).

Partea inițială a acestei teze prezintă date cele mai recente din literatura științifică privind plantele medicinale, istoria lor, fitoterapie, cadre de reglementare, medicamente aprobate și proprietăți anticancerigene. Se discută, de asemenea, triterpenele pentaciclice precum betulina, acidul betulinic și acidul betulonic, evidențiind derivatizarea chimică și derivații lor chimici aferenți cu potențial anticanceros.

Contribuția personală a inclus, în primul rând, sinteza a doi derivați semisintetici noi: N-(2,3-indolo-betulinoil)diglicilglicină (BA1) și N-(2,3-indolo-betulinoil)glicilglicină (BA2), folosind acid betulonic ca și compus de bază. În plus, au fost obținuți și compușii semisintetici N-(2,3-indolo-betulinoil)glicină (BA3) și acid 2,3-indolo-betulinic (BA4), care au fost anterior sintetizați și caracterizați, pentru a fi evaluați *in vitro*, pentru potențialul antitumoral împreună cu noile molecule sintetizate. Ulterior, caracterizarea structurală a compușilor a fost validată prin aplicarea tehnicilor de spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (RMN) ¹H, ¹³C, 2D-HC-HSQC și spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).

Etapă ulterioară a fost evaluarea activității *in vitro* a derivaților semisintetici ai acidului betulinic. Activitatea antimicrobiană *in vitro* a acidului betulinic (BI) și acidului 2,3-indolo-betulinic și a derivaților săi a fost determinată pe tulpini bacteriene Gram-pozitive și Gram-negative, precum și *Candida* spp. Mai mult, obiectivul final a fost evaluarea impactului dimensiunii catenei laterale al glicinei asupra activităților antiproliferative, citotoxice, anti-migratoare și asupra modificărilor nucleare asupra liniilor celulare de melanom murin B164A5

și uman A375. Spre deosebire de derivații raportați în literatura de specialitate, BA1 și BA2 se diferențiază prin faptul că posedă două și, respectiv, trei fragmente de glicină. Ca etalon de referință, a fost folosit acidul betulinic. În plus, al treilea obiectiv al studiului a fost de a determina efectul compușilor testați (BI și BA1-BA4) în ceea ce privește selectivitatea lor față de celulele canceroase în comparație cu linia celulară de keratinocite umane HaCaT.

În plus, experimentele menționate au folosit cele mai recente metodologii avizate de comunitatea științifică pe linia experimentală aleasă, precum: tehnica 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT), testul lactat dehidrogenazei (LDH), testul roșu neutru (NR), testul Scratch și colorația cu Hoechst 3342.

3. Rezultate

3.1 SINTEZA CHIMICĂ ȘI CARACTERIZAREA DERIVAȚILOR SEMISINTETICI AI ACIDULUI BETULINIC

Sinteza celor doi compuși ai acidului betulinic nou sintetizați a fost realizată eficient prin utilizarea acidului betulonic ca sursă inițială. Derivații nou sintetizați BA1 și BA2 au avut un randament de peste 90%, cu toate acestea BA3 și BA4 au prezentat un randament de peste 70%. Caracterizarea structurală a compușilor a fost confirmată folosind metodele spectroscopice ^1H , ^{13}C , 2D-HC-HSQC RMN și FT-IR.

3.2. EVALUAREA PROPRIETĂȚILOR ANTIMICROBIENE ȘI ANTIFUNGICE ALE DERIVAȚILOR SEMISINTETICE DE ACID BETULINIC

Streptococcus pyogenes ATCC 19615, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC 10231 și *Candida parapsilosis* ATCC 22019 au fost microorganismele utilizate pentru acest studiu. Activitatea antimicrobiană a fost evaluată folosind două tehnici: disc-difuzimetică și metoda diluției. Compușii BA2, BA3 și BA4 au demonstrat activitate antibacteriană împotriva *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cu valori ale concentrației minime inhibitory (CIM) în intervalul 13-16 $\mu\text{g/mL}$ și, respectiv, 26-32 $\mu\text{g/mL}$. În schimb, acidul betulinic a fost inactiv împotriva tuturor tulpinilor microbiene. Pe de altă parte, a fost găsită activitate antifungică față de *Candida albicans* ATCC 10231 și *Candida parapsilosis* ATCC 22019 pentru compusul BA3 cu CIM 29 $\mu\text{g/mL}$.

3.3. TESTE DE EVALUARE *IN VITRO*: EVALUAREA EFECTULUI ANTIPROLIFERATIV ȘI SELECTIV A COMPUȘILOR BA1-BA4 ȘI BI FOLOSIND LINII DE CELULE DE MELANOM (B164A5 ȘI A375) ÎN COMPARAȚIE CU KERATINOCITELE UMANE (HaCaT)

Folosind testul MTT, s-a demonstrat că toți compușii testați au exercitat un potențial antiproliferativ în cazul ambelor linii de celule canceroase studiate (B164A5 și A375), într-o manieră dependentă de doză, BA1 și BA3 demonstrând cele mai pronunțate efecte antiproliferative.

În ceea ce privește linia celulară de melanom murin B164A5, rezultatele indică faptul că BA3 și BA2 prezintă cel mai potent efect antiproliferativ, cu reduceri semnificative ale viabilității celulare la concentrații scăzute și valorile IC_{50} de 8,1 μM și, respectiv, 9,1 μM . În ceea ce privește efectele antiproliferative asupra liniei celulare de melanom uman A375, noii compuși BA1 ($IC_{50} = 5,7 \mu M$) și BA2 ($IC_{50} = 10,0 \mu M$) au fost de trei ori, respectiv de două ori mai activi decât compusul părinte BA4 și BI. Mai mult, datele obținute au evidențiat că derivații acidului 2,3-indolo-betulinic au prezentat citotoxicitate selectivă față de celulele melanomice în comparație cu keratinocitele umane. În timp ce compușii au redus semnificativ viabilitatea celulelor B164A5 și A375, impactul lor asupra keratinocitelor HaCaT a fost limitat, în special la concentrații sub 25 μM , unde nu au fost observate efecte semnificative.

3.4. EVALUAREA POTENȚIALULUI CITOTOXIC AL BA1, BA2, BA3, BA4 ȘI BI PRIN UTILIZAREA TESTULUI LACTAT DEHIDROGENAZĂ (LDH)

Testul de eliberare a LDH a arătat că activitatea citotoxică a compușilor testați a fost dependentă de concentrație asupra ambelor linii celulare testate (B164A5 și A375). În ceea ce privește linia celulară B164A5, BA2 și BA3 au cauzat cea mai mare eliberare de LDH, cu 62,14% și, respectiv, 80,68%, la o concentrație de 75 μM . Acest lucru sugerează o pierdere semnificativă a integrității membranei celulare în aceste celule. Studiul a confirmat, de asemenea, o tendință similară în celulele A375, unde BA1 a cauzat cea mai substanțială eliberare de LDH la 59,3%, la cea mai mare concentrație de 75 μM , în timp ce BI a provocat o eliberare de 50,2% (Figura 4). La concentrații mai mici (25 μM), BA2, BA3 și BA4 au prezentat o citotoxicitate mai mare față de celulele A375 în comparație cu concentrații mai mari. La o concentrație de 75 μM , efectele citotoxice au scăzut ușor, indicând un profil unic de citotoxicitate. Acest fenomen ar putea fi legat de mecanismele de oprire a ciclului celular, în care capacitatea proliferativă scade și limitează eliberarea ulterioară de LDH.

3.5. EVALUAREA EFECTULUI ANTI-MIGRATOR AL BA1, BA2, BA3, BA4 ȘI BI PRIN UTILIZAREA TESTULUI SCRATCH

Testul Scratch a fost utilizat pentru a evalua potențialul anti-migrator al acidului betulinic și al derivaților săi pe ambele linii celulare de melanom (B164A5 și A375). Datorită potențialului metastatic ridicat al melanomului, inhibarea migrației celulare este crucială pentru evaluarea potențialelor efecte terapeutice. În cazul liniei celulare B164A5, BA2 (50 μ M) a prezentat cea mai mare inhibare a migrației, cu o rată de vindecare a rănilor de doar 10%, urmată de BA3 la 21,3%. În comparație, BI a inhibat migrația cu o rată de vindecare a rănilor de 34,9%. Aceste rezultate indică faptul că BA2 și BA3 au redus cel mai eficient capacitatea de migrare a celulelor B164A5.

În mod similar, în cazul liniei celulare A375, derivații au împiedicat semnificativ migrarea, în special la concentrații de 25 μ M și 50 μ M. BI (25 μ M) a inhibat migrarea cu 17,5%, în timp ce BA1 și BA2 (50 μ M) au prezentat efecte anti-migratoare puternice, determinând o rată de vindecare a rănilor de 35% și, respectiv, 30%. BA4 a prezentat cea mai slabă inhibare a migrației, care corespundea profilului său citotoxic mai scăzut. În cazul ambelor linii celulare, inhibarea migrației a fost dependentă de concentrație.

După tratamentul cu derivații semisintetici, celulele au prezentat caracteristici apoptotice, inclusiv modificări morfologice și dezintegrare, susținând în continuare efectele citotoxice ale compușilor. Acest lucru a fost evident vizual atât în celulele B164A5, cât și în celulele A375, în special după 24 de ore de expunere la compuși.

3.6. DETERMINAREA EFECTELOR CITOTOXICE ALE BA1, BA2, BA3, BA4 ȘI BI FOLOSIND TESTUL ROȘU NEUTRU (NR)

Acest studiu a folosit testul de absorbție al roșului neutru (NR) pentru a măsura efectele citotoxice ale BA1, BA2, BA3, BA4 și BI - asupra liniei celulare de melanom murin B164A5. Testul a confirmat faptul că afectarea lizozomală a fost de natură dependentă de doză cauzată de BI și de derivații acidului betulinic. Leziunile lizozomale și efectele citotoxice ulterioare au fost cele mai pronunțate în cazul BA1, urmat de BA2 și BA3, indicând o clasare clară a potenței citotoxice între compușii testați. BA1 a prezentat cel mai puternic răspuns citotoxic, înregistrând un nivel de citotoxicitate de 77,5% la o concentrație de 75 μ M după 72 de ore de expunere. BA2 și BA3 au demonstrat, de asemenea, efecte citotoxice substanțiale, cu niveluri de citotoxicitate de 69,9% și, respectiv, 64,2%, la aceeași concentrație și timp de expunere.

3.7. DETECȚIA POTENȚIALULUI PRO-APOPTOTIC AL BA1-BA4 ȘI BI PRIN UTILIZAREA COLORAȚIEI HOECHST 3342

Prezentul studiu și-a propus să evalueze efectele pro-apoptotice și citotoxice ale derivaților acidului indolo-betulinic (BA1, BA2, BA3, BA4) și acidului betulinic (BI) asupra liniei

celulare de melanom murin B164A5. Folosind colorarea Hoechst 33342, efectele la nivel nuclear ale acestor compuși la concentrații de 25, 50 și 75 μM au fost evaluate după o perioadă de tratament de 24 de ore. Colorația a evidențiat modificări nucleare apoptotice și necrotice, amplasarea acestor modificări variind între compușii și concentrațiile testate. BA2 a indus apoptoza la concentrații de 50 și 75 μM , în timp ce BA3 a prezentat cea mai mare citotoxicitate, inducând necroză la concentrația cea mai scăzută (25 μM). BA1 a declanșat apoptoza doar la o concentrație de 75 μM , în timp ce BI și BA4 au provocat necroză la 50 μM . Aceste constatări au fost în concordanță cu testele anterioare de viabilitate celulară (MTT), care au demonstrat o viabilitate redusă la aceste concentrații. Rezultatele sugerează un efect anti-melanom puternic al BA3, BA2 și BA1, BA3 prezentând cea mai puternică activitate pro-necrotică.

4. CONCLUZII

În urma testelor realizate, derivații semisintetici au demonstrat proprietăți anti-melanom și antimicrobiene superioare în comparație cu acidul betulinic, Atașarea unui heterociclu de indol la poziția C2 a acidului betulinic a îmbunătățit efectele sale antiproliferative, citotoxice, anti-migratoare și de alterare nucleară asupra liniilor celulare de melanom, precum și a îmbunătățit capacitățile sale antibacteriene. Mai mult, citotoxicitatea compușilor a fost mai pronunțată prin conjugarea grupării lor carboxilice cu un rest de aminoacid. Rezultatele indică faptul că BA1, BA2 și BA3 pot servi ca potențiali candidați pentru tratamentul melanomului.

Bineînțeles, sunt necesare cercetări suplimentare ale compușilor pentru a elucida mecanismul de acțiune responsabil pentru aceste efecte citotoxice.