

TEZA DE DOCTORAT

Cercetări privind obținerea, caracterizarea și valorificarea unor extracte de *Artemisia* spp. în scop fitoterapeutic

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Maria-Evelina Bordean**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Matei-Marcel Duda**



INTRODUCERE

Utilizarea plantelor în tratarea diferitelor afecțiuni, atât ale oamenilor cât și ale animalelor, reprezintă o practică la fel de veche ca și existența umană în sine. În prezent, cercetarea asupra plantelor a crescut la nivel global, iar studiile efectuate arată potențialul imens al plantelor medicinale utilizate în diverse sisteme tradiționale.

Urgența pentru producția în masă și utilizarea optimizată a metaboliților secundari din plante s-a intensificat, în special în contextul apariției bolilor în urma pandemiei de COVID-19. Progresele revoluționare în genomica și biotehnologii au deschis o nouă eră în cercetare, modificând înțelegerea noastră despre biosinteză, reglare și manipulare a moleculelor bioactive din plantele medicinale (SHI și colab., 2024).

Incidența și rata mortalității provocate de cancer cresc în întreaga lume. Costurile ridicate, efectele secundare și rezistența la medicamente asociate cu tratamentul cancerului au încurajat oamenii de știință să investească în cercetarea de noi medicamente antitumorale pe bază de plante medicinale. Acestea conțin compuși bioactivi care acționează ca agenți antitumorali cu efecte secundare și toxicitate favorabile în comparație cu agenții chimioterapeutici convenționali (ADICO și colab., 2024).

Căutarea și dezvoltarea medicamentelor din plante au fost priorități importante în știință de-a lungul secolelor, iar speciile de *Artemisia* au captat atenția cercetătorilor în ultimii ani datorită compoziției lor chimice și activității biologice. Un punct de referință în această direcție științifică a fost descoperirea artemisininei, un agent antimalaric, de către savanta chineză Youyou Tu, laureată a Premiului Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 2015. Sursa acestui medicament a fost *A. annua* L., cunoscută de mult timp în medicina populară chineză (SHARIFI-RAD și colab., 2022).

Cercetările farmacologice moderne s-au concentrat pe validarea și elucidarea mecanismelor care stau la baza activităților descrise anterior. Recent s-a demonstrat că extractele de *Artemisia* spp. prezintă o gamă largă de activități biologice. *A. absinthium* L. a atras atenția în cercetare, fiindcă a fost dovedit că deține proprietăți hepatoprotectoare, neuroprotectoare, antidepresive, citotoxice și stimulative ale digestiei (HESHMATI AFSHAR și colab, 2021; HAMDOON, 2022; ABDEL-GWAD și colab., 2022).

Plantele medicinale constituie un patrimoniu local important, însă relevanța lor este globală. Astăzi, fitofarmacologia se bazează și pe speciile *Artemisia*, ale căror aplicații medicinale și aromatice au o semnificație istorică, având utilizări variate în medicină, cosmetologie și industria alimentară.

Cuvinte cheie: *Artemisia absinthium* L., *Artemisia annua* L., efect antibacterian, celule tumorale, migrare, Nrf2, apoptoză.

STRUCTURA LUCRĂRII

Prima parte a tezei, STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII, cuprinde 3 capitole.

Capitolul 1. *Artemisia absinthium* L. - chintesența proverbială a amărăciunii cuprinde în 3 subcapitole aspecte legate de caracteristicile generale ale plantei, compoziția chimică și activitatea biologică a plantei.

Capitolul 2. *Artemisia annua* L. - remediul natural recunoscut oficial de Premiul Nobel. este structurat în trei subcapitole care descriu *Artemisia annua* L., punând în discuție caracteristicile generale ale acestei specii, aspecte morfologice, compoziția chimică și activitățile biologice.

Capitolul 3. *Artemisia* spp. în managementul cancerului, cuprinde patru subcapitole, întregul capitol făcând referire la bolile neoplazice, la fitocompușii din plante priviți ca posibili candidați în terapia bolilor neoplazice și la mecanismele de acțiune ale agenților antitumorali.

Partea a doua, CONTRIBUȚIA PERSONALĂ, este structurată pe 5 capitole și bibliografia.

Capitolul 4. Scopul, obiectivele și design-ul experimental descrie scopul, lucrării și principalele direcții de cercetare abordate. Scopul cercetărilor constă în cuantificarea, caracterizarea și efectele biologice ale unor extracte etanolice de *Artemisia* spp, în vederea selectării unui extract cu efect antitumoral.

În ceea ce privește evaluarea posibilităților de valorificare a compușilor bioactivi din *Artemisia* spp., s-au abordat trei direcții majore de cercetare, cu obiectivele individualizate:

I. Studiul extractelor etanolice de *Artemisia* spp. sub aspect compozițional a unor compuși biologic activi de interes.

01.1. Identificarea și cuantificarea conținutului total de compuși fenolici (TPC);

01.2. Evaluarea activității antioxidante (ABTS și DPPH);

01.3. Determinarea cantitativă a compușilor fenolici (HPLC).

II. Studiul activității fitochimice și antibacteriene a extractelor etanolice de *Artemisia* spp.

02.1. Evaluarea activității antibacteriene a extractelor etanolice de *Artemisia* spp. asupra unor tulpini bacteriene standardizate: Determinarea valorilor MIC și MBC;

02.2. Efectele antibacteriene ale extractelor etanolice de *Artemisia* spp. asupra a 15 tulpini de bacili gram negativi multiplu rezistenți, izolate din spital.

III. Studiul efectului antitumoral *in vitro* a extractelor etanolice de *Artemisia* spp.

03.1. Evaluarea efectelor extractelor asupra viabilitatii celulelor de melanom și de cancer colorectal;

03.1.1. Defalcarea între efectul alcoolului conținut în extracte și efectul alcoolului administrat la concentrații similare extractelor în diferitele diluții;

03.1.2. Obținerea valorilor IC₅₀;

03.2. Evaluarea efectelor extractelor asupra capacității de migrare și metastazare a celulelor tumorale;

03.3. Analizarea mecanismelor de acțiune ale extractelor asupra celulelor tumorale;

03.3.1. Studiul efectelor stresului oxidativ indus de extracte cu evaluarea sistemelor antioxidante celulare;

03.3.2. Evaluarea inducerii morții celulare programate (apoptoza).

Tot în acest capitol este prezentat materialul organic, speciile de pelin și peliniță, provenite din flora spontană: *Artemisia absinthium* L. și *Atemisia annua* L., din proximitatea orașului Blaj, jud. Alba, România. Modelul experimental general abordat include atât partea de caracterizare a extractelor etanolice din plantă, cât și aplicabilitatea fitoterapeutică a acestor extracte, care în urma profilului biochimic testat, întrunește toate atributele unui răspuns pozitiv în tratarea celulelor tumorale.

Capitolul 5. Materialele și metodele, este structurat pe 8 subcapitole, ce corespund direcțiilor de cercetare stabilite, cu prezentarea materialelor și metodelor de lucru aplicate, și anume: metode experimentale utilizate în determinarea claselor de compuși biochimici din diferite *Artemisia* spp., *A. absinthium* L. și *A. annua* L. (indici ai proprietăților antioxidante – determinarea și cuantificarea conținutului total de polifenoli și flavonoide, determinarea capacității antioxidante), metode de determinare a activității antibacteriene (MIC și MBC) și metode experimentale utilizate în evaluarea efectului antitumoral (liniile tumorale B16F10, DLD-1 și HCT116) *in vitro* a extractelor etanolice de *Artemisia* spp. Protocolul de lucru este prezentat în Fig. 1.

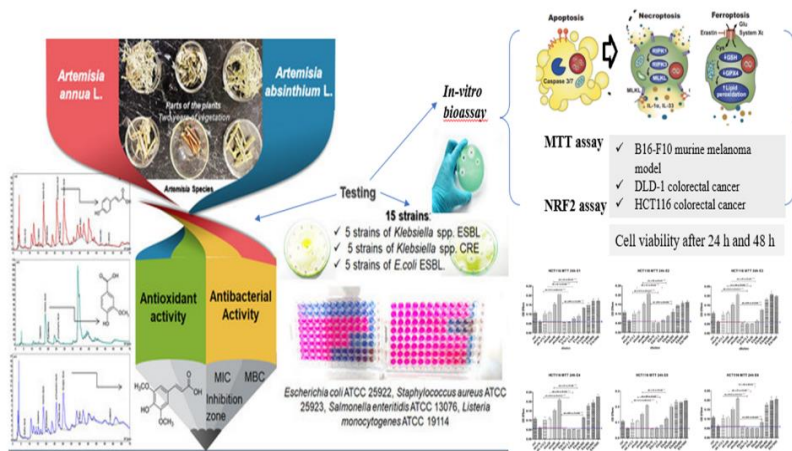


Fig. 1. Protocolul experimental al studiului activității fitochimice, antibacteriene și citotoxice a extractelor de *Artemisia* spp.

Capitolul 6. Rezultatele și discuțiile, elaborate în urma determinărilor realizate sunt structurate pe cele trei direcții de cercetare.

Rezultatele și discuțiile pentru direcția I de cercetare

Cuantificarea polifenolilor totali, prin analiza spectroscopică UV-VIS, denotă următoarele aspecte: partea morfologică a plantei și specia au influențat conținutul total de compuși fenolici din extractele de pelin și peliniță studiate. În ceea ce privește specia, *A. absinthium* L. a înregistrat cel mai ridicat conținut de compuși fenolici, cu extractul din frunze având un conținut superior față de cel din tulpină. Acidul sinapic a fost prezent în cantități semnificative în extractele de frunze și tulpini de *A. annua* L. În toate eșantioanele de frunze cu extract de etanol, acidul vanilic a fost detectat în cantități semnificative.

Rezultatele și discuțiile pentru direcția a II-a de cercetare

Au fost testate următoarele tulpini standard: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 și *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, alături de alte 15 tulpini multiplu rezistente izolate din spital: *Klebsiella spp.* ESBL, *Klebsiella spp.* CRE și *E. coli* ESBL.

Extractul etanolic din frunza de *A. annua* L. a prezentat activitate antibacteriană împotriva tuturor tulpinilor bacteriene testate. MIC a extractului etanolic de AnL a variat de la $<2,00 \pm 0,014$ mg/ml (împotriva *S. aureus* ATCC 25923) la $375,00 \pm 0,014$ mg/ml AbS1 (împotriva *E. coli* ATCC 25922 și *S. enteritidis* ATCC 25922 și *S. enteritidis* ATCC 25923). MBC-ul extractului etanolic de *A. annua* L. a variat de la $5,00 \pm 0,014$ mg/ml (împotriva *S. aureus* ATCC 25923 și *L. monocytogenes* ATCC 19114) până la $375,00 \pm 0,014$ mg/ml AbS1 (împotriva *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. enteritidis* ATCC 13076, and *L. monocytogenes* ATCC 19114). AnL, AbL1 și AbS1 din primul an de recoltare au avut activitate semnificativă împotriva *Klebsiella* ESBL ($10,863 \pm 0,308$ mm pentru AnL; $10,110 \pm 1,68$ mm pentru AbL1; $11,246 \pm 1,71$ mm pentru AbS1). O activitate antibacteriană semnificativă împotriva *Klebsiella* CRE a fost identificată în probele de *A. annua* L., atât în frunză cât și în tulpină, acid sinapic fiind majoritar în ambele extracte ($12,756 \pm 0,993$ mm pentru AnL; $9,843 \pm 0,945$ mm pentru AnS). Extractele AnL și AnS au au cel mai puternic efect împotriva *E. coli* ESBL ($8,610 \pm 1,861$ mm, respectiv $5,67 \pm 0,682$ mm).

Rezultatele și discuțiile pentru direcția a III-a de cercetare

Rezultatele și discuțiile privind evaluarea efectelor extractelor asupra viabilității celulelor de melanom și de cancer colorectal

S-a realizat o sinteză comparativă a datelor obținute la calculul IC₅₀ pentru cele 3 linii tumorale în funcție de fiecare extract. În asamblu, cele mai mari valori IC₅₀ au fost observate pentru linia DLD-1 (extractele AnL2, AnS2, AnF2, AbL2 și AbF2), sugerând o rezistență crescută la aceste tratamente. Cea mai sensibilă linie s-a dovedit linia de cancer colorectal HCT116.

În studiul nostru cea mai sensibilă linie a fost HCT116 la extractele alcoolice de *A. absinthium* L., valorile IC50 obținute fiind pentru AbL2 (0,384mg/ml) și AbF2 (0,297mg/ml), cu excepția extractului din tulpina Abs2, unde IC50 a fost de 1.831mg/ml, la testul de viabilitate MTT. Valori asemănătoare ale IC50 la 24h au fost raportate de NAZERI și colab., 2020, de 1204μl/ml (1,204mg/ml) ca răspuns la tratamentul celulelor HCT116 la extractul metanolic din frunze și tulpini.

Rezultatele și discuțiile privind evaluarea efectelor extractelor asupra capacității de migrare și metastazare a celulelor tumorale

Linia celulară de melanom murin prezintă o proliferare crescută. La testul de migrare, la 20 de ore se observă la celulele de control o reparare a liniei de scarificare în proporție de aproximativ 70%.

Celulele DLD-1 s-au caracterizat printr-o capacitate mai scăzută de migrare care nu au reușit repararea liniei de scarificare nici după 48 de ore.

Celulele HCT116 au prezentat un comportament diferit, cu o rată de migrare foarte scăzută a celulelor de control, atât la 20 ore, cât și la 48 de ore.

Rezultatele și discuțiile privind analizarea mecanismelor de acțiune ale extractelor asupra celulelor tumorale

Pentru a evalua expresia factorului de transcripție Nrf2, s-a efectuat o colorație imunocitochimică a celulelelor tumorale (celulele B16F10, DLD-1 și HCT 116).

În studiul nostru tratamentele cu extractele etanolice de *A. absinthium* L. și *A. annua* L. au indus diferite expresii ale proteinei NRF2 în funcție de linia celulară și tipul de extract. Celulele DLD-1 de carcinom de colon au prezentat o creștere intensă a NRF2 la toate extractele etanolice, celule care de altfel exprimau proteina și fără tratamente, dar la nivele mai scăzute. Celulele DLD-1 au prezentat și cele mai mici procente de celule apoptotice post-terapie dintre liniile testate, cu mențiunea că, pentru extractele de *A. annua* L. (AnL2, AnS2 și AnF2), dar și pentru AbL2 procente de celule necrotice au fost mai crescute (10-13% și cel mai crescut a fost pentru AnL2, de 31%). Aceste date sugerează inducerea unui alt tip de moarte celulară (feroptoza sau necroptoza), posibil prin intermediul artesunatului care utilizează fierul pentru generarea radicalilor liberi. Expresia NRF2 crescută poate fi un indicator al răspunsului celular de anihilare a stresului oxidativ indus de extractele de plante. Prin comparație, celulele HCT116 care au fost cele mai sensibile la extractele de plante în special cele derivate din *A. absinthium* L., dar și la AnL2, aceste celule au reactionat cu o usoară creștere a expresiei de NRF2 (difuză intracitoplasmatică). La aceste extracte, răspunsul celulelor HCT116 a fost dramatic, cu valorile cele mai crescute atât ale apoptozei (~10%), dar și valori procentuale mari de celule necrotice (51% pentru AnL2 și între 24-41% pentru *A. absinthium* L.).

Celulele de melanom murin au reacționat de asemenea la tratamentele cu extractele de plante în ceea ce privește sinteza de NRF2 pentru extractele din AnL2 (cel mai intens), O altă observație a fost o creștere a procentului de celule apoptotice (cea mai mare creștere dintre cele 3 linii testate), cu valori între 16-25%, cu excepția celulelor tratate cu extract de AnL2 care au prezentat un număr crescut de celule necrotice (24%).

Capitolul 7. Concluzii

Dirrecția de cercetare I

1. Partea morfologică a plantei și specia au influențat conținutul total de compuși fenolici al extractelor de *A. absinthium* L. și *A. annua* L.
2. Cele mai mari valori ale TPC au fost găsite în *A. absinthium* L. frunză (487,36±0,08 mg GAE/ml) și în *A. annua* L. frunză (518,09±0,01 mg GAE/ml). Extractele etanolice de frunze au avut TPC mai mare decât extractele etanolice din tulpini, indiferent de specie și anul de recoltare.
3. Cea mai mare valoare de compuși fenolici a fost obținută pentru eșantionul de frunze în al doilea an de recoltare. În ceea ce privește specia, *A. absinthium* L. a înregistrat cel mai mare conținut total de compuși fenolici, frunzele având o valoare superioară comparativ cu tulpina.
4. Acidul sinapic (acid 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamic) este cel mai reprezentativ acid hidroxicinamic fitochimic dintre compușii flavonoizi identificați.

Dirrecția de cercetare II

1. În ceea ce privește activitatea extractelor de pelin împotriva *S. aureus*, rezultatele au arătat că frunzele, bogate în compuși fenolici, au avut o activitate antibacteriană mai mare decât tulpina.
2. Specia *A. annua* L., bogată în compuși polifenolici, în special în frunze, a demonstrat activitate antibacteriană împotriva *Salmonella enteritidis*.
3. Din toate extractele de *Artemisia* studiate, frunzele și tulpinile de *A. annua* L. au prezentat o activitate semnificativă împotriva *Klebsiella* spp. CRE și *E. coli* spp. ESBL.
4. Cea mai bună activitate antibacteriană împotriva *L. monocytogenes* ATCC 19114 a fost găsită în *A. annua* L. frunză, cu CMI = 5,00±0,014 mg/ml și MBC = 5,00±0,014 mg/ml.

Dirrecția de cercetare III

1. Dozele medii inhibitorii IC50 au fost diferite pentru cele 3 linii celulare, linia HCT116 fiind mai sensibilă la doze mai scăzute de extracte etanolice.
2. Concluzii privind rezultatele testului de migrare 20 h:
 - a. migrarea a fost inhibată semnificativ pentru linia B16F10 (în ordine crescătoare AbF2 ► AbS2 ► AnL2 ► AnS2 ► AnF2 ► AbL2)

- b. migrarea a fost inhibată moderat pentru linia DLD-1 (migrare /reparare slabă și la control netratat 30%) (în ordine crescătoare AnS2 ► AbS2 ► AbL2 ► AnF2 ► AnL2 ► AbF2)
- c. migrarea a fost inhibată semnificativ pentru linia HCT116 (în ordine crescătoare AbL2 ► AbS2 ► AbF2 ► AnS2 ► AnF2 ► AnL2)
3. Concluzii privind rezultatele testului de migrare 48h:
 - a. migrarea a fost inhibată semnificativ pentru linia B16F10 (în ordine crescătoare AbF2 ► AbS2 ► AnL2 ► AnS2 ► AnF2 ► AbL2)
 - b. migrarea a fost inhibată foarte puțin pentru linia DLD-1 (migrare /reparare slabă și la control netratat 36%) (în ordine crescătoare AbF2 ► AnL2) și a fost peste valorile controlului pentru AnF2 (36%) ► AbS2 (36%) ► AnS2 (38%) ► AbL2 (48%)
 - c. migrarea a fost inhibată pentru linia HCT116 cu o rată de reparare slabă la control de 47% doar pentru tratamentele cu AbL2 (21%), AnL2 (25%), AbF2 (27%), AnF2 (28.7%) și a fost peste valorile controlului pentru AnS2 și AbS2.
4. Tratamentele cu extracte au indus expresia proteinei NRF2 în toate cele 3 linii celulare mai intens pentru extractele AnS2, AnF2, AbL2 și AbF2. De remarcat că la analiza HPLC aceste extracte au prezentat cele mai mari concentrații de compuși antioxidanți.
5. Tipul de moarte celulară indusă de tratamentele cu extracte:
 - a. **Apoptoza.** Extractele de *A. absinthium* L. (AbL2, AbS2 și AbF2) au indus cele mai mari rate de moarte celulară prin apoptoza (cu excepția liniei DLD-1). Rate mai crescute de celule pozitive pentru Annexin/propidium iodide au fost observate și pentru extractele de *A. annua* L. (AnS2 și AnF2) cu rezistența celulelor DLD-1 la extracte.
 - b. **Necroza celulară** a fost observată în proporții crescute mai ales pentru AnL2, AbL2 și AbS2 (doar pentru linia HCT116).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ABDEL-GWAD N.M., MAHMOUD E.A.M., AL-ASKALANY S.A., HANAFY E., 2022, Antioxidant, antibacterial and cytotoxic effect of *Cymbopogon citratus*, *Mentha longifolia*, and *Artemisia absinthium* essential oils, *Egyptian Journal of Chemistry*, 65, 2, 287-296.
2. ADICO M. D., BAYALA B., BUNAY J., BARON S., SIMPORE J., LOBACCARO J. M. A., 2024, Contribution of Sub-Saharan African Medicinal Plants to Cancer Research: Scientific Basis 2013-2023, *Pharmacological Research*, 202, 107138.
3. HAMDOON A. M., 2022, Phytochemical Analysis, Antioxidant Potential, and Cytotoxicity Evaluation of Traditionally Used *Artemisia absinthium* L (Wormwood) Growing in the Central Region of Saudi Arabia, *Plants*, 11, 8, 1028.
4. HESHMATI AFSHAR F., ZADEHKAMAND M., REZAEI Z., DELAZAR A., TARHRIZ V., ASGHARIAN P., 2021, Chemical compositions, antimicrobial effects, and cytotoxicity of Asia minor wormwood *Artemisia splendens* Willd growing in Iran, *BMC chemistry*, 15, 1, 33.
5. NAZERI M., MIRZAIE-ASL A., SAIDIJAM M., MORADI M., 2020, Methanolic extract of *Artemisia absinthium* L. prompts apoptosis, enhancing expression of Bax/Bcl-2 ratio, cell cycle arrest, caspase-3 activation and mitochondrial membrane potential destruction in human colorectal cancer HCT-116 cells, *Mol Biol Rep*, 47, 8831-8840.
6. SHARIFI-RAD J., HERRERA-BRAVO J., SEMWAL P., PAINULI S., BADONI H., EZZAT M. S., FARID M. M., MERGHANY R.M., ABOREHAB N. M., SALEM M. A., SEN S., ACHARYA K., LAPAVA NATALLIA, MARTORELL M., TYNBYBEKOV B., DANIELA CALINA, CHO W. C., 2022, *Artemisia* spp.: An Update on Its Chemical Composition, Pharmacological and Toxicological Profiles, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 5628601, 23.
7. SHI M., ZHANG S., ZHENG Z., MAOZ I., ZHANG L., KAI G, 2024, Molecular regulation of the key specialized metabolism pathways in medicinal plants, *Journal of Integrative Plant Biology*, 203