



Universitatea de Științe Agricole și Medicină

Veterinară Cluj Napoca

Școala Doctorală
Facultatea de Medicină Veterinară



SÁRPATAKI ORSOLYA

**EVALUAREA EFECTULUI ANTITUMORAL
AL EXTRACTELOR DE *VISCUM ALBUM* ȘI
*EUONYMUS EUROPAEUS IN VIVO ȘI IN
VITRO***

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

**Conducător științific:
Prof.Dr. Ioan Marcus**

INTRODUCERE

Creșterea tumorală a devenit o problemă de sănătate prioritară. Este una din cele mai studiate și cercetate teme fiind considerată boala deceniului. Ea decimează în continuare populația umană și animală, în ciuda faptului că metodele de investigare și de tratament avansează pe zi ce trece.

Statisticile actuale demonstrează faptul că boala canceroasă ocupă locul II în ceea ce privește mortalitatea în rândul oamenilor. Incidența acestei boli a crescut mult și în rândul animalelor de companie, mai ales în cazul canidelor.

Tratamentul curent în boala canceroasă constă în chimioterapie, radioterapie și ablația chirurgicală. Aceste tratamente sunt folosite individual sau în combinație, în funcție de tipul și stadiul evolutiv al tumorii.

Având în vedere cunoștințele îmbogățite, în ultimul timp, despre mecanismele intime ale creșterii tumorale, există un interes tot mai mare în găsirea de noi compuși cu efect antiproliferativ. Compuși care să ofere o alternativă pentru chimioterapicele folosite în mod curent sau care să vină în completarea acestora.

1. SCOPUL ȘI STRUCTURA TEZEI

Scopul acestui studiu constituie evaluarea proprietăților biologice și antiproliferative a două extracte alcoolice obținute din *Viscum album L.* și *Euonymus europeus* pe modele de studiu *in vitro* și *in vivo*.

Obiectivele majore ale cercetării au constat în:

1. investigarea efectelor biologice și antiproliferative al extractului de *Viscum album L.* pe modele experimentale *in vivo* și *in vitro*
2. caracterizarea extractului alcoolic de *Euonymus europeus*
3. investigarea efectelor biologice și antiproliferative a extractului alcoolic de *Euonymus europeus* pe modele de experimentale *in vivo* și *in vitro*.

Pentru realizarea primului obiectiv am efectuat următoarele experimente:

Experimentul 1: testarea toxicității extractului de vâsc administrat parenteral la șoarecii din linia Swiss

Experimentul 2: evaluarea eficienței antiproliferative a două preparate farmaceutice lichide extractive de vâsc

Experimentul 3: evaluarea eficienței extractului de vâsc în potențarea efectului antitumoral al Doxorubicinei

Experimentul 4 : evaluarea efectului preventiv și curativ al extractului de vâsc în cazul șoarecilor Swiss inoculați cu tumoră Ehrlich

Experimentul 5: evaluarea efectului antiproliferativ pe model experimental *in vitro* pe linii celulare normale (Hfl) și tumorale (HeLa)

Pentru realizarea obiectivului numărul trei am efectuat următoarele experimente:

Experimentul 1: determinarea nivelului de toxicitate al extractului administrat la șoarecii liniei Swiss pe cale orală și injectabilă

Experimentul 2: evaluarea efectului antiproliferativ al extractului administrat în trei doze diferite la șoarecii liniei Swiss inoculați cu tumoră ascitogenă Ehrlich

Experimentul 3: evaluarea efectului antiproliferativ pe model experimental *in vitro* pe linii celulare normale (HDFa) și tumorale (VM 35).

Teza este structurată în 8 capitole. Capitolele 1,2,3,4,5 reprezintă stadiul actual al cunoașterii referitor la controlul creșterii tumorale. Capitolul 6 descrie materialele și metodele generale folosite în experimente. Capitolul 7 conține rezultatele și concluziile referitoare la evaluarea extractului de *Viscum album*, iar capitolul 8 conține rezultatele și concluziile evaluării extractului de *Euonymus europaeus*.

2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Capitolul 7.1. intitulat "**Testarea toxicității extractelor de *Viscum album***" are scopul evaluării gradului de toxicitate a două tipuri de extracte vegetale din vâsc administrate la șoareci din linia Swiss. Pentru testarea toxicității extractelor de *Viscum*

album s-au folosit 40 de femele șoareci Swiss, distribuite în 4 loturi, câte 10 animale pe lot. Experimentul a durat 14 zile. Lotul 1 a fost injectat intraperitoneal în cu 50 mg s.u./kg m.c. tinctură alcoolică de *Viscum album* (MT), lotul 2 cu 20ml/kg m.c. macerat glicerinic de *Viscum album* (MG), lotul 3 cu Doxorubicină (D) iar lotul 4 control.

Valorile hematologice și biochimice se încadrează în limitele de oscilație normale pentru această specie. Examinările histopatologice au evidențiat faptul că extractele vegetale administrate nu prezintă efecte hepatotoxice și nefrotoxice.

Capitolul 7.2. Intitulat "Evaluarea eficienței antineoplazice a două preparate farmaceutice lichide extractive" are ca scopul evaluarea efectului antiproliferativ a două preparate farmaceutice, tinctura și maceratul glicerinic de *Viscum album* L. Experimentul a fost efectuat pe 36 de șoareci, linia Swiss, femele, împărțite în șase loturi: lotul 1 a fost inoculat cu 10^6 celule tumorale de Carcinom Ehrlich, lotul 2 a fost inoculat cu 10^6 celule tumorale de Carcinom Ehrlich și tratat cu Doxorubicină, lotul 3 a fost inoculat cu 10^6 celule tumorale de Carcinom Ehrlich și tratat 50 mg s.u./kg m.c. tinctură alcoolică de *Viscum album* (MT), lotul 4 a fost inoculat cu 10^6 celule tumorale de Carcinom Ehrlich și fost injectat intraperitoneal 20ml/kg m.c. macerat glicerinic de *Viscum album* (MG), lotul 5 a primit intraperitoneal Doxorubicină, lotul 6 Control.

La loturile tratate cu extractele de *Viscum album* se observă o creștere semnificativă a numărului de leucocite (36.81 ± 20.45 și 32.88 ± 6.84) comparativ cu lotul martor (4.87 ± 1.83), în principal prin creșterea numărului de granulocite, sugerând astfel o neutrofilie. Dezvoltarea tumorii a fost urmată de o creștere semnificativă a masei corporale din cauza acunulării lichidului ascitic. Cea mai mică cantitate de lichid ascitic (2.66 ± 1.43 ml) și cel mai scăzut număr de celule tumorale (492.86 ± 142.68 mil/ml) s-a înregistrat la lotul 2 (EAC+D). Extractul alcoolic TM a dovedit, de asemenea, un efect protector, dar maceratul glicerinic (MG) nu a prevenit dezvoltarea carcinomului ascitogen. Alți parametrii, ca volumul ascitic și concentrația celulară, nu au fost influențați de extractele de vâsc în mod semnificativ.

Cu toate acestea, efectul citostatic al extractului nu ar trebui exclus la doze mai mari. Important de reținut este că substanțele administrate au demonstrat un efect mai degrabă citostatic, decât citotoxic, deoarece la colorația cu albastru de Tripian 90% din celulele tumorale din lichidul ascitic erau viabile.

Capitolul 7.3. intitulat "Evaluarea eficienței extractului de vâsc în potențarea doxorubicinei " are ca scop evaluarea eficienței tincturii alcoolice de *Viscum album* L. în potențarea acțiunii antiproliferative a Doxorubicinei.

Asocierea dintre doxorubicină și VA are un efect antiproliferativ mai eficient, comparativ cu doxorubicina în monoterapie. Fapt reflectat prin scăderea numărului de celule tumorale ($2,66 \pm 0,78$) cu un procent crescut de celule neviabile în lichidul ascitic ($5,55 \pm 5,14$) comparativ cu lotul martor. Toate constantele urmărite (diferența de greutate corporală, volumul ascitic, concentrația celulară) s-au îmbunătățit în mod semnificativ comparativ cu lotul netratat (EAC).

Enzimele antioxidante (CAT, XOD și Px) au fost determinate din toate probele de ser și din celulele obținute în urma recoltării lichidului ascitic.

Adminstrarea doxorubicinei și a extractului de *Viscum album* nu a modificat activitatea enzimelor antioxidante de la nivelul seric. Cea mai mare creștere a activității enzimice antioxidante s-a înregistrat la șoarecii din lotul netratat (EAC), CAT $7,14 \pm 0,08$ mU/ml, XOD $4,5 \pm 0,14$ mU/ml, Px $3,9 \pm 0,1$ mU/ml. La șoarecii cu carcinom Ehrlich, tratați cu doxorubicină s-a observat o scădere a activității antioxidante, dar terapia cu doxorubicină asociată cu extract de *Viscum album* a redus semnificativ nivelul stresului oxidativ. Astfel doxorubicina asociată cu extract de *Viscum album* a exercitat un efect protector, antioxidant mult mai evident decât terapia doar cu doxorubicină.

Activitatea enzimelor (CAT, XOD și Px) a fost corelată pozitiv cu creșterea masei corporale, respectiv cu volumului lichidului ascitic. Corelațiile obținute au fost pentru CAT/vol. ascită $r=0.74$, $p<0.001$; XOD/vol. ascită $r=0.74$, $p<0.001$, Px/vol. ascită $r=0.72$, $p<0.001$. Pentru toate cele trei enzime corelațiile sunt bune.

Aministrarea de extract de *Viscum album* L. are o influență puternică asupra leucocitelor, în principal la nivelul granulocitelor, oservându-se creșterea numărului acestora.

Asocierea dintre Doxorubicină și *Viscum album* oferă un efect mai bun antiproliferativ, comparativ cu Doxorubicina administrată singură.

Stresul oxidativ plasmatic a fost mai redus, dar mai intensificat în celulele carcinomului Ehrlich. la lotul tratat și cu *Viscum album*.

Capitolul 7.4. intitulat : " **Evaluarea efectului preventiv și curativ al extractului de *Viscum album* în cazul șoarecilor swiss inoculați cu tumoră Ehrlich** " are ca scop evaluarea eficienței extractului alcoolic de *Viscum album* L asupra carcinomului ascitic Ehrlich administrat în post și pretratament.În acest experiment s-a dorit de asemena și evaluarea acțiunii antioxidante a extractului de vâsc prin evaluarea markerilor stresului oxidativ. Pentru realizarea acestui scop s-a efectuat un experiment pe 40 de șoareci albi din linia Swiss, femele cu o greutate medie de $30,12 \pm 3,38$ g. Animalele au fost împărțite în 5 loturi astfel:

Lotul 1 (n=8) (Control) a primit 0,5 ml alcool 70% i.p., evaporat $\frac{3}{4}$ și completat cu ser fiziologic steril;

Lotul 2 (n=8) (VA) a primit extract de *Viscum album* în doza de 50 mg s.u. /kg m.c. în zilele 1, 3 și 6;

Lotul 3 (n=8) (EAC) a primit în ziua 0 a experimentului 10^6 celule în suspensie de carcinom ascitic Ehrlich prin administrare intraperitoneală;

Lotul 4 (n=8) (VA+EAC) a primit extract de *Viscum album* în doza de 50 mg s.u. /kg m.c. în zilele -1, -3 și -6 iar în ziua 0 a experimentului 10^6 celule în suspensie de carcinom ascitic Ehrlich prin administrare intraperitoneală

Lotul 5 (n=8) lot (EAC+VA) a primit în ziua 0 a experimentului 10^6 celule în suspensie de carcinom ascitic Ehrlich prin administrare intraperitoneală și a fost tratat cu extract de *Viscum album* în doza de 50 mg s.u. /kg m.c. în zilele 1, 3 și 6

În ziua 14-a șoarecii au fost aneșteziați prin narcoză și s-a recoltat sânge din sinusul retroorbital. Ulterior au fost eutanasiați. Probele de sânge obținute pentru determinarea enzimelor stresului oxidativ au fost imediat centrifugate la 4°C iar plasma astfel obținută a fost congelată la -20°C .

În ceea ce privește diferențele masei corporale valorile au fost foarte apropiate la șoarecii din loturile 3 (34.1 ± 5.21) și 4 (34.5 ± 7.05). În schimb s-a observat scăderea concentrației (22.0 ± 1.95) și viabilității celulelor ascitice la șoarecii din lotul care a primit extract de VA înainte de ziua 0 comparativ cu lotul 3. La șoarecii care au primit extract de VA după inocularea carcinomului Ehrlich (lotul 5) nu s-a observat scăderea concentrației (77.6 ± 29.66) și viabilității celulelor ascitice.

La loturile 3,4 și 5 se observă leucocitoză. Testul Pearson a arătat o bună corelație între valoarea leucocitelor și cantității lichidului ascitic ($r=0,68$, $p<0.05$). Între valoarea leucocitelor și concentrația celulelor tumorale testul Pearson nu a arătat corelație de unde putem deduce că leucocitoza s-a datorat dezvoltării carcinomului Ehrlich.

S-au comparat valorile enzimelor cu concentrația celulelor tumorale din lichidul ascitic și a rezultat o corelație bună ($0.25 < r < 0.5$) între activitatea antioxidantă a acestora (CAT, XOD, Px) și concentrația celulelor ascitice. Singura corelație pozitivă s-a obținut între CAT serică și cea tumorală ($r=0.82$, $p<0.001$). Corelația activității enzimelor XOD și Px serice și tumorale a arătat valori negative (XOD: $r= -0.7$, $p<0.001$; Px: $r= -0.5$, $p<0.05$).

Studii anterioare *in vitro* și *in vivo* au arătat că extractul de *Viscum album* exercită un efect antitumoral. Mecanismele prin care se obține această acțiune antitumorală nu este încă exact definit, dar sunt acceptate două ipoteze. Prima ipoteză susține că efectul antitumoral se obține prin activarea celulelor Natural Killer și a limfocitelor T crescând astfel răspunsul imun. A doua ipoteză susține că acest efect antitumoral se obține prin

acțiune citotoxică directă asupra celulelor tumorale (Khil și colab., 2007; Tabiasco și colab., 2008).

Administrarea extractului de vâsc înainte inoculării tumorii ascitogene Ehrlich a dus la scăderea stresului oxidativ de la nivelul plasmei spre deosebire de administrarea extractului post-inoculare, caz în care nu au fost observate modificări semnificative. Totuși, se poate ca efectul de reducere a stresului oxidativ să fie consecința încetinirii dezvoltării tumorale și nu rezultatul unei acțiuni directe antioxidante. La nivelul celulelor tumorale ascitice s-a pus în evidență un nivel crescut al stresului oxidativ, dar doar la lotul care a primit extract de vâsc înaintea inoculării tumorale. La șoarecii care au primit extract de VA după inocularea tumorii nu s-au observat modificări semnificative ale activității antioxidante de la nivelul celulelor tumorale.

Capitolul 7.5. intitulat "**Evaluarea efectului antiproliferativ al extractului de vâsc *in vitro***" are ca scop în evaluarea efectului extractului de *Viscum album in vitro*, atât pe culturi de celule normale (Hfl) cât și pe celule tumorale (HeLa).

Testul MTT a fost realizat pentru a determina citotoxicitatea extractului de vâsc asupra celulelor HeLa și Hfl. Celulele Hfl și HeLa au fost cuantificate și la o concentrație de 1×10^5 celule/godeu au fost adăugate în plăci cu 96 godeuri și tratate cu extractul de *Viscum album* în concentrații de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 și 40 $\mu\text{g/ml}$ în PBS. Evaluarea viabilității s-a efectuat după 24 h de la tratament.

În cazul liniei de celule tumorale HeLa viabilitatea celulară se reduce treptat, la concentrația de $5 \mu\text{g/ml}$ fiind 44,58%, ajungând la 9.35% la doza de $50 \mu\text{g/ml}$. Celulele liniei Hfl nu sunt afectate în aceeași manieră de extract, observând o viabilitate de 63.65% la cea mai mare doză, adică la $50 \mu\text{g/ml}$.

Activitatea antiproliferativă directă și citotoxicitatea extractului de *V. album* se bazează pe proprietatea lectinelor de a iniția apoptoza (Janssen și colab., 1993). Dar proliferarea tumorală poate să fie inhibată și prin alte mecanisme, de exemplu blocarea ciclului celular în faza G0/G1 (Kovacs, 2010). Conținutul de compuși activi (mai ales a lectinelor) din extract diferă foarte mult în funcție de timpul de recoltare a plantei și de proveniența acestuia.

Capitolul 8.1. intitulat "**Testarea toxicității extractului de *Euonymus europaeus***"

are ca scop stabilirea gradului de toxicitate al acestui extract administrat parenteral și per os la șoareci Swiss. S-au folosit 30 șoareci din linia Swiss, femele, care au fost împărțite în șase grupuri a câte 5 animale fiecare, constituind loturi uniforme din punct de vedere al greutateii. Trei loturi au fost inoculate intraperitoneal, la două loturi administrarea s-a făcut *per os* și la un grup, lot martor, au fost administrați intraperitoneal numai excipienți. Dozele utilizate și loturile au fost după cum urmează:

Lotul 1 (n=5):	1500 mg/kg m.c. i.p
Lotul 2 (n=5):	3000 mg/kg m.c. i.p.
Lotul 3 (n=5):	4500 mg/kg m.c. i.p.
Lotul 4 (n=5):	2000 mg/kg m.c. <i>per os</i>
Lotul 5 (n=5):	6000 mg/kg m.c. <i>per os</i>
Lotul 6 (n=5):	1 ml/animal excipienți i.p.

Toți șoarecii supuși testului de toxicitate au trăit până la sfârșitul experimentului și nu au prezentat semne de intoxicație. Singurele manifestări posibil atribuite unei eventuale toxicoze au fost constatate la lotul 3 (4500 mg/kg m.c.), la care în primele 90 de minute după administrarea intraperitoneală au apărut simptome ca letargie, spasme, însă care au dispărut după 90 minute. Valorile hematologice și biochimice se încadrează în limitele de oscilație normale pentru această specie. Examinările necropsice au evidențiat faptul că extractele vegetale administrate nu prezintă efecte toxice.

Extractul alcoolic studiat poate fi folosit în condiții de siguranță chiar și în doze mari.

Capitolul 8.2. intitulat "**Evaluarea efectului antiproliferativ al extractului de *Euonymus europaeus in vivo***" are drept scop evaluarea din perspectivă oncologică a potențialului terapeutic al extractului etanolic de *Euonymus europaeus* asupra carcinomului ascitogen Ehrlich la șoareci din lina Swiss.

Pentru realizarea acestui experiment s-au folosit 36 de șoareci femele din linia Swiss. Loturile și tratamentele aplicate au fost efectuate după cum urmează:

Lotul 1 (n=6) șoareci inoculați doar cu extract EE: 50 mg/kg m.c. i.p.,
Lotul 2 (n=6) șoareci inoculați cu EAC + placebo i.p.
Lotul 3 (n=6) șoareci inoculați cu EAC + extract EE: 50 mg/kg m.c. i.p.
Lotul 4 (n=6) șoareci inoculați cu EAC + extract EE: 25 mg/kg m.c. i.p.
Lotul 5 (n=6) șoareci inoculați cu EAC + extract EE: 12,5 mg/kg m.c. i.p.
Lotul 6 (n=6) șoareci inoculați cu EAC i.p. + extract EE: 50 mg/kg m.c. *per os*.

Experimentul pentru determinarea timpului de supraviețuire a fost efectuat folosind 20 femele de șoareci din linia Swiss, împărțiți în 2 loturi după cum urmează :

Lotul 1 (n=10) șoareci inoculați cu EAC + placebo i.p.
Lotul 2 (n=10) șoareci inoculați cu EAC + extract EE: 50 mg/kg m.c. i.p.

Creșterea masei corporale a șoarecilor este indicator al proliferării celulelor tumorale din cavitatea peritoneală. Cea mai mare creștere în greutate (cu 18%) a fost observată la lotul martor pozitiv (EAC + placebo). Administrarea extractului EE a redus semnificativ creșterea în greutate a șoarecilor din lotul tratat cu 50 mg/kg m.c. pe cale intraperitoneală, în timp ce pentru celelalte doze folosite și pentru calea orală de administrare nu s-au înregistrat efecte protectoare semnificative din punct de vedere statistic. Cantitatea de lichid ascitic a avut o variație direct proporțională cu creșterea în greutate a indivizilor.

Efectul antiproliferativ al extractului a fost demonstrat în continuare și prin experimentul de supraviețuire. Terapia a crescut semnificativ, cu 28,57%, valoarea medie a supraviețuirii șoarecilor cu tumora Ehrlich (media EAC, 14 zile, EAC + EE 50 mg / kg greutate corporală, 18 zile; $p < 0,05$).

Atât numărul total de celule tumorale cât și cel de celule tumorale viabile din lichidul ascitic au scăzut semnificativ ca urmare a administrării extractului EE în doză de 50 mg/kg m.c. intraperitoneal ($p < 0,05$), în timp ce calea orală și celelalte doze nu au avut efecte relevante. Concentrația neutrofilelor și limfocitelor din lichidul ascitic a fost mai ridicată la lotul tratat cu extract EE în doză de 50 mg/kg m.c. intraperitoneal, față de restul loturilor.

Aceste rezultate sugerează că prezența celulelor inflamatorii în lichidul peritoneal au exercitat un anumit efect protector împotriva dezvoltării tumorii, în timp ce leucocitele

circulante nu au avut o asemenea influență. Această observație este confirmată și de testul de corelație, în timp ce numărul de limfocite din lichidul ascitic se corelează negativ cu cantitatea de fibrina din lichidul ascitic ($r = -0,45$, $p < 0,05$) și cu gradul de congestie a peretelui abdominal ($r = 0,61$, $p < 0,05$), iar numărul de neutrofile circulante se corelează pozitiv cu acești doi parametri.

Efectul antiproliferativ ar putea fi explicat prin fenomene ca inducerea apoptozei celulare sau blocarea ciclului celular, dar ținând cont de intensificarea răspunsului celular local, exprimat prin creșterea concentrației limfocitelor din lichidul ascitic, nu putem exclude nici o implicație imunologică.

Capitolul 8.3. intitulat "**Evaluarea efectului antiproliferativ al extractului de *Euonymus europaeus in vivo***" are ca scop investigarea efectului biologic și antiproliferativ al extractului de *Euonymus europaeus in vitro* și determinarea modului de acțiune al acestui efect.

Evaluarea efectului antiproliferativ a fost testat atât pe fibroblaste dermice umane normale (HDFa) cât și pe o linia celulară de melanom uman cu fază de creștere radială (WM35). Evaluarea gradului de citotoxicitate a fost realizat utilizând testul de proliferare CellTiter 96 ® (Promega Corporation Madison, USA). Kitul Annexin V cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) în combinație cu iodură de propidiu (PI) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a fost folosit pentru detectare apoptozei.

Efectul inhibitor al extractului asupra proliferării celulelor WM35 este dozo-dependent. Până la doza de 1 $\mu\text{g/ml}$ se observă o inhibare progresivă, iar la doza de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ viabilitatea celulelor scade brusc, rezultatele citirii fiind apropiate de rezultatele obținute în cazul mediului de cultură. Morfologia celulelor tumorale este de asemenea afectată la 2,5 $\mu\text{g / ml}$, celulele au fost distribuite cu densitate redusă; unele dintre ele au suferit modificări morfologice. Semnele de inhibare a viabilității au fost evidente la 6 ore, dar rata de inhibare a crescut semnificativ după 24 ore ($p < 0.0001$).

Intensitatea apoptozei timpurii și apoptozei târzii/necrozei este dependentă de doza și timpul de expunere la extract în cazul ambelor linii celulare luate în studiu. În cazul dozei de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, după 6 ore de expunere s-au observat modificări minore, viabilitatea celulelor

VM35 a fost de 99.9%, iar la linia de fibroblaști s-a observat un procent de 0.1% celule în apoptoză timpurie și 0.1% de celule în apoptoză târzie/necroză. Efectul extractului a fost ușor amplificat după cele 24 de ore de expunere. Celulele liniei VM35 prezentau în proporție de 1.1% semne de apoptoză timpurie și 1.9% apoptoză târzie/necroză, iar în cazul fibroblastelor s-a observat un procent de 2.7% celule în apoptoză timpurie și 2.7% în apoptoză târzie/necroză.

Doza de 1 μg / ml a dovedit un efect de inducerea a apoptozei, la 6 h celulele liniei VM35 cu apoptoză timpurie fiind în procent 0,3%, și cele în apoptoză târzie / necroză de 6,6%. După 24 de ore de expunere apoptoza timpurie a fost de 4,6%, iar apoptoza târzie / necroza de 6,6% pentru celulele VM35, în timp ce în cazul fibroblastelor 7,9% erau în apoptoză timpurie și 7,6% în apoptoză târzie / necroză.

Din câte stim, nu exista studii publicate, până la ora actuală, privind proprietățile antitumorale al extractului alcoolic de *E. europaeus* . Studiile in vitro au demonstrat că extractul de *E. europaeus* are un efect puternic inhibitor, dependent de doză, asupra liniei de celule de melanom uman VM35. Efectul antiproliferativ a fost prezent la concentrație relativ mică de extract de plantă, respectiv 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. În mod remarcabil, când concentrație similară a fost adăugată în cultura de fibroblaste umane normale, a avut un efect foarte scăzut asupra viabilității celulare.

Evodimina, fiind prezentă în extractul testat în concentrație de 0,404 mg/ml poate să fie responsabilă de efectul antitumoral observat. Studiile arată ca evodiamina inhibă proliferarea celulelor liniei NCI/ADR-RES (cancer mamar uman rezistent la adriamicina) într-un mod dozodependent. Citometria de flux FACScan a arătat că după 12 ore de contact între evodiamina și celule tumorale, aceasta acționează în faza G2/M a ciclului celular (Cho-Hwa Liao și colab., 2005).

Lanatoside C este o altă moleculă bioactivă, izolată în cantitate semnificativă, care ar putea explica efectul antiproliferativ al extractului. Studii recente au demonstrat că glicozidele cardiotonice au potențial în tratamentul unor tipuri de cancer (Rodier și Campisi, 2011).

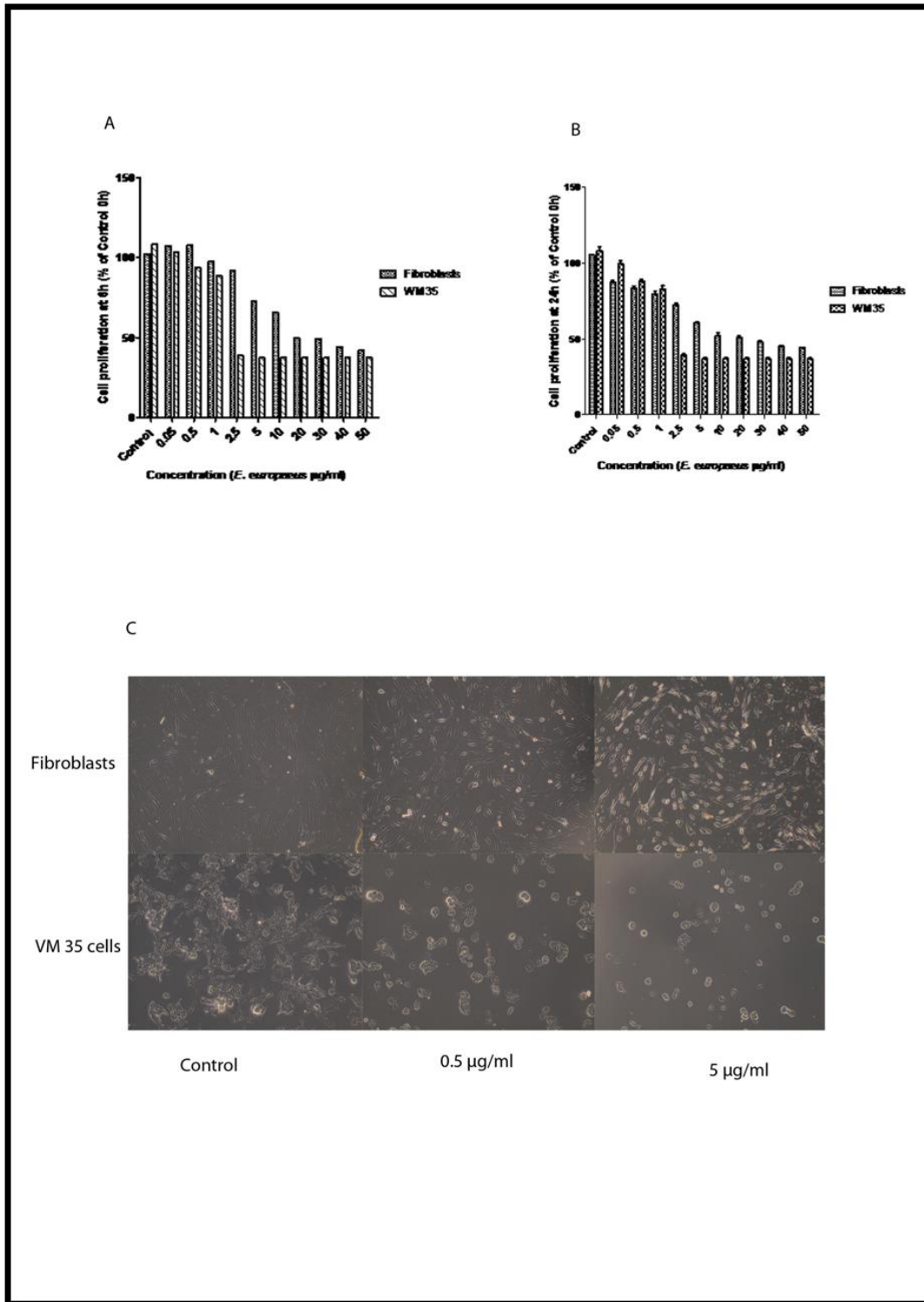


Fig. 8.3.1. Proliferarea celulară la 6 h (A) și la 24 h. Densitatea celulară la 0,5µg/ml și 5µg/ml (C)
 Fig. 8.3.1. Cell proliferation after 6 h (A) and 24 h (B). Cell density at 0,5µg/ml și 5µg/ml (C)

CONCLUZII GENERALE

Extractele de *Viscum album* administrate în dozele testate nu prezintă efecte toxice sistemice.

Tinctura alcoolică de *Viscum album* are efect antiproliferativ mai pronunțat decât maceratul glicerinic.

Administrarea de *Viscum album* amplifică efectul antiproliferativ al Doxorubicinei.

Extractul de *Viscum album* administrat ca pretratament, determină efect citotoxic și antiproliferativ, prin creștere semnificativă a procentului de celule neviabile și scăderea concentrației celulelor în lichidul ascitic.

Extractul alcoolic de *Viscum album* reduce proliferarea celulelor tumorale (Hela) și mai puțin a celulelor normale (HFL).

Extractul *E. europeus* conține **evodiamină** și **lanatosid c**, compuși cunoscuți pentru efectul lor antitumoral .

În administrare acută în doză maximă de 4500 mg/ml extractul nu prezintă efect toxic.

Administrarea extractului de *E. europeus* inhibă creșterea tumorală, reduce efectele secundare ale creșterii tumorale și prelungește timpul de supraviețuire în cazul șoarecilor inoculați cu carcinom ascitogen Ehrlich.

In vitro extractul de *E. europaeus* are un efect puternic inhibitor, selectiv și dozodependent asupra liniei VM35 (melanom uman). Citotoxicitatea se exercită prin necroză și nu prin apoptoză.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

- Teza reprezintă primul studiu la nivel mondial care demonstrează efectul antiproliferativ al extractului de *Euonymus europeus*.
- Primul studiu care demonstrează prezența evodiaminei și a lanatosid C în extractul alcoolic de *Euonymus europeus*.

BIBLIOGRAFIE

1. **Cho-Hwa L., Shiow-Lin P., Jih-Hwa G., Ya-Ling C., Hui-Chen P., Chun-Hung L. and Che-Ming T.**, 2005, Antitumor mechanism of evodiamine, a constituent from Chinese herb *Evodiae fructus*, in human multiple-drug resistant breast cancer NCI/ADR-RES cells in vitro and in vivo, *Carcinogenesis* 26(5):968-975
2. **Janssen O., Scheffler A., Kabelitz D.**, 1993, In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis) *Arzneim Forsch / Drug Res.*;43:1221–1227
3. **Khil L.Y., Kim W., Lyu S., Park W., Yoon J.W., Jun H.**, 2007, Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells, *World J Gastroenterol* 13(20): 2811-2818
4. **Kovacs E.**, 2010, Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines, Comparison of *Viscum album* QuFrF extract with vincristine in an in vitro model. *TheScientificWorldJournal*;10:311–320
5. **Rodier F., Campisi J.**, 2011, Four faces of cellular senescence *J. Cell Biol.* 192: 547–556
6. **Tabiasco J., Pont F., Fournie J.J., Vercellone A.**, 2002, Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated, Cytotoxicity *Eur. J. Biochem.* 269, 2591–2600