

UNIVERSITATEA TITU MAIORESCU BUCUREȘTI

IOSUD

Domeniul MEDICINĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIUL SINERGISMULUI DINTRE
FITOTERAPIA ȘI ONCOTERAPIA HEPATICĂ**

REZUMAT

Conducător științific

Prof. Univ. Dr. DAN FLORIN UNGUREANU

Doctorand

Mirela Claudia RÎMBU

BUCUREȘTI

2025

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI

INTRODUCERE

PARTEA GENERALĂ

CAPITOLUL I: CANCERUL HEPATIC ÎN CONTEXTUL CERCETĂRILOR ACTUALE

1.1 Microanatomia hepatică	1
1.2 Carcinomul hepatocelular	4
1.3 Tumori stromale gastro-intestinale	6
1.4 Tumori stromale hepatice primare extra-gastrointestinale	13
1.5 Diagnostic imunohistochimic	20

CAPITOLUL II: ABORDĂRI EMERGENTE ÎN ONCOLOGIA HEPATICĂ

2.1 Farmacologia și toxicologia plantelor medicinale utilizate în afecțiuni hepatice	26
2.2 Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint	38

PARTEA SPECIALĂ

CAPITOLUL III: STADIALIZAREA PACIENȚILOR CU PATOLOGIE ONCOLOGICĂ HEPATICĂ

3.1 Introducere	53
3.2. Material și metode	57
3.3. Rezultate și discuții	58
3.4. Concluzii	65

CAPITOLUL IV: SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANO-ARTICULELOR DE ARGINT BAZATE PE EXTRACT DE *TARAXACI HERBA* ȘI EVALUAREA ACTIVITĂȚII CITOTOXICE ASUPRA LINIEI CELULARE HEP G2

4.1 Introducere	66
4.2 Materiale și metode	67
4.3 Rezultate și discuții	68

CAPITOLUL V: EVALUAREA ACȚIUNII ANTIPROLIFERATIVE A EXTRACTULUI DE *CHELIDONIUM MAJUS* ASUPRA LINIILOR CELULARE TUMORALE

5.1 Introducere	76
5.2 Evaluarea citotoxicității in vitro a compușilor studiați pe linii celulare tumorale umane și celule normale	77
5.3 Cultivarea liniilor celulare	78
5.4 Evaluarea citotoxicității celulare prin tehnica colorimetrică (MTS)	80
5.5 Evaluarea citotoxicității celulare a compușilor studiați	82

CAPITOLUL VI: ACȚIUNEA ANTIOXIDANTĂ ȘI ANTIBACTERIANĂ A EXTRACTELOR DE *CLEMATIS HERBA*, *MELISSAE FOLIUM*, *TARAXACI HERBA*, *SILYBII FRUCTUS*

6.1. Determinarea cantitativă a compușilor polifenolici	86
6.2. Acțiunea antioxidantă	88
6.3. Acțiunea antimicrobiană	89
6.4. Concluzii	92

CAPITOLUL VII: SINERGISMUL *IN VITRO* DINTRE NANO-PARTICULE OBTINUTE PRIN METODE *GREEN* ȘI MEDICAMENTE ANTITUMORALE DE ULTIMĂ GENERAȚIE ASUPRA LINIILOR CELULARE

7.1 Introducere	93
7.2 Metode experimentale	95
7.3 Testarea antitumorală <i>in vitro</i>	107
7.4. Concluzii	118

CAPITOLUL VIII: STUDIUL PRIN ANDOCARE MOLECULARĂ A UNOR PRINCIPII ACTIVE DIN PLANTE MEDICINALE ȘI INHIBITORI DE TIROZIN-KINAZĂ

8.1. Pregătirea și caracterizarea structurilor receptorilor	119
8.2 Pregătirea și caracterizarea structurilor liganzilor	128
8.3 Andocarea moleculară	142

CAPITOLUL IX: EVALUAREA EFECTELOR ADVERSE ȘI A SIGURANȚEI ONCOTERAPIILOR

9.1 Introducere	153
9.2. Farmacovigilența cisplatinului	154
9.3 Farmacovigilența inhibitorilor de tirozin-kinază	161
9.4. Concluzii	175

CAPITOLUL X: STUDIU DE CAZ: PHGIST: TUMORĂ GIGANTICĂ INTRAHEPATICĂ DE NATURĂ STROMALĂ

10.1 Introducere	176
10.2 Etapele cazului clinic	176
10.3 Particularitățile clinice ale cazului	198
10.4 Analiza comparativă a datelor biochimice	200
10.5 Particularitățile biochimice ale cazului	227
10.6 Concluzii	228

CONCLUZII GENERALE

BIBLIOGRAFIE

Anexa 1 – Index Figuri

Anexa 2 – Index Tabele

Anexa 3 – Acorduri Etică

Anexa 4 – Index Lucrări Științifice

INTRODUCERE

În ultimii ani, cercetările în domeniul oncologiei s-au concentrat asupra dezvoltării unor terapii mai eficiente și mai bine tolerate pentru tratarea tumorilor solide. Tumorile stromale gastrointestinale (GIST) reprezintă un exemplu relevant de neoplazii cu un comportament biologic complex, caracterizate printr-o sensibilitate inițială la terapiile țintite, urmată adesea de dezvoltarea rezistenței secundare. Deși tratamentele actuale, precum inhibitorii de tirozin-kinază (TKI), au îmbunătățit semnificativ prognosticul pacienților cu GIST, în special al celor inoperabili sau metastatici, supraviețuirea pe termen lung rămâne variabilă, iar rezistența la tratament este o provocare majoră.

Această cercetare a fost inițiată pe baza analizei unui caz clinic particular, al unei paciente în vârstă de 71 de ani la momentul diagnosticului, în martie 2017, cu o formă rară de GIST gigant cu punct de plecare hepatic (PHGIST). Pacienta a beneficiat de intervenție chirurgicală la momentul diagnosticului și a fost inițiată pe tratament cu Imatinib, un TKI de primă linie. Evoluția a fost favorabilă timp de cinci ani, însă, în 2022, s-a constatat apariția rezistenței la tratament, ceea ce a impus o a doua intervenție chirurgicală și trecerea la Sunitinib, utilizat ca terapie de linia a doua. Supraviețuirea totală a pacientei a fost de 8 ani, din care cinci ani sub Imatinib și doi ani sub Sunitinib, până în februarie 2025. Acest caz ridică întrebări esențiale privind mecanismele de rezistență la tratamentele actuale și posibilitatea de a îmbunătăți strategia terapeutică prin adăugarea unor agenți adjuvanți care să întârzie sau să prevină dezvoltarea rezistenței.

În acest context, studiul de față explorează potențialul utilizării nanoparticulelor de argint biosintetizate și al extractelor vegetale în terapia oncologică, cu accent pe impactul acestora asupra viabilității celulare și asupra posibilității de sinergism cu medicamentele chimioterapeutice convenționale. Nanoparticulele metalice, în special cele de argint, au demonstrat o activitate citotoxică relevantă asupra celulelor tumorale, fiind totodată mai puțin toxice decât chimioterapicele standard asupra celulelor sănătoase. În paralel, extractele vegetale, bogate în compuși bioactivi, precum polifenolii și alcaloizii, au arătat un potențial interesant de inhibare a proliferării celulare și de inducere a apoptozei, ceea ce le face candidați pentru utilizarea ca adjuvanți în terapiile oncologice. Rezultatele obținute din testele *in vitro* au demonstrat că nanoparticulele biosintetizate din extract de păpădie prezintă un efect citotoxic dependent de doză și timp asupra celulelor tumorale, având o activitate intermediară între Cisplatin, un agent chimioterapeutic standard, și extractele vegetale simple. De asemenea, extractul de Rostopască (*Chelidonium majus*) a demonstrat o activitate antitumorală superioară Cisplatinei asupra celulelor HepG2, în special după 48 de ore de tratament. Aceste descoperiri susțin ipoteza conform căreia metaboliții secundari din plante pot contribui la îmbunătățirea

eficienței tratamentelor convenționale, fie printr-un efect direct asupra celulelor tumorale, fie printr-o acțiune sinergică cu chimioterapicele utilizate.

Un alt aspect important al cercetării este explorarea interacțiunilor dintre inhibitorii de tirozin-kinază și nanoparticule biosintetizate. Administrarea combinată a Sunitinibului și Imatinibului cu nanoparticule de argint a condus la o creștere a eficacității antitumorale, reducând viabilitatea celulelor tumorale și protejând celulele normale HUVEC. Aceste rezultate sugerează că terapiile combinate ar putea reprezenta o strategie promițătoare pentru îmbunătățirea răspunsului la tratament și prelungirea duratei de eficacitate a inhibitorilor de tirozin-kinază, întârziind astfel dezvoltarea rezistenței.

Pe lângă studiile de citotoxicitate, cercetarea de față a analizat și proprietățile antioxidante și antimicrobiene ale extractelor vegetale. Specii precum *Melissa officinalis* și *Clematis vitalba* au demonstrat o activitate antioxidantă puternică datorită conținutului ridicat de polifenoli, ceea ce sugerează un posibil rol protector împotriva stresului oxidativ, factor implicat în progresia cancerului. În plus, testele microbiologice au indicat o activitate antibacteriană semnificativă, ceea ce deschide noi direcții pentru utilizarea acestor extracte în prevenția și tratamentul infecțiilor, în special la pacienții oncologici cu imunitate compromisă. În completarea analizelor experimentare, tehnicile de andocare moleculară au fost utilizate pentru a identifica noi molecule cu potențial terapeutic. Rezultatele au evidențiat existența unor liganzi cu afinități puternice pentru receptorii implicați în proliferarea celulară, ceea ce sugerează posibilitatea utilizării acestor compuși în dezvoltarea unor agenți chimioterapeutici mai eficienți și mai bine tolerați.

Nu în ultimul rând, analiza farmacovigilenței medicamentelor utilizate în terapia oncologică a evidențiat faptul că atât Imatinibul, cât și Sunitinibul sunt asociate cu reacții adverse frecvente și severe, mai ales la pacienții vârstnici. Profilul de toxicitate al acestor medicamente impune necesitatea unei monitorizări riguroase și a optimizării dozelor pentru fiecare pacient, în funcție de răspunsul individual la tratament.

Această teză își propune să evalueze eficiența și siguranța utilizării nanoparticulelor biosintetizate și a extractelor vegetale ca potențiali agenți terapeutici sau adjuvanți în tratamentul cancerului, având ca punct de plecare cazul unei paciente cu PHGIST, care a supraviețuit opt ani sub tratamente convenționale. Printr-o abordare interdisciplinară, lucrarea va examina impactul acestor agenți asupra viabilității celulare, mecanismele lor de acțiune, interacțiunile cu terapiile standard și implicațiile farmacologice ale utilizării lor. Scopul final al cercetării este de a contribui la dezvoltarea unor strategii terapeutice care să îmbunătățească eficacitatea tratamentelor oncologice și să reducă toxicitatea acestora, oferind astfel pacienților opțiuni mai sigure și mai bine tolerate.

CAPITOLUL III: STADIALIZAREA PACIENȚILOR CU PATOLOGIE ONCOLOGICĂ HEPATICĂ

3.1 Introducere

Clasificarea cazurilor de cancer în funcție de extinderea anatomică a bolii, cunoscută sub numele de *stadializare*, a apărut din observația că pacienții cu tumori localizate aveau rate de supraviețuire mai mari decât cei la care boala s-a extins dincolo de organul inițial. Stadiul identificat la diagnostic reflectă nu doar viteza de dezvoltare și răspândire a tumorii, ci și tipul acesteia și interacțiunea dintre celulele canceroase și organism.

Înregistrarea corectă a extinderii anatomice a bolii la momentul diagnosticării este esențială pentru: planificarea tratamentului de către medic, estimarea prognosticului pacientului, evaluarea eficienței tratamentului, facilitarea schimbului de informații între centrele medicale, cercetarea continuă a cancerului uman și sprijinirea strategiilor de control al cancerului.

Stadializarea joacă un rol central în îngrijirea pacienților, în cercetare și în măsurile de control al bolii. Aceste măsuri includ îngrijirea individuală, dezvoltarea ghidurilor clinice și înregistrarea datelor pentru monitorizarea extinderii bolii la nivel de populație. Clasificarea precisă a stadiului ajută la evaluarea rezultatelor tratamentului și a programelor oncologice. Totuși, pentru a analiza impactul bolii pe termen lung, sistemul de clasificare trebuie să fie stabil, ceea ce creează o provocare între actualizarea acestuia conform celor mai recente descoperiri medicale și menținerea unei continuități pentru studiile longitudinale.

3.2. Materiale și metode

În studiul de față au fost incluși 568 de pacienți cu suspiciune de tumori hepatice internați în două centre medicale din București: Institutul Clinic Fundeni și Spitalul Clinic de Urgență București. Stadializarea s-a realizat conform sistemului TNM, utilizând atât clasificarea clinică (cTNM), cât și cea patologică (pTNM), în funcție de disponibilitatea datelor postoperatorii.

Parametrii studiați au inclus: vârsta și sexul pacienților, clasificarea tumorilor hepatice conform criteriilor UICC (T, N, M), distribuția pe stadii (I-IV, cu substandializări a/b), localizarea și invazia ganglionară, prezența sau absența metastazelor.

Datele au fost colectate retrospectiv din dosarele medicale în baza avizelor de etică emise de către Institutul Clinic Fundeni (nr. 5270/30.09.2024) și de către Spitalul Clinic de Urgență (nr. 7209/11.09.2024), au fost centralizate și analizate statistic folosind programul Microsoft Office (EXCEL, 2024) și programul IBM SPSS Statistics.

3.3. Rezultate și discuții

3.3.1. Caracteristici demografice

Dintre acești pacienți 51,6% fiind bărbați și 48,4% femei, majoritatea fiind situați în grupa de vârstă de 65 – 85 ani (57,38%).

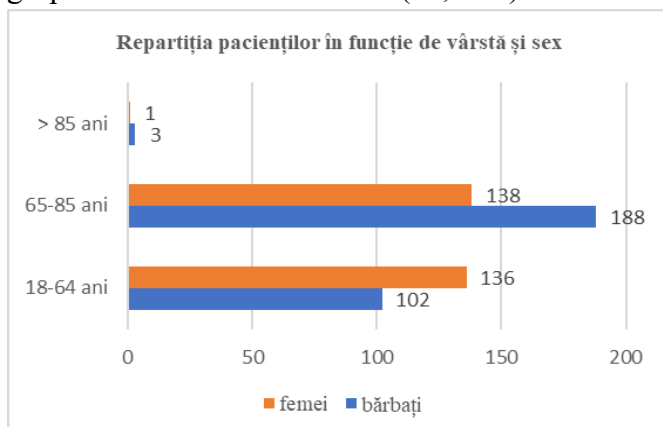


Figura 3.1: Repartiția pacienților în funcție de vârstă și sex

Testând egalitatea procentuală dintre numărul femeilor și bărbaților am obținând

$$Z = 0,763 \in (-1,65 ; 1,65), \quad \text{respectiv}$$

$p = 0,4454 > 0,10$, ceea ce reprezintă că nu există diferențe statistice între numărul femeilor și cel al bărbaților.

3.3.2. Distribuția pe stadii

În funcție de gravitatea bolii, 43% se aflau în stadiul I, 27,8% în stadiul II, 12,7% în stadiul III și 16,5% în stadiul IV.

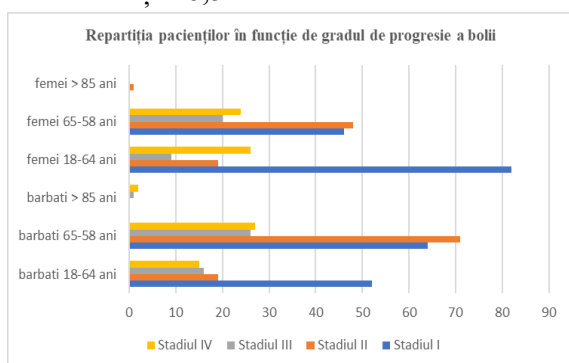


Figura 3.2: Repartiția pacienților în funcție de gradul de progresie a bolii

Testul statistic este:

$$\chi^2_{(2-1)(4-1)} = \chi^2_3 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} = \frac{(116-125,9)^2}{125,9} + \dots + \frac{(50-45,5)^2}{45,5} = 6,19$$

valoarea critică fiind 7,815.

Se observă că repartiția bolii în cele 4 stadii nu depinde de sexul pacienților.

Analizând repartiția pacienților în substadiile a, b, c, se observă că nu există nici un pacient în substadiul c, 97,54% dintre pacienți se află în substadiu a, iar în substadiul b sunt 2,46% dintre pacienți. După cum se poate observa, 98% dintre femei sunt în substadiul a, 97% dintre bărbați.

Tabel III.2: Substadializarea a, b, c

Sex	Vârstă	Substadiu a	Substadiu b	Substadiu c	În grupa de vârstă 65-85 de ani, în substadiul a, avem 61,77% dintre bărbați și 49,82%, ceea ce reprezintă o diferență semnificativă ($Z=4,357$). În grupa pacienților sub 65 de ani, această repartiție este modificată : 34,47% dintre bărbați față 47,64% dintre femei (diferența fiind semnificativă : $Z=4,115$).
Bărbați	>85ani	3	0	0	
	65-85ani	181	7	0	
	<65ani	101	1	0	
Femei	>85ani	1	0	0	
	65-85ani	137	1	0	
	<65ani	131	5	0	

3.3.3. Parametrii TNM

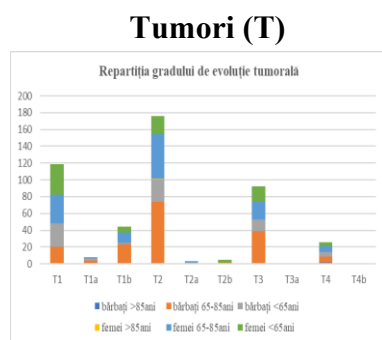


Figura 3.6: Repartiția gradului de evoluție tumorală

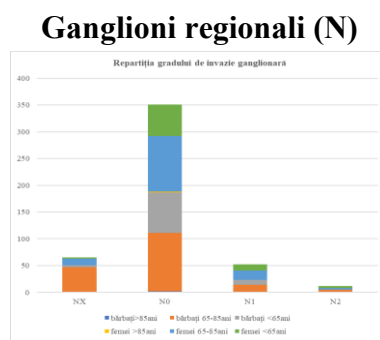


Figura 3.7: Repartiția gradului de invazie ganglionară

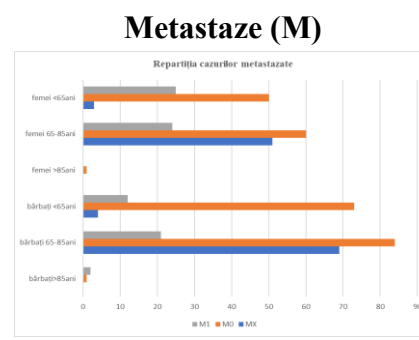


Figura 3.8: Repartiția cazurilor metastazate

Cele mai frecvente cazuri sunt T2 (37,05%), T1(25,05%), respectiv T3 (19,37%), iar cele mai scăzute sunt T3a și T4b cu un procent de 0,21% fiecare. În funcție de gradul de invazie ganglionară, 13,54% din cazuri prezintă multiple invazii, 73,13% sunt N0, 10,83% sunt N1 și 2,50% sunt N2. Cele mai multe cazuri au fost la grupa de vârstă 65-85 ani (36,25% pentru bărbați, respectiv 28,54% pentru femei). În cazul metastazelor, 26,46% din cazuri prezintă MX, 56,04% sunt M0 și 17,50% sunt M1.

3.4. Concluzii

Datele colectate indică o prevalență ridicată a tumorilor în stadii incipiente (I și II), cu 70,8% dintre pacienți încadrați în aceste stadii. Tumorile de tip T2 au fost cele mai frecvente întâlnite (37,05%), în special în rândul pacienților cu vârste între 65-85 de ani, consolidând datele din literatura internațională privind incidența crescută a cancerului hepatic la vârstnici și asocierea cu afecțiuni cronice preexistente (ciroză, hepatită virală, sindroame metabolice).

În ceea ce privește invazia ganglionară, s-a constatat o proporție semnificativă de pacienți fără afectare limfatică (N0 – 73,13%), iar invaziile multiple au fost mai rare (2,5% cu N2), ceea ce sugerează o evoluție preponderent locoregională în stadiile precoce. Totodată, în cadrul substadializării (a, b, c), marea majoritate a cazurilor au fost încadrate în substadiul a, fără diferențe semnificative statistic între sexe. Metastazele la distanță (M1) au fost identificate în 17,5% dintre cazuri, în timp ce 26,46% dintre pacienți au fost încadrați cu status metastatic necunoscut (MX), evidențiind nevoia de îmbunătățire a completitudinii investigațiilor imagistice și a documentării patologice.

În concluzie, acest studiu subliniază importanța aplicării riguroase a sistemelor internaționale de stadializare, adaptate specificului local al patologiei oncologice hepatice, și evidențiază nevoia de îmbunătățire continuă a instrumentelor de diagnostic precoce, a investigațiilor complementare și a strategiilor terapeutice individualizate, bazate pe profilul TNM al pacientului.

CAPITOLUL IV: SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANO-ARTICULELOR DE ARGINT BAZATE PE EXTRACT DE *TARAXACI HERBA* ȘI EVALUAREA ACTIVITĂȚII CITOTOTXICE ASUPRA LINIEI CELULARE HEP G2

4.1 Introducere

Păpădia (*Taraxacum officinale*) este o plantă medicinală valoroasă datorită conținutului său ridicat de compuși bioactivi, cum ar fi sesquiterpenele, flavonoizii, sterolii și polizaharidele. Acești compuși conferă plantei proprietăți farmacologice remarcabile, incluzând activități antiinflamatoare, antioxidante, antibacteriene și antitumorale.

În acest studiu, am sintetizat nanoparticule de aur (AuNPs) și argint (AgNPs) utilizând extracte etanolice și apoase de păpădie printr-o metodă de sinteză ecologică. Nanoparticulele au fost caracterizate prin spectroscopie UV-VIS, microscopie electronică de scanare (SEM), dispersie dinamică a luminii (DLS) și dispersie electroforetică a luminii (ELS). Activitatea citotoxică a acestor nanoparticule a fost evaluată pe linie celulară HepG2 folosind testul de viabilitate MTS. Rezultatele indică un efect antitumoral semnificativ al extractelor alcoolice de păpădie, în special după 48 de ore de expunere, fiind comparabil sau chiar superior tratamentului cu Cisplatin (CisPt).

Scopul acestui studiu este de a sintetiza și caracteriza AgNPs obținute din extracte de păpădie, evaluând totodată activitatea citotoxică a acestora asupra celulelor canceroase HepG2.

4.2 Materiale și metode

Metoda de sinteză a nanoparticulelor

Pentru sinteza nanoparticulelor s-au utilizat următoarele probe:

- AgNPsEaq-D – Argint coloidal obținut din extract apos de păpădie.
- AgNPsE_{ETOH5%}D – Argint coloidal obținut din extract etanolic 50%.
- E_{ETOH-D} – Extract etanolic de păpădie.
- Eaq-D – Extract apos de păpădie.

Caracterizarea nanoparticulelor

- Spectroscopia UV-VIS a fost realizată utilizând un spectrofotometru U-0080D UV-Vis (Hitachi, Japonia).
- Microscopia electronică de scanare (SEM) a fost efectuată cu Nova NanoSEM 630 (FEI Company, SUA).

- Dispersia dinamică a luminii (DLS) și dispersia electroforetică a luminii (ELS) au fost utilizate pentru determinarea dimensiunii și a potențialului Zeta (Delsa Nano C, Beckman Coulter, SUA).

Testul de citotoxicitate MTS

Testul MTS a fost utilizat pentru a evalua efectul citotoxic al nanoparticulelor asupra celulelor HepG2, acestea fiind incubate în număr de 1×10^4 celule/puț timp de 24 de ore, urmate de expunerea la extracte și medicamente oncolitice pentru perioade de 24 și 48 de ore. După această etapă, s-au adăugat 20 μ l de reactiv MTS, iar plăcile au fost incubate la 37°C timp de 4 ore, cu citirea absorbției realizată spectrofotometric la 492 nm, determinând astfel procentul de viabilitate celulară în raport cu controlul (considerat 100% viabilitate).

4.3 Rezultate și discuții

Caracterizarea fizico-chimică nanoparticule

Spectroscopia UV-VIS a confirmat reducerea argintului din sarea de azotat de către extractul de pădărie, evidențiindu-se o bandă de absorbție la 457 nm, indicativ al formării nanoparticulelor din extract apos de papadie și 450 nm pentru formarea NP din extract alcoolic (Figura 4.1).

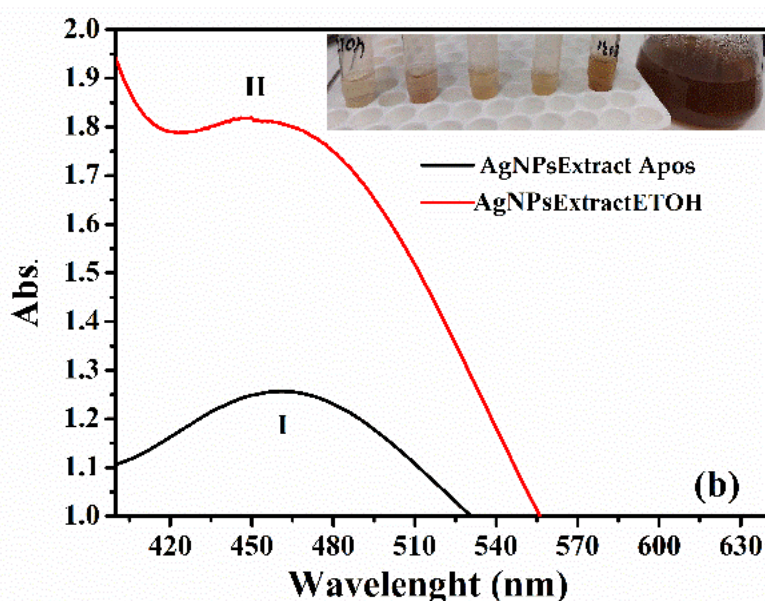


Figura 4.1: Spectrele UV-Vis pentru nanoparticulele de Ag obținute din extract apos (I) și spectrul UV-Vis pentru nanoparticulele de Ag obținute din extract alcoolic (II)

Distribuția a mărimii AuNPsEETOH-D au fost obținute din imaginea SEM (Figura 4.2) prin măsurarea a aproximativ 400 de nanoparticule. Programul *Image J* a fost folosit pentru a extrage datele necesare în acest scop din micrografiile SEM și pentru a compila histogramele. S-a constatat că dimensiunile nanoparticulelor variază de la 11 nm la 43 nm, pentru proba AuNPsEETOH-D.

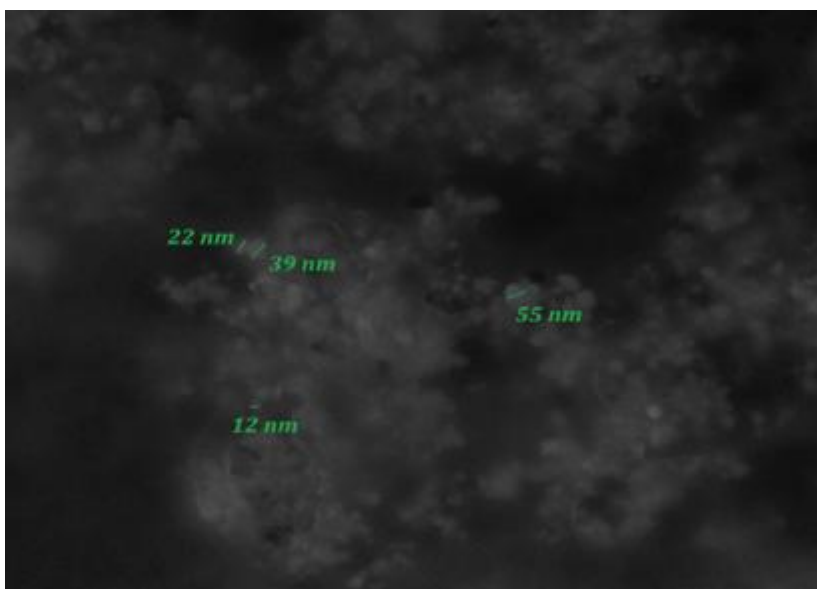


Figura 4.2: Imagine SEM cu NPsAg;

Aceste date au fost apoi compilate în histograme, care au fost cel mai bine potrivite cu o funcție Gaussiană pentru a reprezenta cu exactitate distribuția. Cel mai mare procent de nanoparticule pentru proba AuNPsEETOH-D s-a găsit a fi în intervalul 16 – 24 nm așa cum se poate vedea în Figura 4.3.

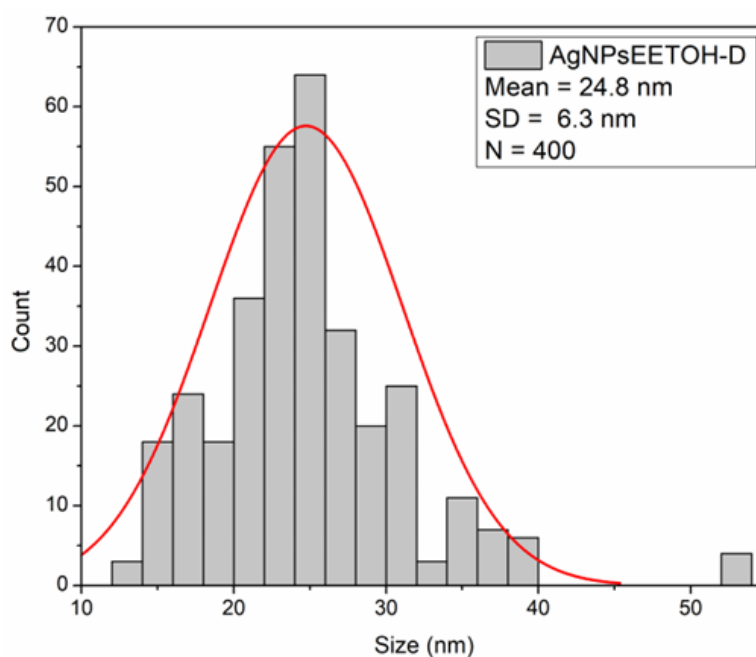


Figura 4.3: Distribuția mărime pentru AuNPsEETOH-D

Testele DLS au arătat că AgNPsEaqD (337,4 nm) au un diametru hidrodinamic mai mic decât AgNPs E_{ETOH}D (500 nm) – Figura 4.4 vs Figura 4.5.

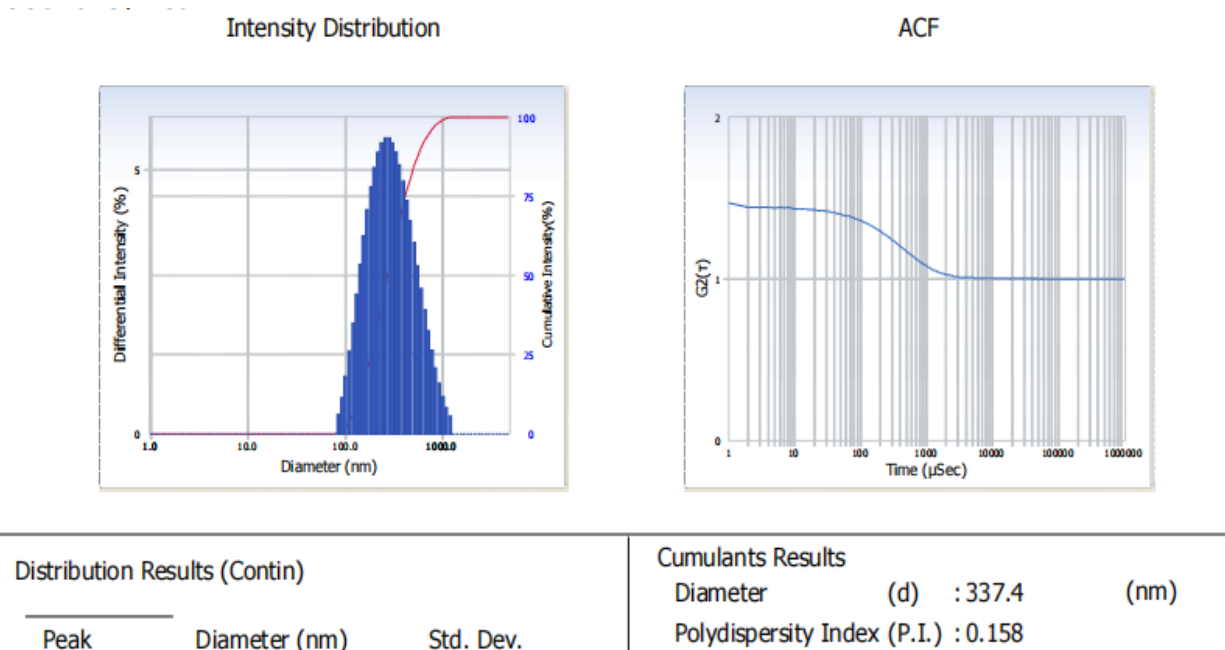
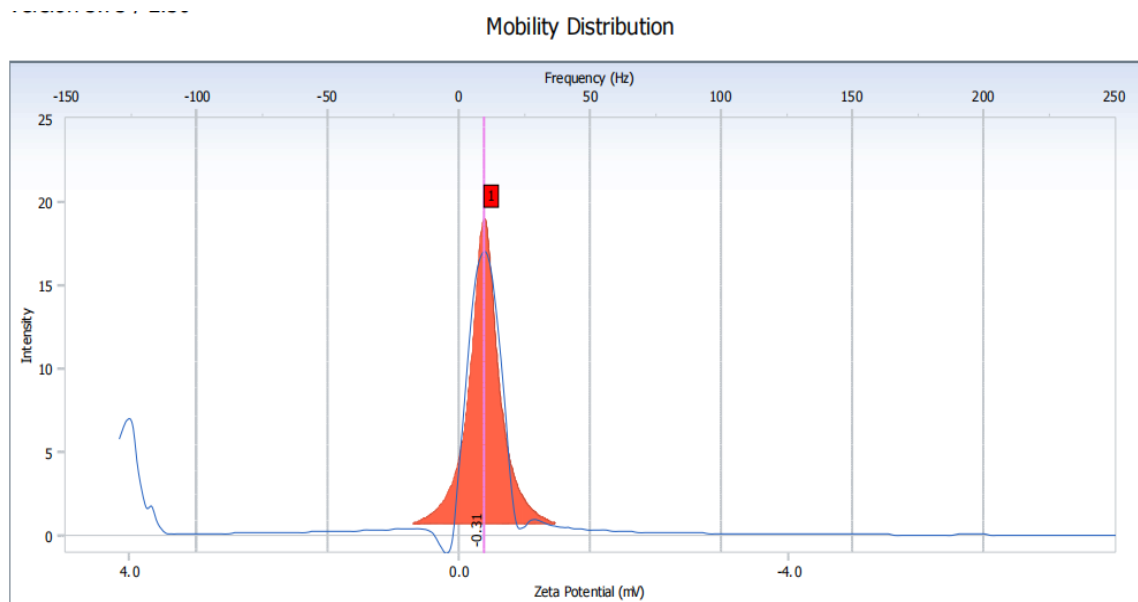


Figura 4.4: Hydrodynamic diameter, polydispersity index for AgNPsEaqD



Measurement Results			
Zeta Potential	: -0.31	(mV)	
		Doppler shift	: 9.85 (Hz)

Figura 4.5: Zeta Potential for AgNPsEaqD

Această diferență arată o agregare mai mare în cazul AgNPs E_{ETOH}D ceea ce a determinat particule încărcate mai mari în soluție decât AgNPsEaqD. Dimensiunea mai mare poate fi datorată unei cantități mai mari de molecule de solvent și ioni adsorbiți pe suprafața nanoparticulelor. Nanoarticulele obținute din extractul etanolic (E_{ETOH}D) pot avea un strat organic protector mai gros, ceea ce le face să pară mai mari în măsurătorile DLS.

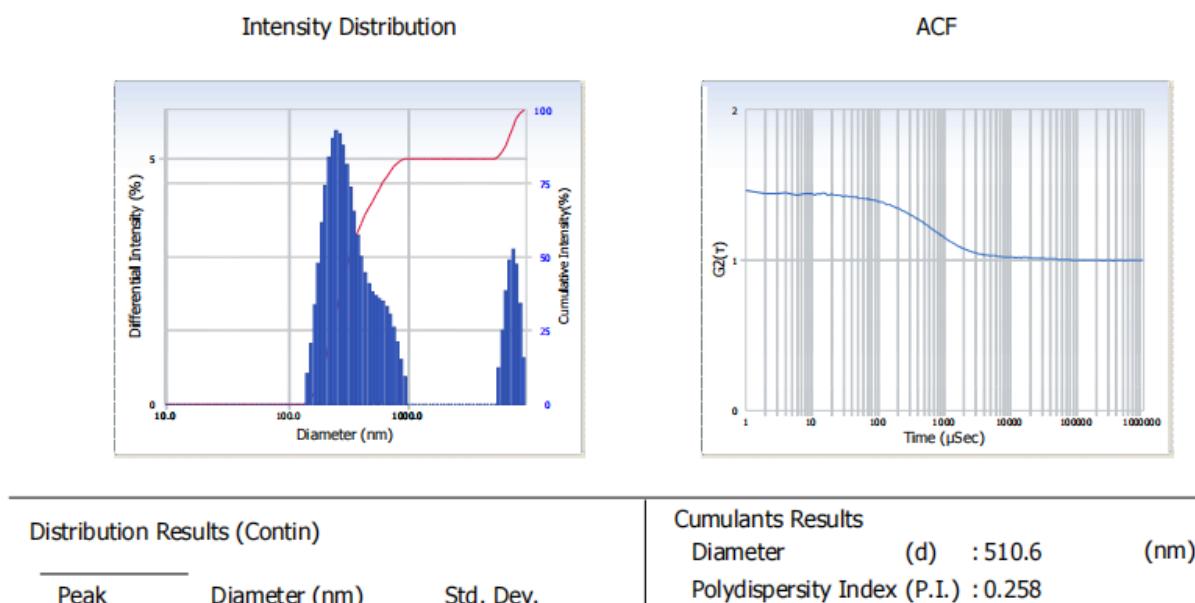


Figura 4.6: Hydrodynamic diameter, polydispersity index for AgNPsEETOHD

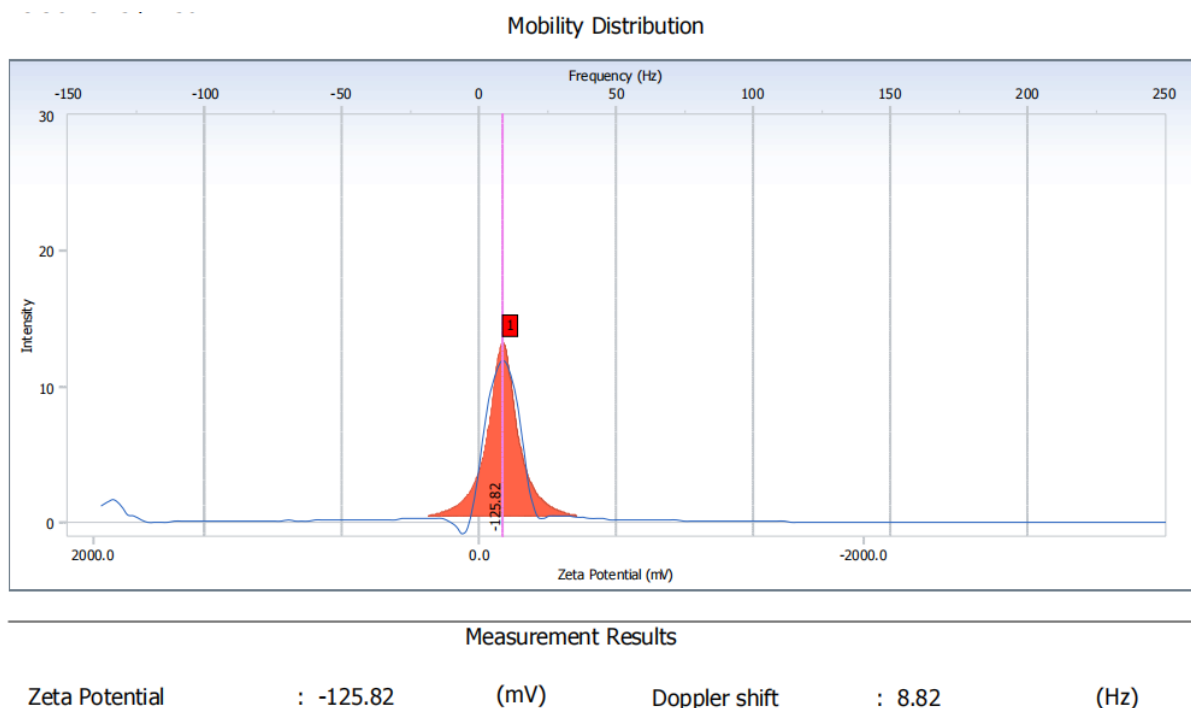


Figura 4.7: Zeta Potential for AgNPsEETOHD

Acest aspect poate influența biodisponibilitatea, transportul în celule și efectul citotoxic al nanoparticulelor. În ceea ce privește potențialul zeta al nanoparticulelor de argint din papadie, cele obținute din extractul apos prezenta un potențial zeta de -0,31 (Figura 4.6) comparativ cu cele obținute din extract etanolic care au prezentat un potențial zeta mare, cu valoare negativă de -125,82mV (Figura 4.7).

Teste biologice

Efectul citotoxic al nanoparticulelor asupra liniei celulare normale HUVEC

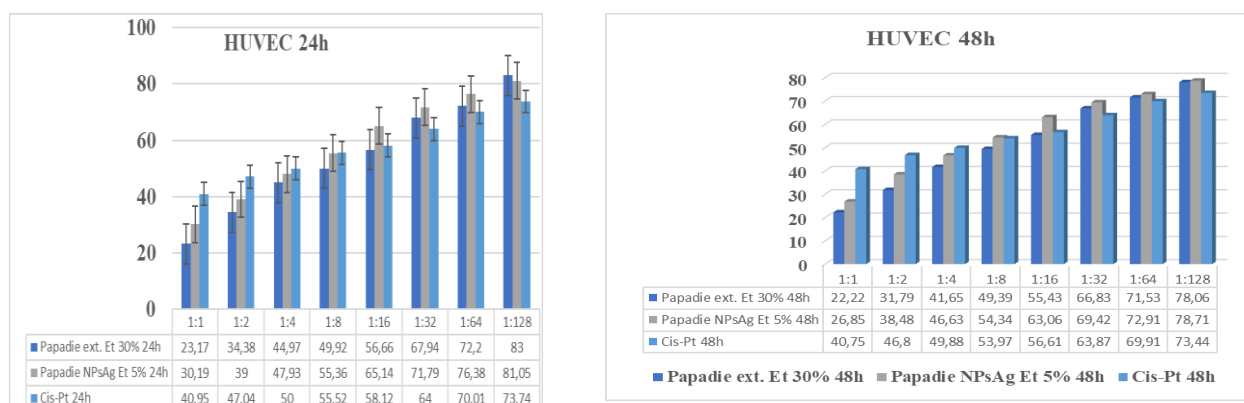


Figura 4.8: Efectul citotoxic (%) al NPsAg sintetizate din păpădie și a substanței de referință Cis-Pt asupra celulei normale HUVEC după 24 h și 48 h de tratament

Efectele substanțelor asupra viabilității celulare

Cis-Pt (Cisplatin) are o toxicitate relativ ridicată, având efecte mai pronunțate la concentrații mai mari (diluții mai mici). Viabilitatea celulară scade progresiv pe măsură ce concentrația crește. NPsAg Et 5% pare să aibă un efect citotoxic mai mare decât extractul simplu de păpădie (Papadie ext. Et 30%), dar mai redus decât Cis-Pt, ceea ce sugerează o potențială activitate moderată împotriva celulelor HUVEC. Păpădie ext. Et 30% prezintă cea mai mică toxicitate dintre cele trei substanțe, având efecte mai reduse asupra viabilității celulare.

În general, după 48h, toxicitatea pare să crească pentru toate substanțele, ceea ce indică un efect cumulativ în timp. Extractul de păpădie și nanoparticulele de argint (NPsAg) își mențin o tendință similară, dar nanoparticulele de argint (NPsAg) au un efect mai pronunțat decât extractul simplu. Cis-Pt rămâne cea mai toxică substanță în ambele intervale de timp.

Comparație între nanoparticule și Cis-Pt

La toate diluțiile, Cis-Pt este cel mai citotoxic, ceea ce era de așteptat, deoarece este un agent chimioterapic puternic.

Nanoparticulele de argint în extract de păpădie (NPsAg) au o toxicitate intermediară între extractul simplu de păpădie și Cis-Pt, ceea ce sugerează o posibilă utilizare ca agent anticancerigen mai puțin agresiv decât Cis-Pt. Extractul de păpădie (Et 30%) are cea mai redusă toxicitate, sugerând o utilizare mai sigură în scopuri terapeutice sau ca adjuvant.

Cis-Pt prezintă cea mai mare toxicitate asupra celulelor HUVEC, urmat de Papadie NPsAg Et 5%, iar Papadie ext. Et 30% are cel mai redus efect citotoxic. Acest lucru sugerează că nanoparticulele de argint combinate cu extractul de păpădie ar putea avea un efect terapeutic mai puțin agresiv decât Cis-Pt, dar cu o eficiență mai mare decât extractul simplu de păpădie. Mai multe studii ar fi necesare pentru a înțelege mecanismele acestor efecte și potențialele aplicații în tratamente medicale.

Efectul citotoxic al nanoparticulelor asupra liniei hepatice HepG2

Graficele prezentate în Figurile 4.9 reprezintă viabilitatea celulară (%) a liniei celulare HepG2 (celule hepatocarcinom) după 24h și 48h de tratament. Concentrațiile variază într-un raport de 1:1 până la 1:128 (indicate prin culori diferite).

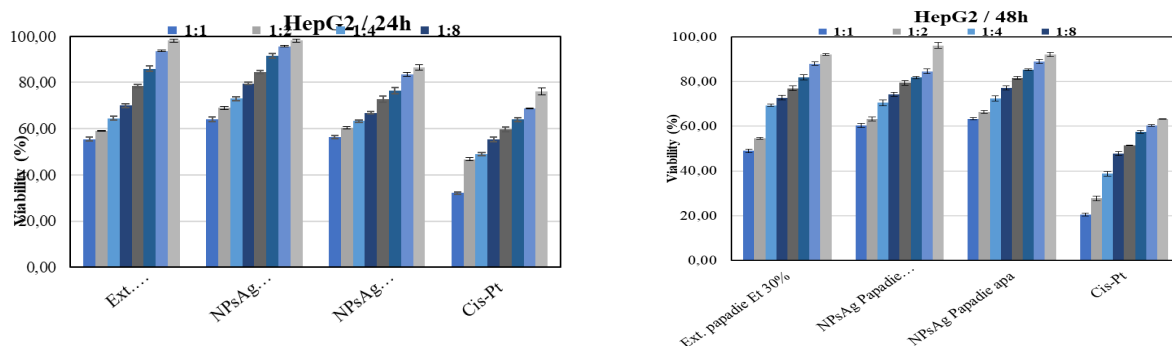


Figura 4.9: Viabilitatea celulară (%) HepG2 după tratamentul de 48 h cu nanoparticulele obținute din peliniță comparativ cu Cis_Pt

În urma analizei rezultatelor prezentate în graficele din **Figura 4.9** se pot face următoarele observații:

- În toate condițiile, viabilitatea celulară scade pe măsură ce concentrația tratamentului crește (de la 1:128 la 1:1).
- Acest lucru sugerează un efect dependent de doză, unde concentrații mai mari sunt mai eficiente în reducerea viabilității celulare.
- E_{ETOH-D} și AgNPsE_{ETOH-D} au un efect mai puțin citotoxic comparativ cu AgNPsEaq-D și Cis-Pt.
- AgNPsEaq-D are o eficiență mai mare decât extractul etanolic, ceea ce poate indica o mai bună eliberare sau stabilitate în acest mediu.
- Cisplatina (Cis-Pt) prezintă cea mai mare citotoxicitate, având cele mai scăzute valori de viabilitate celulară, mai ales la concentrații mari.
- La 48h, se observă o scădere mai pronunțată a viabilității celulare comparativ cu 24h, ceea ce indică un efect cumulativ al tratamentului.
- Cis-Pt a aratat o reducere semnificativă a viabilității după 48h comparativ cu 24h, ceea ce este așteptat pentru un agent chimioterapeutic.
- AgNPsEaq-D pare să aibă o eficacitate crescută față de extractul etanolic, sugerând că formularea sub formă de nanoparticule poate îmbunătăți efectul terapeutic.
- Cis-Pt este cea mai citotoxică, dar tratamentele pe bază de formulaări cu NPs din pădăie pot fi alternativ mai blânde, dar eficiente în timp.
- Efectul este dependent de doză și de timp, cu o reducere mai mare a viabilității la concentrații mari și la 48h.

CAPITOLUL V: EVALUAREA ACȚIUNII ANTIPROLIFERATIVE A EXTRACTULUI DE *CHELIDONIUM MAJUS* ASUPRA LINIILOR CELULARE TUMORALE

5.1 Introducere

Rostopasca (*Chelidonium majus*), o specie care aparține familiei Papaveraceae, este o plantă medicinală cu multiple proprietăți terapeutice, care a fost utilizată din cele mai vechi timpuri datorită efectelor sale benefice asupra sănătății. În prezent, această plantă este tot mai apreciată în medicina alternativă și fitoterapie, fiind recomandată ca adjuvant în peste 150 de afecțiuni, neoplazii, infecții virale, dermatoze, rezistente la tratamentele convenționale.

Studiile academice au investigat compoziția chimică, proprietățile farmacologice și potențialele aplicații medicale ale acestei plante. Administrată intern, *Chelidonium majus* exercită efecte hepatoprotectoare, având proprietăți tonice și regenerative asupra ficatului, precum și acțiuni drenor-biliare, antivirale, colagoge (stimulează secreția biliară) și coleretice (favorizează eliminarea bilei). Datorită spectrului larg de acțiune, rostopasca este considerată un remediu valoros în managementul diverselor afecțiuni hepatice, demonstrând o eficacitate semnificativă în tratamentul hepatitei A și B.

Mecanismele prin care acești compuși activi din *Chelidonium majus* (chelidonia, sanguinarina, berberina) acționează asupra celulelor tumorale, includ inducerea stresului oxidativ, alterarea ciclului celular și activarea căilor apoptotice [223, 224]. Chelidonina, de exemplu, a fost raportată ca având efect inhibitor asupra polimerizării tubulinei, ceea ce duce la blocarea diviziunii celulare în faza G2/M și, implicit, la stoparea proliferării celulelor maligne [225, 226]. De asemenea, studiile au evidențiat că sanguinarina acționează prin modificarea funcției mitocondriale, ceea ce determină eliberarea citocromului c și activarea caspazelor, esențiale în procesul apoptotic [227, 228].

Pe lângă aceste mecanisme directe asupra celulelor canceroase, extractele de *Chelidonium majus* au fost investigate și pentru efectele lor asupra microambientului tumoral, inclusiv capacitatea de a reduce angiogeneza și de a modula răspunsul imun [229, 230]. De exemplu, s-a demonstrat că sanguinarina poate inhiba factorii de creștere endoteliali, împiedicând astfel formarea de noi vase sanguine necesare dezvoltării tumorale [231-233].

Aceste mecanisme susțin potențialul antitumoral al *Chelidonium majus* și justifică investigarea sa suplimentară ca agent adjuvant în terapiile oncologice [234, 235].

5.2 Evaluarea citotoxicității *in vitro* a compușilor studiați pe linii celulare tumorale umane și celule normale

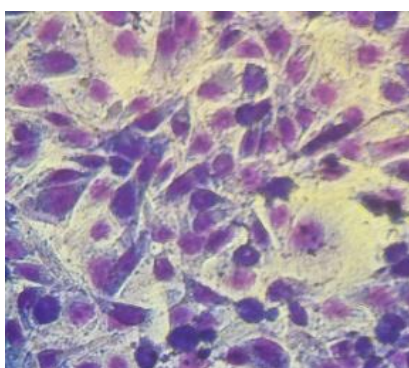
Studiile preclinice *in vitro* reprezintă un pas esențial în determinarea potențialului terapeutic al unor compuși bioactivi, în special în oncologie. Evaluarea citotoxicității permite identificarea efectelor specifice asupra celulelor tumorale, comparativ cu celulele normale, contribuind astfel la stabilirea unui profil de siguranță și eficacitate pentru utilizarea ulterioară în terapiile anticancerigene.

Caracteristicile liniilor celulare standardizate

Pentru investigarea citotoxicității compușilor studiați, în cadrul acestei cercetări a fost utilizată o linie celulară tumorală umană standardizată, derivată din tumori maligne hepatice (HepG-2), comparativ cu celule normale umane (HUVEC). Această linie celulară a fost selectată datorită relevanței lor în modelarea mecanismelor patogenetice ale cancerului hepatic.

Pentru a asigura standardizarea experimentelor și reproductibilitatea rezultatelor, linia celulară utilizată în acest studiu a fost obținută de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), o sursă de referință recunoscută internațional pentru furnizarea de culturi celulare autentificate. Această abordare garantează calitatea, stabilitatea genetică și omogenitatea liniilor celulare, factori esențiali în validarea rezultatelor obținute. Linia celulară HepG-2 a fost obținută dintr-o biopsie hepatică a unui pacient în vârstă de 15 ani de rasă caucaziană diagnosticat cu carcinom hepatocelular. Linia celulară HUVEC este o linie normal umană, endotelială, izolată din endoteliul vascular al unui cordon ombilical, imortalizată în laborator, fiind utilizată drept control normal.

HUVEC



HepG-2

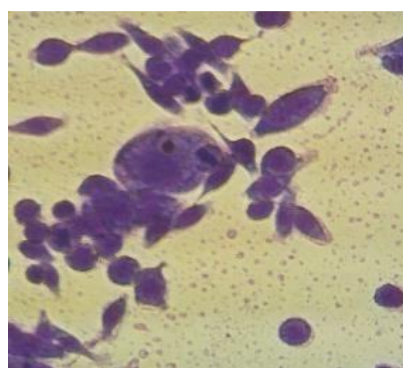


Figura 5.1: Aspecte morfologice ale liniilor celulare netratate utilizate pe parcursul studiilor

5.3 Cultivarea liniilor celulare

Culturile de celule se realizează și se întrețin în spații special amenajate în care trebuie să se asigure un mediu steril. Liniile celulare standardizate folosite în studiu au fost cultivate și menținute conform recomandărilor ECACC (European Collection of Cell Culture, *Fundamental Techniques in cell culture*).

Materiale, reactivi și aparatură

- mediu de cultură DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco), mediu de spălare Hanks' Balanced Buffer Solution (HBSS), ser fetal bovin (FBS), HEPES, L-glutamină, tampon fosfat salin (TFS), acid etilen-diamin-tetraacetic (EDTA ethylene-diaminetetraacetic acid), penicilină / streptomycină 10.000 U/10.000 µg/ml, cisplatin (CisPt) (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, SUA)
- plăci de cultură (flaskuri), tuburi falcon de 15 și 50 ml, pipete sterile de volume diferite
- hotă cu flux laminar, incubator, centrifugă cu răcire și microscop

5.4 Evaluarea citotoxicității celulare prin tehnica colorimetrică (MTS)

Principiul metodei: Citotoxicitatea compușilor utilizați în experimente a fost evaluată utilizând kitul CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega), o metodă colorimetrică rapidă și fiabilă pentru determinarea viabilității celulare, utilizată frecvent în testele de proliferare și citotoxicitate. Testul MTS se bazează pe activitatea dehidrogenazelor mitocondriale din celulele viabile, care catalizează reducerea compusului tetrazolic MTS, inițial de culoare galbenă, la formazan albastru-violet, solubil în mediul de cultură. Cantitatea de formazan generată este direct proporțională cu activitatea enzimatică a celulelor vii și, implicit, cu numărul acestora. Absorbanța soluției de formazan este măsurată spectrofotometric la 490 nm, permițând astfel o cuantificare precisă a viabilității celulare.

5.5 Evaluarea citotoxicității celulare a compușilor studiați

Studiile au fost realizate cu scopul de a evalua efectele unor compuși specifici asupra celulelor tumorale umane HepG-2 (adenocarcinom hepatic), în comparație cu linia celulară normală HUVEC (celule endoteliale ale venei ombilicale umane). Ca martor pozitiv, a fost utilizat cisplatinul (CisPt), un agent citostatic frecvent administrat în tratamentul cancerului hepatic. Liniile celulare au fost expuse la diferite concentrații ale compușilor testați pentru intervale de 24 și 48 de ore.

Pentru determinarea concentrației optime, au fost realizate curbe doză-efect pentru extractul studiat și citostatic, testând diluții seriale de la 1:1 la 1:128. Aceste curbe au evidențiat relația dintre concentrația compusului și viabilitatea celulară, indicând o dependență directă de doză. Rezultatele obținute pot contribui la optimizarea dozelor utilizate în viitoarele studii și la dezvoltarea unor strategii terapeutice eficiente, menite să maximizeze efectul antitumoral și, în același timp, să minimizeze toxicitatea asupra celulelor normale.

Celulele HUVEC au fost tratate cu concentrații diferite de extract de rostopască, comparativ cu cisplatinul, timp de 24 și 48 de ore (Figura 5.4).

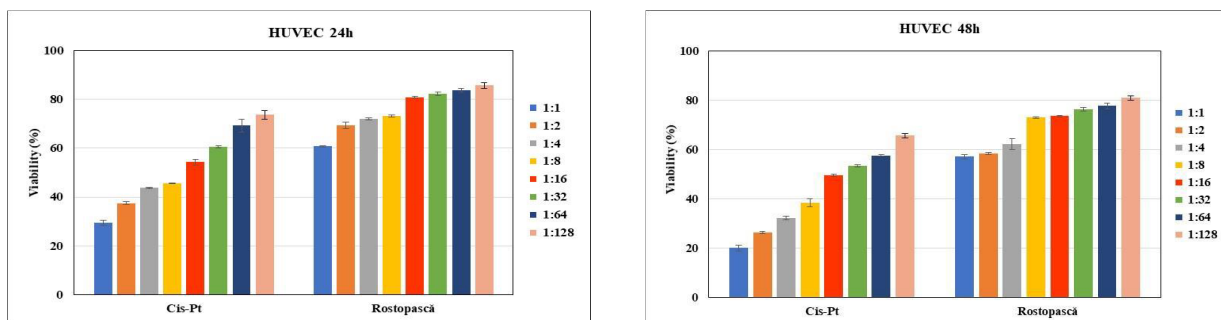


Figura 5.3: Efectul tratamentului asupra celulelor endoteliale normale HUVEC la 24 și 48h

Testele de viabilitate au demonstrat că la 24 de ore de la tratament, extractul de rostopască, a afectat viabilitatea celulelor normale HUVEC doar la diluțiile de 1:1 și 1:2. După 48 de ore de tratament, viabilitatea celulară fiind afectată la diluții de 1:1, 1:2 și 1:4.

Celulele tumorale umane hepatice HepG-2 au fost tratate cu diferite concentrații de rostopască, comparativ cu cisplatinul, timp de 24 și 48 de ore (Figura 5.3).

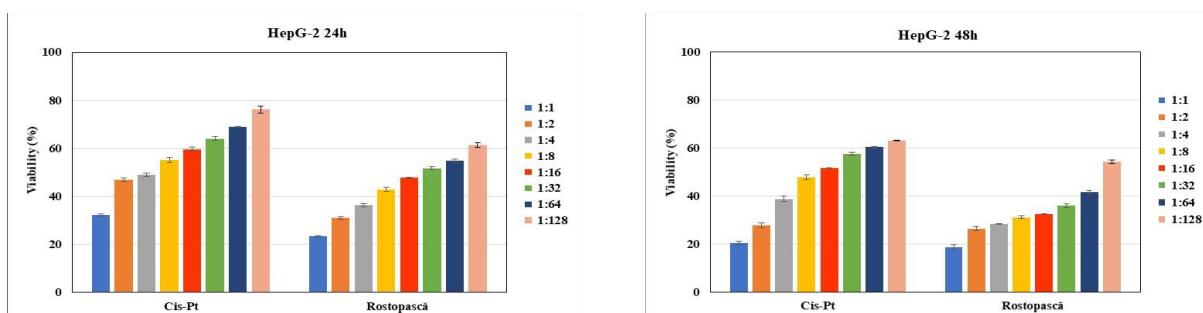


Figura 5.4: Efectul antiproliferativ în celulele tumorale hepatice HepG-2 la 24 și 48h

Tratamentul celulelor tumorale hepatice HepG-2 timp de 24 de ore cu extractul de rostopască, a arătat că acesta, la o diluție de 1:8, a ucis 58% din celulele tumorale, față de cisplatin, care la aceeași diluție a omorât 42%.

Analiza datelor de viabilitate obținute în urma tratamentului liniei tumorale HepG-2 cu extractul de rostopască, arată că după 24 de ore de tratament, acesta are o acțiune mai bună față de cisplatin. După 48 de ore de tratament, extractul de rostopască are un efect antitumoral mai pronunțat decât citostaticul folosit (CisPt).

Utilizarea extractelor din plante, ca modulatori ai răspunsului celular la tratamentul convențional (chimioterapia) deschide noi oportunități și perspective în terapia antitumorală. Numeroase studii au demonstrat că metaboliții secundari extrași din plante medicinale, microorganisme sau alte surse naturale pot acționa sinergic cu agenții chimioterapeutici, îmbunătățind eficacitatea acestora și reducând efectele adverse asociate.

CAPITOLUL VI: ACȚIUNEA ANTIOXIDANTĂ ȘI ANTIBACTERIANĂ A EXTRACTELOR DE *CLEMATIS HERBA*, *MELISSAE FOLIUM*, *TARAXACI HERBA*, *SILYBII FRUCTUS*

6.1. Determinarea cantitativă a compușilor polifenolici

Polifenolii sunt o clasă de compuși chimici organici prezenți în plante, caracterizați prin diverse structuri chimice ce conțin grupări fenolice. Aceștia prezintă multiple acțiuni farmacologice, incluzând activitate antioxidantă, antiinflamatorie și cardioprotectoare.

6.1.1. Materiale și metodă

Determinarea cantitativă a polifenolilor s-a realizat prin metoda spectrofotometrică Singleton, bazată pe reacția polifenolilor totali cu reactivul Folin-Ciocalteu. Absorbanța soluției colorate rezultate a fost măsurată la lungimea de undă de 765 nm, utilizând ca standard acidul galic.

Pentru extracția compușilor fenolici, s-au utilizat produse vegetale uscate (*Clematis herba*, *Melissae folium*, *Taraxaci herba*, *Silybii fructus*), din care s-au realizat extracte etanolicе 50% (m/m) în concentrație de 1%. Procedura de extracție a constat în refluxare pe baie de apă timp de 30 de minute, urmată de filtrare și completare la semn într-un balon cotat.

Metoda spectrofotometrică Singleton, utilizând reactivul Folin-Ciocalteu [236], s-a dovedit a fi precisă și reproductibilă pentru determinarea polifenolilor din extractele etanolicе ale produselor vegetale analizate. Curba de calibrare bine definită și valoarea ridicată a coeficientului de determinare confirmă validitatea metodei pentru analiza compușilor fenolici.

6.1.2. Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în urma determinării conținutului de polifenoli totali exprimat în mg echivalent acid galic/g produs vegetal uscat (mg GAE/g PV uscat), în speciile de plante analizate evidențiază variații semnificative între acestea. Cea mai mare concentrație de polifenoli a fost observată la *Melissa officinalis* (31,6 mg GAE/g material vegetal uscat) și *Clematis vitalba* (31,26 mg GAE/g), în timp ce *Taraxacum officinale* (15,7 mg GAE/g) și *Silybum marianum* (15,5 mg GAE/g) au prezentat valori considerabil mai scăzute. *Melissa officinalis* și *Clematis vitalba*, datorită conținutului lor ridicat de polifenoli, prezintă un potențial farmacologic semnificativ, în special în aplicații destinate prevenirii bolilor asociate stresului oxidativ.

6.2. Acțiunea antioxidantă

6.2.1. Material și metodă

Capacitatea antioxidantă a diferiților compuși joacă un rol esențial în evaluarea potențialelor beneficii pentru sănătate. Una dintre metodele frecvent utilizate pentru

determinarea activității antioxidante este testul DPPH, bazat pe abilitatea antioxidanților de a neutraliza radicalii liberi. Această metodă presupune prepararea unei soluții stabile de DPPH în metanol, caracterizată printr-o culoare violet intens datorată prezenței unui electron liber. În prezența compușilor antioxidanți, DPPH este redus prin transfer de electroni sau atomi de hidrogen, rezultând un compus galben pal [237, 238].

6.2.3. Rezultate și discuții

Activitatea antioxidantă a extractelor de plante testate, determinată prin metoda DPPH de captare a radicalilor liberi, arată o variație semnificativă a capacităților acestora:

- *Clematis vitalba* (88,13%) - cea mai mare activitate antioxidantă dintre plantele testate, cu o capacitate foarte puternică de absorbție a radicalilor liberi. Acest lucru sugerează că acesta conține o concentrație ridicată de compuși antioxidanți activi, cum ar fi flavonoide, polifenoli sau alte substanțe fitochimice bioactive.
- *Melissa officinalis* (68,73%) - capacitate antioxidantă relativ ridicată, deși mai scăzută decât *Clematis vitalba*. Această plantă este cunoscută pentru conținutul său ridicat de acid rosmarinic și alți compuși fenolici, care contribuie probabil la capacitatea sa de a neutraliza radicalii liberi.
- *Taraxacum officinale* (27,22%) - Activitatea antioxidantă moderată.
- *Silybum marianum* (21,41%) - cea mai scăzută activitate antioxidantă dintre plantele testate. *Silybum marianum* este cunoscut pentru flavonolignanii din compoziție (cum ar fi silimarina), care au proprietăți antioxidante, dar potențialul său de neutralizare a radicalilor liberi în acest test pare să fie mai puțin eficient în comparație cu celelalte.

6.3. Acțiunea antimicrobiană

Scopul acestui studiu este de a investiga activitatea antimicrobiană a extractelor din *Taraxacum officinale* (tinctură) și *Chelidonium majus* (tinctură) printr-o abordare multidimensională care include metode calitative, cantitative și analiza activității antibiofilm.

A fost evaluată *in vitro* proprietățile antibiofilm ale extractelor vegetale *Taraxacum officinale* și *Chelidonium majus* de a inhiba formarea biofilmelor microbiene pe substraturi inerte. Pentru această evaluare, s-a utilizat entru această evaluare, s-a utilizat metoda microtitrației cu cristal violet 1%, care permite măsurarea gradului de formare a biofilmelor în prezența diferitelor concentrații de extracte.

Evaluarea calitativă a activității antimicrobiene a extractului de *Taraxacum officinale* a evidențiat inhibarea creșterii microbiene împotriva tulpinilor *E.fecaliis* ATCC 29212 (9mm), *P.aeruginosa* ATCC 27853 (8mm cu creștere microbiană slabă în zona de inhibiție) și *C.albicans* ATCC 10231 (8mm cu numeroase colonii în interiorul zonei de inhibiție. În schimb

S.aureus ATCC 25923 și *E.coli* au prezentat rezistență la extract, fără inhibarea creșterii microbiene.

Extractul de *Chelidonium majus* a demonstrat activitate antimicrobiană inhibând *Candida albicans* ATCC 10231 cu halou de 7mm. De asemenea, a fost observată și inhibarea creșterii bacteriene la *e.coli* ATCC 25922 (cu halou de 7mm) și *E.fecalis* ATCC 29212 cu un halou de 11mm. Extractul nu a avut efect împotriva *S.aureus* ATCC25923 și *P.aeurginosa* ATCC 27853.

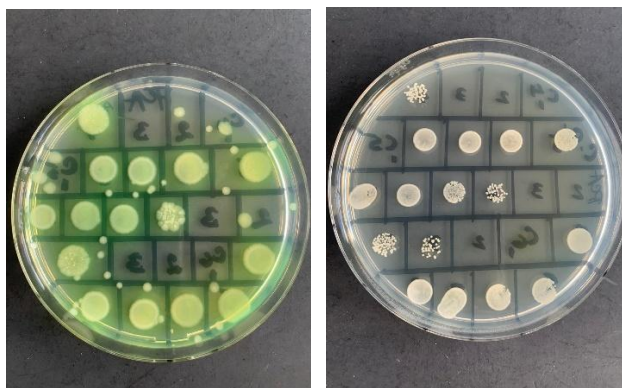


Figura 6.1: Rezultatele testării activității antimicrobiene: Mediu agarizat, însămânțat cu picături din microplăci cu 96 de godeuri cu tulpini de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* și *C. albicans* după incubare timp de 18-24h la 37°C.

După incubarea microplăcilor ELISA timp de 24 de ore, absorbția cristal violetului a fost citită spectrofotometric la 492 nm pentru a determina eficiența fiecărui extract în prevenirea dezvoltării biofilmelor.

S-a determinat concentrația minimă a extractelor necesară pentru inhibarea formării biofilmelor prin compararea valorilor absorbției cu cele ale controlului pozitiv. Rezultatele obținute au fost analizate pentru a identifica diferențele în eficiența extractelor asupra bacteriilor Gram-pozitive, Gram-negative și fungilor.

Pe baza datelor experimentale, s-a evaluat posibilitatea utilizării acestor extracte vegetale în combaterea infecțiilor asociate biofilmelor, care sunt deosebit de rezistente la tratamentele antimicrobiene convenționale.

6.4. Concluzii

Activitatea antioxidantă pronunțată a speciilor *Melissa officinalis* și *Clematis vitalba* poate fi corelată cu conținutul lor ridicat de polifenoli. În consecință, aceste specii pot avea un potențial farmacologic și nutrițional sporit, în special în aplicații care vizează prevenirea bolilor legate de stresul oxidativ.

Testarea calitativă a activității antimicrobiene a demonstrat că extractele vegetale inhibă creșterea și dezvoltarea tulpinilor microbiene testate. Rezultatele obținute sunt promițătoare, susținând necesitatea unor cercetări suplimentare asupra caracteristicilor biochimice ale acestor extracte, în vederea formulării unor strategii eficiente pentru combaterea infecțiilor bacteriene și fungice la om.

CAPITOLUL VII: SINERGISMUL *IN VITRO* DINTRE NANO-PARTICULE OBȚINUTE PRIN METODE *GREEN* ȘI MEDICAMENTE ANTITUMORALE DE ULTIMĂ GENERAȚIE ASUPRA LINIILOR CELULARE

7.1 Introducere

Obiectivul principal al acestui studiu este de investigare a efectelor sinergice dintre nanoparticulele derivate din *Clematis vitalba* și *Taraxacum officinale* utilizate în combinație cu medicamente anticancerigene pentru carcinomul hepatic.

Studiile anterioare au arătat că extractele de pădărie și nanoparticulele biogenice obținute din aceasta au activitate antitumorală semnificativă, comparabilă cu cisplatin și doxorubicin, doi dintre cei mai importanți agenți chimioterapici utilizați în cancerul mamar, colorectal și hepatocelular. În acest studiu, nanoparticulele sintetizate au fost testate în combinație cu medicamente antitumorale pentru tratamentul cancerului hepatic. Sunitinib și Imatinib au fost selectate ca agenți de referință, fiind inhibitori de tirozin-kinază cu o activitate antitumorală puternică în mai multe tipuri de cancer, inclusiv în carcinoamele hepatocelulare avansate sau metastatice.

Am analizat efectul combinat al acestor terapii asupra viabilității, proliferării și mecanismelor apoptotice în celulele de hepatocarcinom, comparându-le cu celulele hepatice normale. Prin această cercetare, ne propunem să evaluăm îmbunătățirea eficacității terapeutice și reducerea efectelor adverse, deschizând noi perspective pentru tratamente inovatoare în cancerul hepatic.

7.2 Metode experimentale

7.2.1 Biosinteza nanoparticulelor utilizând extracte vegetale

Procedeul de obținere a nanosistemelor terapeutice utilizează principiile sintezei verzi (*Green Chemistry Principles*) a bio-nanoparticulelor cu ajutorul diverselor extracte vegetale alcoolice sau apoase. Această metodă este sigură, simplă, economică, netoxică, ecologică și prezintă avantajul reproductibilității și durabilității, formele finale fiind adesea mult mai stabile.

7.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor biosintetizate din extracte vegetale

Caracterizarea nanoparticulelor obținute prin metode *green*, din punct de vedere fizico-chimic, s-a realizat utilizând diferite tehnici moderne de evaluare specifică a dimensiunii, formei și aspectului acestora.

Proprietățile de absorbție ale AgNPs au fost evaluate folosind un spectrofotometru UV-Vis cu matrice de fotodiode, model U-0080D (Hitachi, Japonia). Diametrul hidrodinamic și sarcina

de suprafață a nanoparticulelor de argint au fost analizate folosind un aparat Beckman Coulter Delsa Nano C echipat cu capacități de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) și împrăștiere electroforetică a luminii (ELS).

Fluctuațiile dependente de timp ale intensității luminii laser au fost generate prin iluminarea nanoparticulelor cu o diodă laser dublă de 30 mW, iar investigarea morfologică a nanoparticulelor a fost efectuată utilizând un microscop electronic (Nova NanoSEM 630) cu scanare și emisie de câmp (FE-SEM) care funcționează la o tensiune de accelerare de 10.0 kV și o mărire de 200 000x.

Monitorizarea prin spectroscopia de absorbție în UV-Vis a nanoparticulelor biosintetizate din extracte vegetale

În figurile 7.1 și 7.2 au fost caracterizate spectral, prin intermediul spectrometriei de absorbție în UV-Vis, probele înregistrate în timpul sintezei nanoparticulelor de argint (AgNPs) din *Melissa officinalis* (ME AgNPs) și, respectiv, din *Clematis vitalba* (CVE AgNPs).

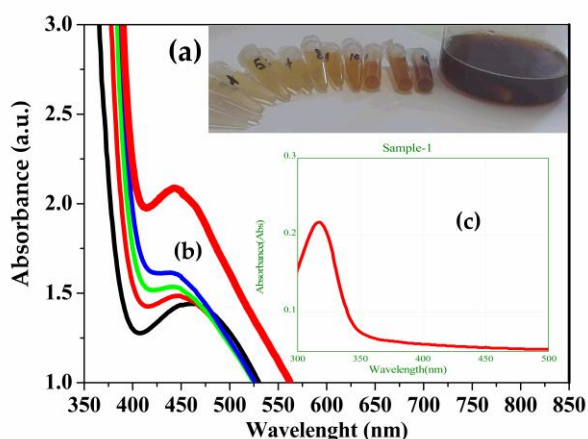


Figura 7.1: (a) Schimbarea culorii soluției de la roșu-marونیu la maro-închis ca urmare a bioreducerii Ag de către extractul de *Melissa officinalis*; (b) Spectrele UV-Vis ale probelor ME AgNPs obținute prin reducerea în timp cu extractul de *Melissa officinalis*; (c) Spectrele UV-Vis ale soluției apoase de AgNO₃ 0.5 mM

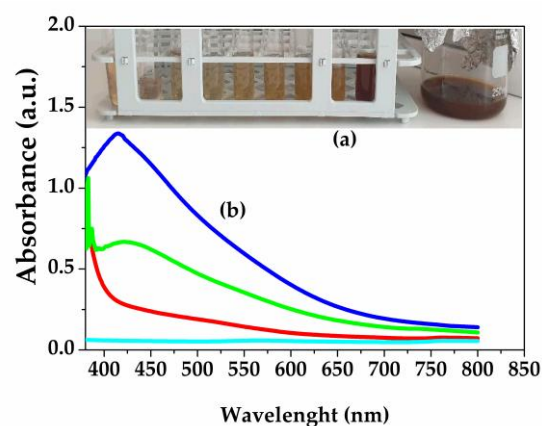


Figura 7.2: (a) Schimbarea culorii soluției de la roșu-marونیu la maro-închis ca urmare a bioreducerii Ag de către extractul de *Clematis vitalba*; (b) Spectrele UV-Vis ale probelor de CVE AgNP obținute prin reducerea în timp cu extractul de *Clematis vitalba*.

După cum se observă în figurile 7.1(a) și 7.2(a), a existat o schimbare a culorii de la un roșu-marونیu la un maro-închis, după amestecarea soluției de AgNO₃ cu extractele vegetale. Această schimbare de culoare a fost atribuită formării nanoparticulelor de argint. În plus, formarea nanoparticulelor a fost confirmată de apariția unor maxime de absorbție cu valori cuprinse între 400-460 nm pentru ambele sinteze. Figura 7.1(b) ilustrează o absorbție maximă inițială de 453 nm, care apoi s-a deplasat la o valoare mai mică și s-a stabilizat la 440 nm după 30 de minute pentru formarea nanoparticulelor de argint biosintetizate din extractul de roiniță (ME AgNPs).

Astfel, pentru nanoparticulele de argint biosintetizate din *Clematis vitalba* s-au obținut nanoparticule de dimensiuni mai mici comparativ cu cele de la roiniță, deși volumul adăugat din

extractul vegetal a fost puțin mai mare, raportul dintre sarea de argint și extractul de *Clematis* fiind de 2:1 (v:v).

Evaluarea nanoparticulelor prin tehnicile DLS, ELS și SEM

În acest studiu, împrăștierea dinamică a luminii (DLS), împrăștierea luminii electroforetice (ELS) și microscopia electronică cu scanare (SEM) au fost folosite pentru a analiza interacțiunile a două tipuri de nanoparticule de argint biogene în formele lor finale coloidale post-biosinteză. Deși extractele de plante au fost filtrate înainte de a fi utilizate pentru biosinteza nanoparticulelor, nanoparticulele în sine nu au fost purificate, ceea ce a condus la posibilitatea ca particulele de extract mai mari să rămână alături de nanoparticule.

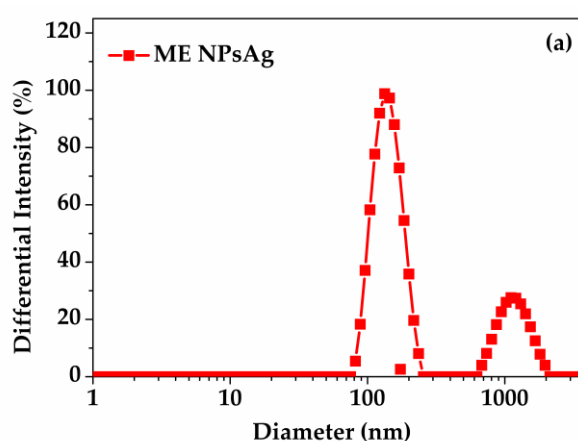


Figura 7.3: (a) Măsurătorile DLS pentru ME AgNPs

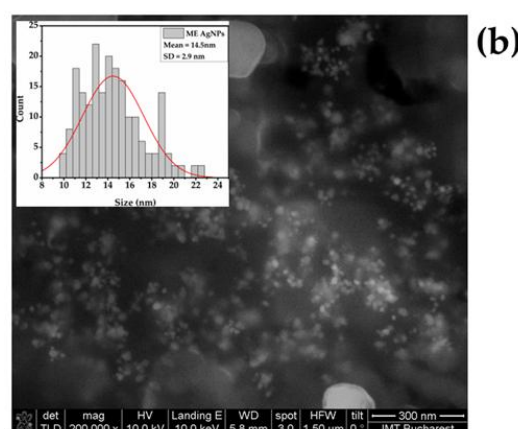


Figura 7.3: (b) Imaginile SEM pentru ME AgNPs

Figura 7.3 (a) ilustrează distribuțiile de mărime bazate pe intensitate pentru nanoparticulele de argint sintetizate folosind extractul de *Melissa officinalis* (ME AgNPs). Profilul de distribuție a dimensiunilor a dezvăluit două populații de particule: o distribuție largă variind de la 75 nm la 255 nm, centrată la 143 nm și o populație de dimensiune mai mare, centrată la 1108 nm, aceasta din urmă fiind atribuită particulelor mai mari din extractul de *Melissa officinalis*.

Imaginea SEM a soluției coloidale cu nanoparticule și extract de roiniță (Figura 7.3 (b)), după deshidratare, dezvăluie că nanoparticulele au fost considerabil mai mici decât cele determinate prin tehnica DLS, sugerând faptul că acestea au fost acoperite cu compuși încărcăți negativ din extractul vegetal. Această observație este coroborată de stabilitatea potențialului zeta negativ de -12.2 mV pentru nanoparticulele din extractul de roiniță, așa cum se arată în Figura 7.3 (c).

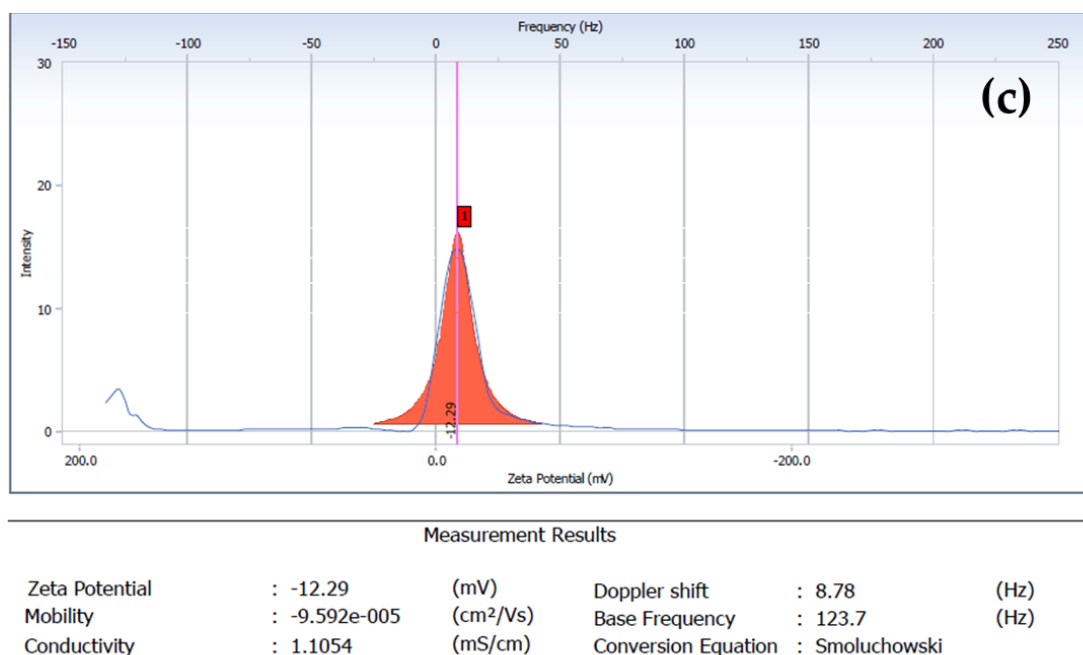
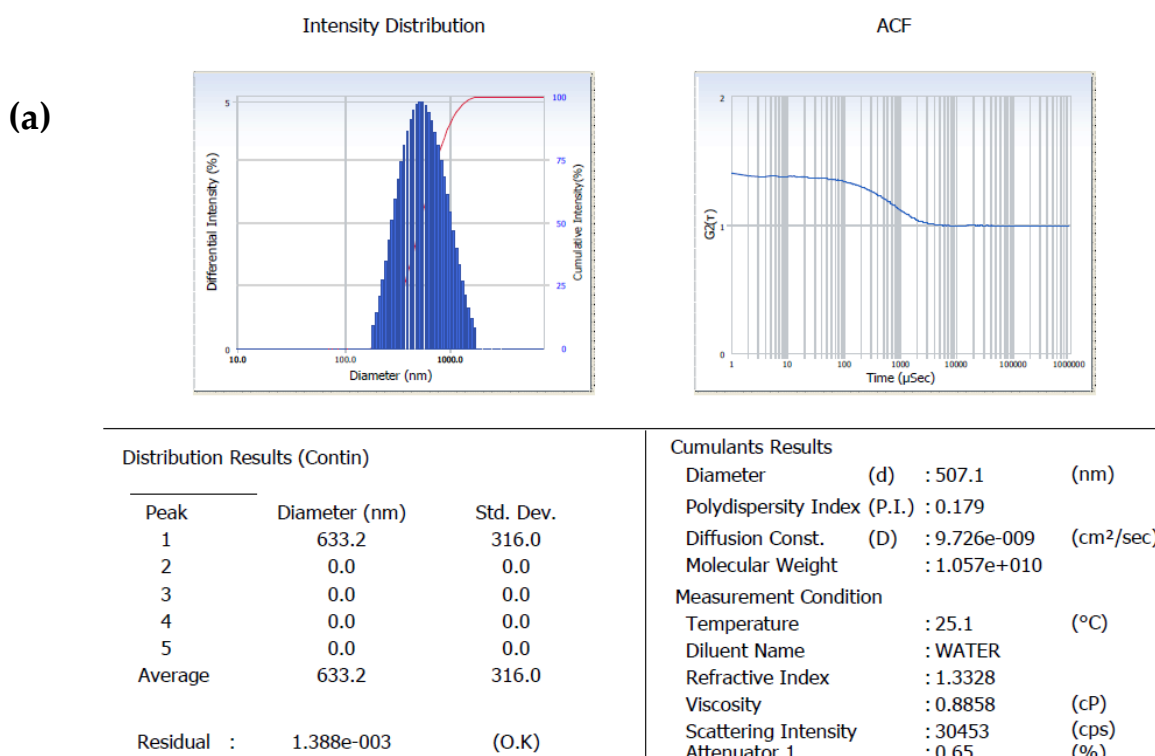


Figura 7.3: (c) Potențialul zeta (mV) al ME AgNPs.

Pentru nanoparticulele sintetizate din *Clematis vitalba*, dimensiunea lor foarte mică a dus la apariția fenomenului de agregare, confirmat de o creștere a diametrului hidrodinamic și, în consecință, a condus la un potențial zeta negativ, dar foarte scăzut, indicând instabilitate în soluția de nanoparticule rezultată.

Figura 7.4 (a-c) prezintă diametrul hidrodinamic, imaginea SEM cu histograma inserată și potențialul zeta înregistrat pentru nanoparticulele de argint derivate din extractul de *Clematis vitalba* (CVE AgNPs).



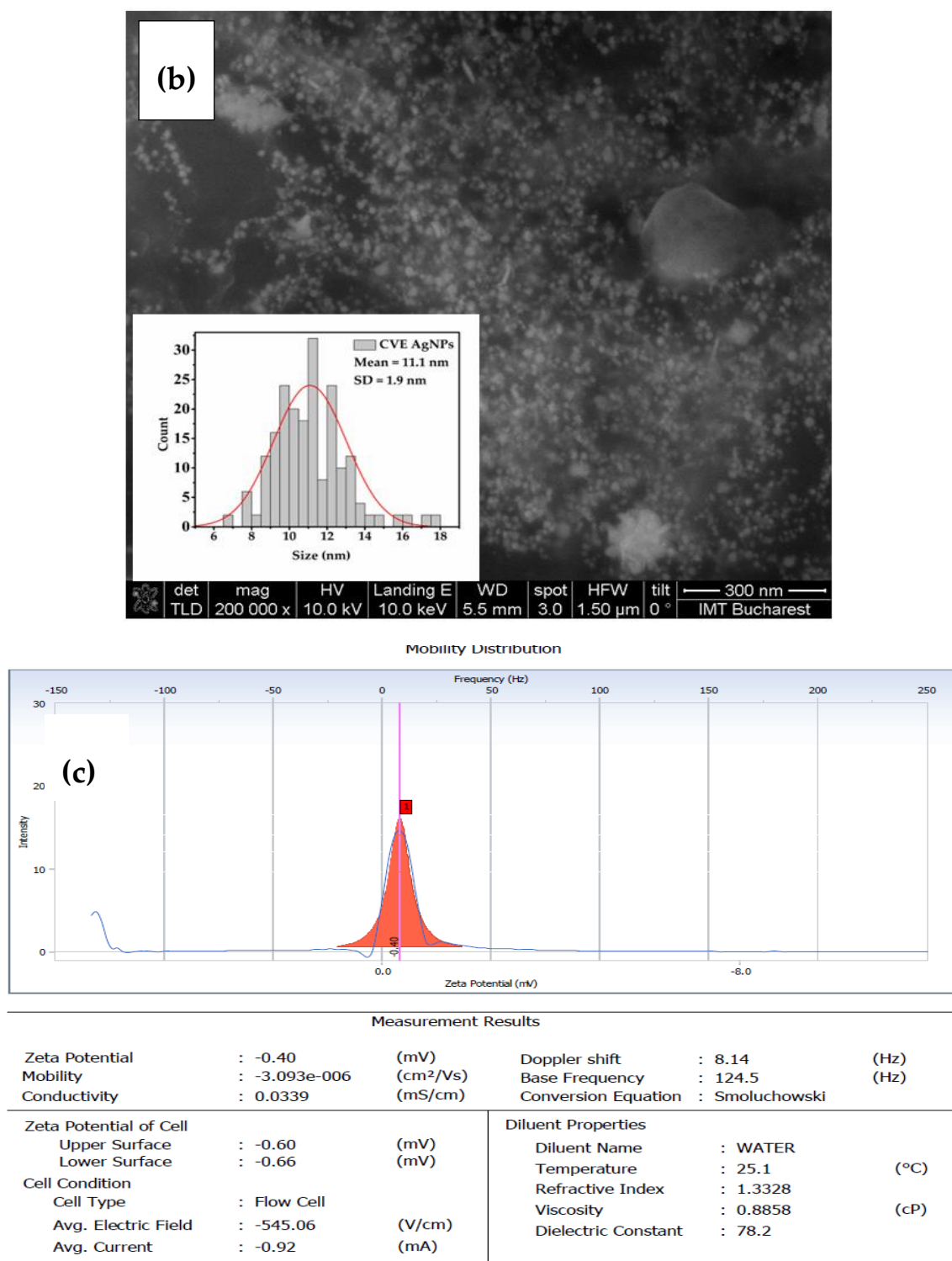


Figura 7.4: (a) Măsurătorile DLS pentru CVE AgNPs; (b) Imaginile SEM pentru CVE AgNPs; (c) Determinarea potențialului zeta (mV) al CVE AgNPs.

7.3 Testarea antitumorală *in vitro*

7.3.1 *Taraxacum extractum* (TE)

Figurile 7.5(a) și 5(b) ilustrează viabilitatea celulară în tratamentul liniei de celule tumorale hepatice HepG2 cu probe derivate din pădărie după 24 de ore și 48 de ore. Diferite concentrații de tratamente au fost aplicate liniei de celule tumorale hepatice HepG2. Variația valorilor sugerează o eficacitate diferită a tratamentului în funcție de concentrație și timp.

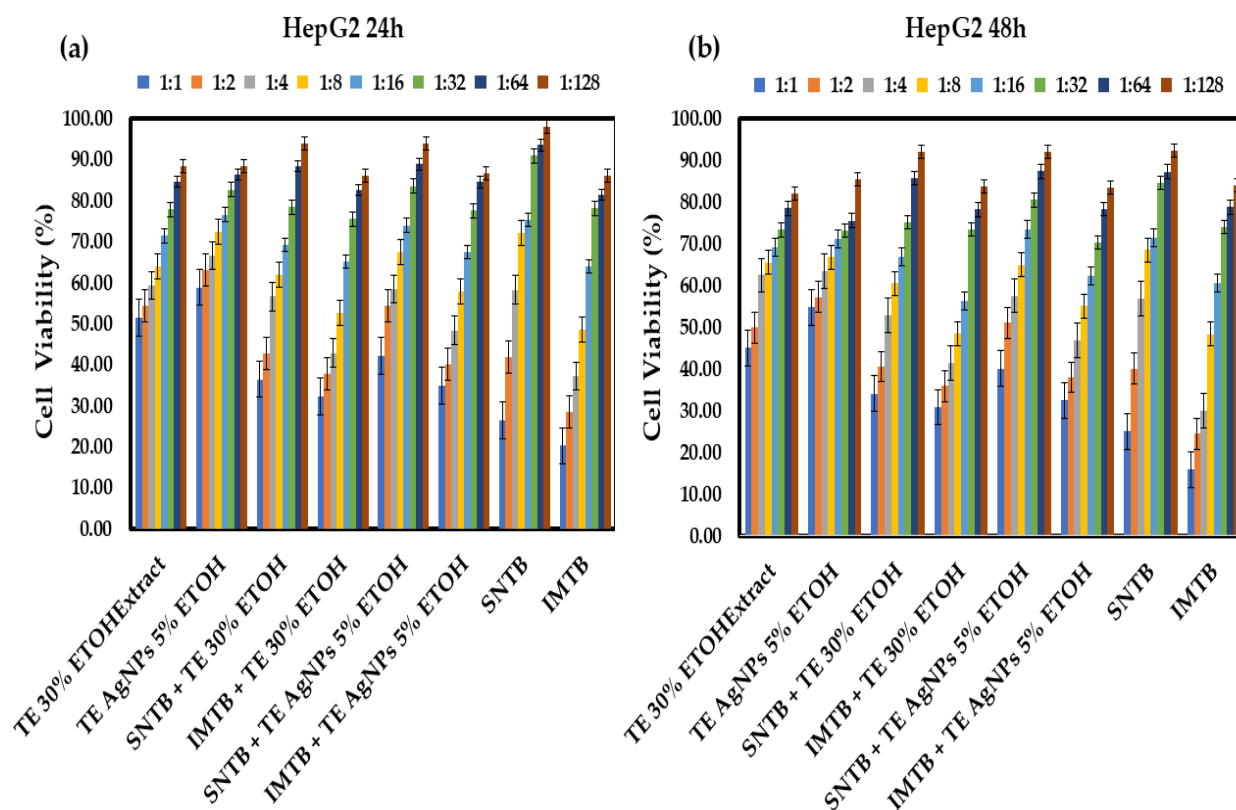


Figura 7.5: Viabilitatea celulară (%) a liniilor HepG2 după: (a) 24 de ore de tratament cu diferite diluții de probe pe bază de extract de Taraxaci și medicamentele chimioterapeutice Sunitinib și Imatinib și (b) prezintă aceleași măsurători după 48 de ore de tratament.

La 24 de ore, fiecare tratament prezintă o gamă de valori cu intensități diferite. Activitatea antitumorală a tuturor probelor este evidentă, în special la diluții până la o anumită concentrație. Medicamentele demonstrează cel mai puternic efect asupra celulelor tumorale hepatice la această diluție. Combinația de extract alcoolic de 30% de pădărie demonstrează aproape același efect citotoxic ca această combinație cu nanoparticule de argint derivate din pădărie (TE AgNPs). Cu toate acestea, adăugarea de nanoparticule nu duce la o îmbunătățire a efectului antitumoral asupra liniei de celule hepatice HepG2 după 24 de ore.

După 48 de ore, tratamentele par să prezinte același comportament; cu toate acestea, diluțiile mai mici devin mai eficiente, demonstrând treptat citotoxicitatea împotriva celulelor tumorale în timp. Cu toate acestea, probele care conțin nanoparticule de argint nu prezintă nicio îmbunătățire a eficacității antitumorale ($p > 0.05$), sugerând că această combinație este mai puțin eficientă decât agenții chimioterapeutici convenționali.

Deși rezultatele obținute pentru probele pe bază de pădărie, în comparație cu loturile de control (sunitinib și imatinib), nu au fost semnificative statistic, putem spune că viabilitatea celulelor tumorale hepatice din loturile tratate cu TE AgNPs și medicamente sintetice este foarte apropiată de cea obținută pentru loturile martor. În plus, au fost investigate efectele toxice ale

probelor derivate din pădărie asupra liniei celulare normale HUVEC. Deși un efect citotoxic asupra celulelor tumorale hepatice a fost observat în mod clar atât la 24, cât și la 48 de ore, este de preferat ca aceste probe să nu exercite efecte toxice asupra celulelor HUVEC normale.

Efectul citotoxic al probelor derivate din pădărie a fost, de asemenea, observat în celulele HUVEC, în mod similar cu medicamentele chimioterapeutice. Cu toate acestea, s-a observat o ușoară îmbunătățire a viabilității celulare atunci când sunitinib a fost administrat alături de nanoparticule de argint, ceea ce indică faptul că toxicitatea sunitinibului asupra celulelor endoteliale este atenuată prin adăugarea de nanoparticule de argint. Nanoparticulele de argint biosintetizate din pădărie au fost documentate în mai multe studii ca posedă efecte antioxidante, protejând astfel celulele de stresul oxidativ indus de sunitinib.

7.3.2 *Clematis vitalbae extractum* (CVE)

Figurile 7.6(a) și 7.6(b) ilustrează viabilitatea celulară în urma tratamentului celulelor HepG2 cu probe derivate din specia *Clematis vitalba*. Dintre cele trei extracte analizate, *Clematis vitalba* a demonstrat cea mai pronunțată citotoxicitate împotriva liniei de celule hepatice HepG2.

Acest efect citotoxic a persistat timp de 24 de ore și timp de 48 de ore chiar și la cea mai mare diluție de 1:128. În plus, atunci când sunt combinate cu nanoparticule de argint (CVE AgNPs), citotoxicitatea a fost redusă, dar a rămas semnificativă statistic ($p < 0.05$) la primele două diluții (1:1 și 1:2).

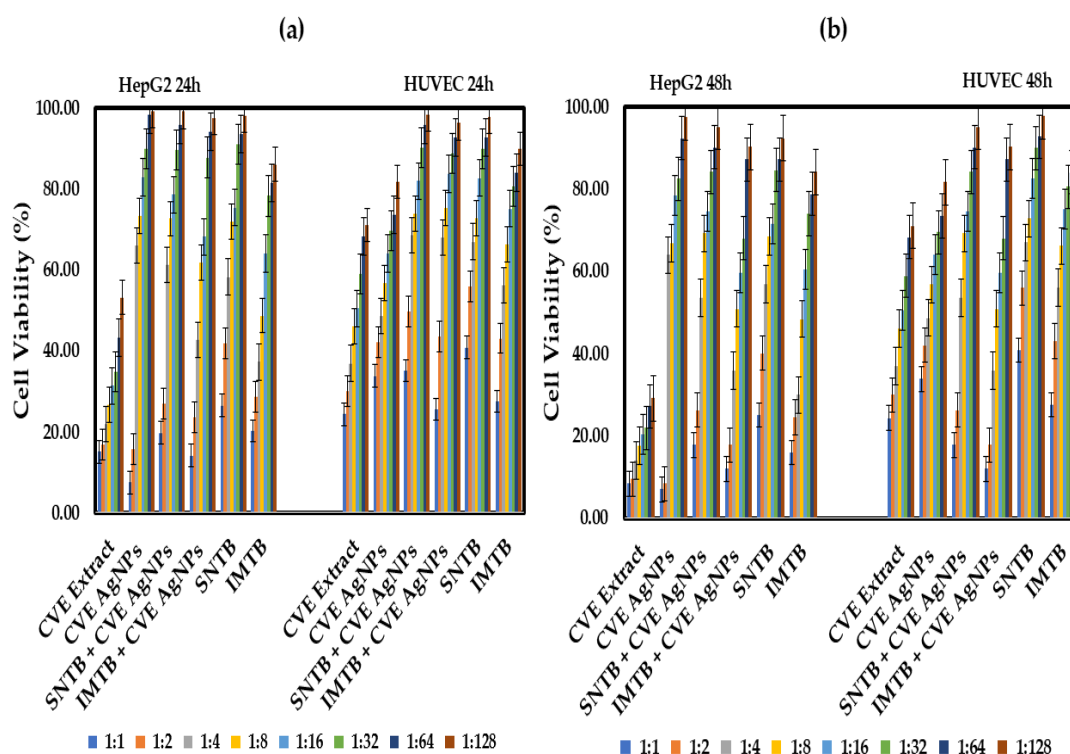


Figura 7.6: Viabilitatea celulară (%) după: (a) 24 de ore de tratament cu HepG2 și HUVEC cu probe pe bază de *Clematis vitalbae extractum* și (b) 48 de ore de tratament cu HepG2 și HUVEC cu probe pe bază de *Clematis vitalbae extractum*.

Este important de subliniat faptul că citotoxicitatea extractului de *C. vitalba* pe celulele HUVEC a fost observată la o magnitudine mai mică. Cu toate acestea, proliferarea celulară normală nu a fost afectată la diluții mai mari - diluții la care extractul a inhibat eficient proliferarea celulelor tumorale hepatice.

O constatare suplimentară demnă de remarcat a fost că atât extractul, cât și mostrele derivate, inclusiv nanoparticulele și combinația lor cu medicamente, au prezentat un efect antitumoral mai puternic în comparație cu administrarea de medicamente sintetice în monoterapie, în special la diluții de până la 1:2 sau 1:4.

Toate grupurile de tratament aplicate au fost comparate separat cu cele 2 loturi de control (sunitinib - SNTB și imatinib - IMTB), și de aceea analiza statistică confirmă observațiile noastre, deoarece semnificația statistică ($p < 0.05$) a fost obținută în timpul testelor post-hoc după cum urmează: CVE 1:1 vs SNTB ($p = 0.004$), CVE 1:2 vs SNTB ($p = 0.010$), vs. CVE 1:4 vs SNTB ($p = 0.035$), CVE AgNPs 1:1 vs SNTB ($p = 0.005$), CVE AgNPs 1:2 vs SNTB ($p = 0.005$), SNTB + CVE AgNPs 1:1 vs SNTB ($p = 0.000$) și SNTB + CVE AgNPs 1:2 vs SNTB ($p = 0.018$). Aceste rezultate concrete evidențiază faptul că atât CVE (1:1, 1:2, 1:4) cât și AgNPs CVE (diluție 1:1 și 1:2) au determinat o scădere semnificativă a viabilității celulelor tumorale HepG2 în comparație cu medicamentul chimioterapeutic sintetic sunitinib.

Descoperirile generale subliniază că formulările cu nanoparticule îmbunătățesc semnificativ potența medicamentelor și potențialul sinergic, iar combinațiile pe bază de CVE-NP demonstrează cea mai consistentă sinergie, în special cu SNTB și IMTB. De asemenea, datele evidențiază că combinațiile pe bază de Sunitinib tind să producă efecte dependente de doză, în timp ce combinațiile pe bază de Imatinib mențin o sinergie mai stabilă la mai multe niveluri de inhibiție.

7.4. Concluzii

În concluzie, s-a confirmat că administrarea concomitentă de sunitinib sau imatinib și nanoparticule de argint biosintetizate din extracte vegetale a îmbunătățit viabilitatea celulelor normale HUVEC, sugerând un efect protector împotriva toxicității medicamentului de sinteză.

Toate cele trei extracte au prezentat potențial antitumoral marcant, combinația lor cu nanoparticule de argint prezentând diferite grade de succes. Combinația de TE cu AgNP a avut rezultate slabe în comparație cu extractul etanolic 30% atunci când este utilizat pe liniile celulare HepG2, nefiind un efect semnificativ asupra viabilității acestora. Mai mult, probele derivate din păpădie au prezentat efecte citotoxice asupra celulelor normale HUVEC, similare cu cele ale medicamentelor chimioterapeutice de control.

CAPITOLUL VIII: STUDIUL PRIN ANDOCARE MOLECULARĂ A UNOR PRINCIPII ACTIVE DIN PLANTE MEDICINALE ȘI INHIBITORI DE TIROZIN-KINAZĂ

Andocarea moleculară este o metodă computațională care permite aflarea modului în care o moleculă numită de obicei ligand se leagă de o macromoleculă numită receptor.

8.1. Pregătirea și caracterizarea structurilor receptorilor

Pentru a realiza andocarea moleculară mai întâi trebuie pregătite structurile receptorilor și ale liganzilor. În continuare vor fi prezentate aceste etape premergătoare andocării, iar mai apoi pașii efectuați în andocare. Structurile tridimensionale rezultate din măsurători de raze X ale receptorului apelinei, adrenoceptorului beta 2 și receptorului A2B al adenozei au fost obținute din baza de date Protein Data Bank. În această bază de date codurile lor de identificare, numite coduri PDB, sunt: 7SUS [247], 4LDE [248] și respectiv 8HDO [249]. Receptorul apelinei (7SUS) are un singur lanț care conține 347 de resturi de aminoacizi și un ion de zinc. Structura sa secundară, analizată cu ajutorul platformei PDBsum [250] este prezentată în Figura 8.1. Are 14 unități de α -helix, structuri β și γ -laminare.

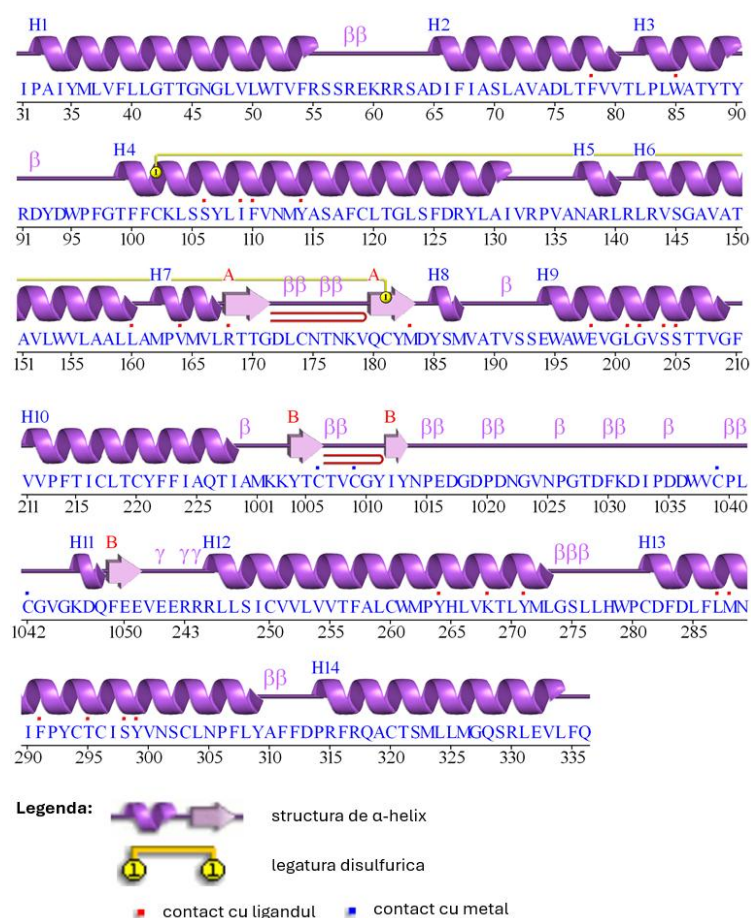


Figura 8.1: Structura secundară a receptorului apelinei (7SUS) generată cu platforma PDBsum.

Principalele sale patru situsuri de legare au următoarele dimensiuni $4954.50 \text{ \AA}^3$ (zona roșie din Figura 8.2), $2025.42 \text{ \AA}^3$ (zona violetă din Figura 8.2), $1161.00 \text{ \AA}^3$ (zona galbenă din Figura 8.2) și $941.62 \text{ \AA}^3$ (zona roșie din Figura 8.2).

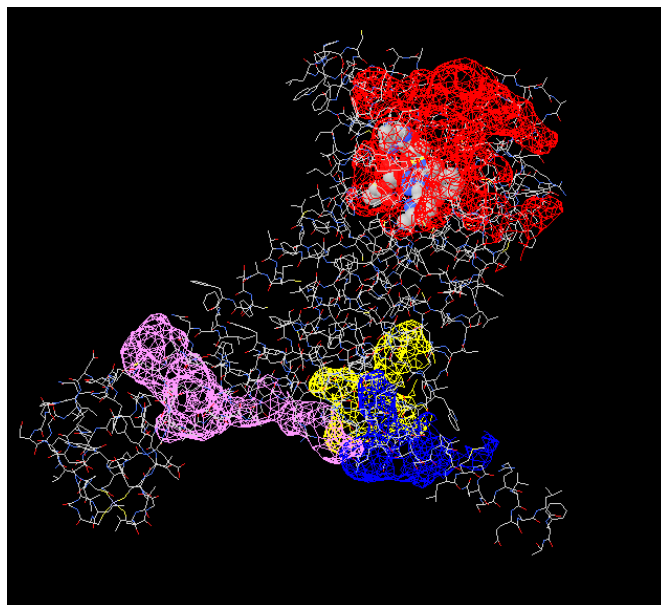


Figura 8.2: Principalele situsuri de legare ale receptorului apelinei (7SUS) generate cu platforma PDBsum.

Principalele patru situsuri de legare ale adrenoceptorului beta 2 au următoarele dimensiuni: $11469.52 \text{ \AA}^3$ (zona roșie din Figura 8.5), $5143.08 \text{ \AA}^3$ (zona violetă din Figura 8.5), $2746.41 \text{ \AA}^3$ (zona galbenă din Figura 8.5) și $1429.31 \text{ \AA}^3$ (zona roșie din Figura 8.5).

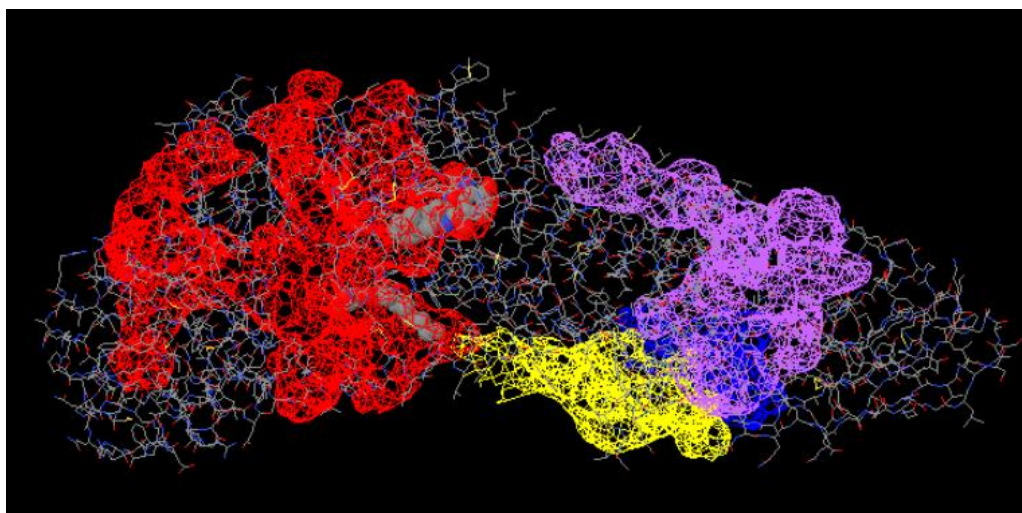


Figura 8.5: Principalele situsuri de legare ale adrenoceptorului beta 2 (4LDE) generate cu platforma PDBsum.

Principalele patru situsuri de legare ale receptorului A2B al adenozei au următoarele dimensiuni: $11688.45 \text{ \AA}^3$ (zona roșie din Figura 8.9), $11017.69 \text{ \AA}^3$ (zona violetă din Figura 8.9), $2959.45 \text{ \AA}^3$ (zona galbenă din Figura 8.9) și $2381.91 \text{ \AA}^3$ (zona roșie din Figura 8.9).

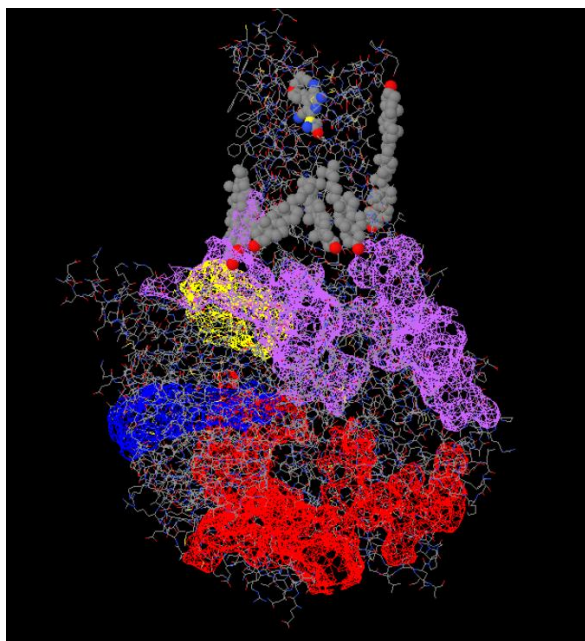


Figura 8.9: Structurile secundare ale lanțurilor N și R ale receptorului A2B al adenozei (8HDO) generate cu platforma PDBsum

Pregătirea inițială pentru studii de andocare a acestor structuri s-a făcut folosind programul Python Molecular Viewer (parte a MGL Tools, versiunea 1.5.7). Etapele de pregătire au inclus îndepărtarea moleculelor de apă, a eventualilor liganzi și ioni prezenți în structura de raze X și adăugarea atomilor de hidrogen deoarece aceștia nu pot fi detectați de razele X.

8.2 Pregătirea și caracterizarea structurilor liganzilor

Structurile tridimensionale ale liganzilor (artemisina, bilobalida, bilobetina, cheleritrina, chelidonina, epicatechina, acid gelseminic, ginkgolida A, isosilibina, silicristina, silibina, taraxacina, taraxacosida, acid taraxinic, acid rozmarinic, acid oleanolic, imatinib, sunitinib) au fost preluate din baza de date PubChem. Astfel, s-au găsit următoarele specii:

- Bilobetina, la pH-ul acid din stomac forma neutră este predominantă. Pe măsură ce pH-ul crește apar specii deprotonate la grupările hidroxil de tip fenol (Figura 8.11).

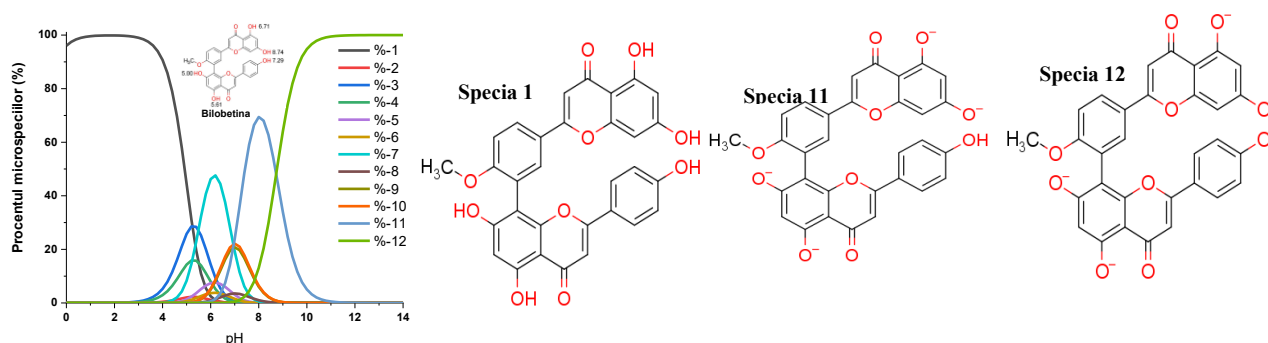


Figura 8.11: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru bilobetina în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 11), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (specia 12).

- Bilobalida prezintă doar trei specii, până la pH 10 specia neutră este singura prezentă (Figura 8.12).

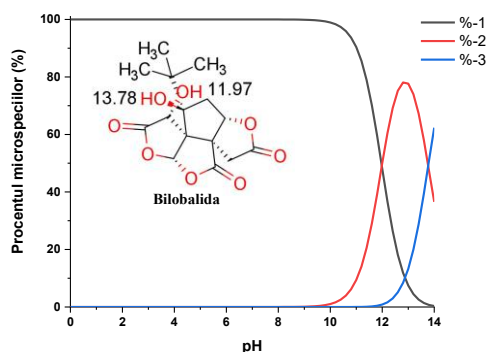


Figura 8.12: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru bilobalida în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (speciile 2 și 3).

- Chelidonina (Figura 8.13) se găsește până la pH=4,5 sub formă neutră. Pe măsură ce crește pH-ul atomul de azot din ciclul piperidinic se protonează și aceasta este specia dominată în domeniul de pH 6-14. Există și posibilitatea deprotonării grupei -OH, dar numai la pH foarte bazic și specia obținută este în concentrație mică.

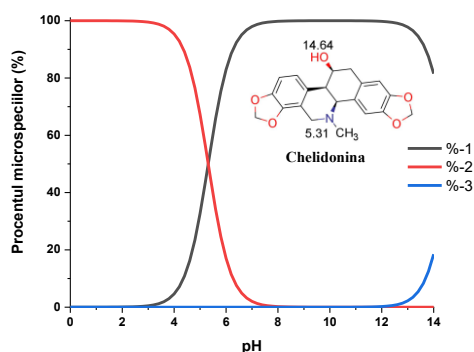


Figura 8.13 Microspeciile posibile prezente în soluție pentru chelidonina în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 2), pH foarte bazic (specia 3).

- Epicatechina este un polifenol care până la pH 8,5 se găsește exclusiv sub formă neprotonată. Pentru valori ale pH-ului între 8,5-12,5 pot apărea mai multe forme deprotonate ale căror compoziție poate fi consultată în (Figura 8.14).

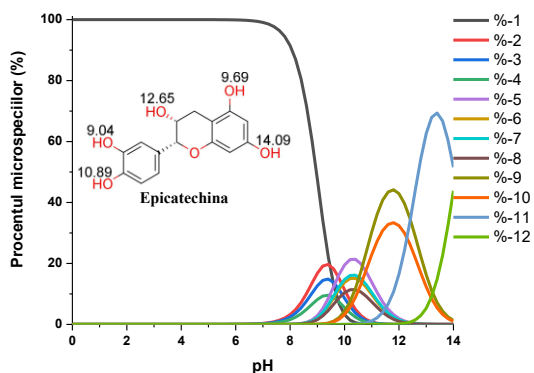


Figura 8.14: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru epicatechina în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (speciile 9 și 11).

- Acidul gelseminic este un derivat de cumarina care prezintă o grupare de tip fenol și de aceea, până la pH=6, este sub formă neutră, iar peste această valoare începe să se deprotoneze la gruparea hidroxil fenolic (Figura 8.15).

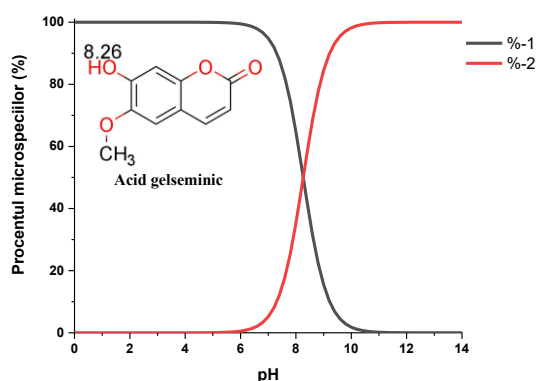


Figura 8.15: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru acidul gelseminic în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (specia 2).

- Ginkgolida A este o diterpenă lactonică a cărei formă neutră este preponderantă până la pH=10 (Figura 8.16).

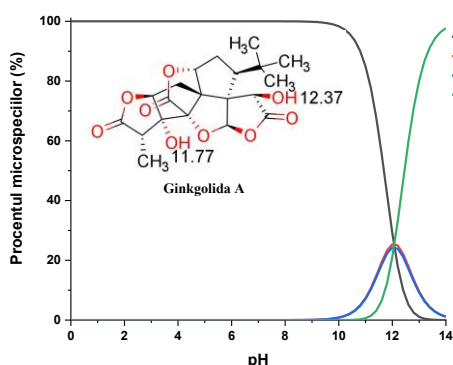


Figura 8.16: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru ginkgolida A în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (specia 4).

- Izosilibina (Figura 8.17) și silicristina (Figura 8.18) cu structuri hibride de tip flavonoida și lignant sunt în formă neprotonată până la pH=6.

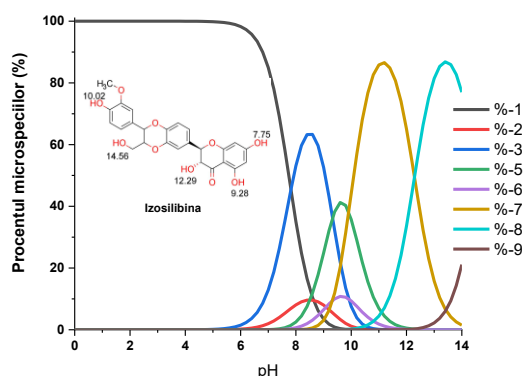


Figura 8.17: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru izosilibina în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (speciile 7 și 8).

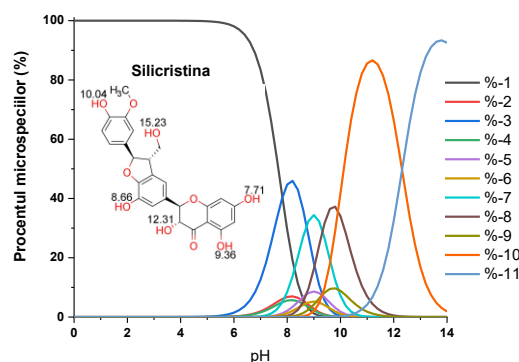


Figura 8.18: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru silicristina în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (speciile 10 și 11).

- Taraxacosida (Figura 8.19) este o glicozidă care a fost acilată la o grupare hidroxil. Prezintă o grupă hidroxil de tip fenolic care poate fi ionizată în proporție relevantă la valori ale pH-ului mai mari decât 9.

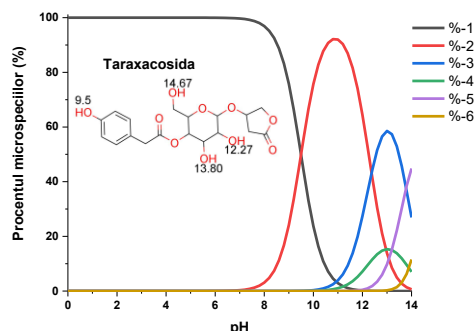


Figura 8.19: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru taraxacosida în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (speciile 3 și 5)

- Acidul taraxinic (Figura 8.20) prezintă o grupare carboxil care se poate ioniza, specia rezultată fiind predominantă în domeniul de pH 6-14.

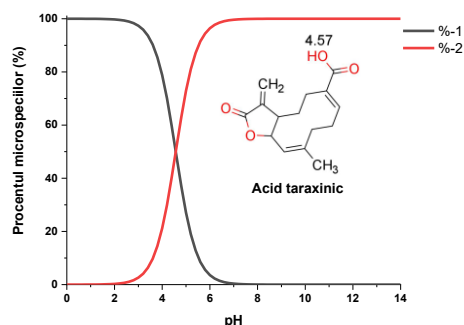


Figura 8.20: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru acidul taraxinic în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 2), pH foarte acid (specia 1), pH foarte bazic (specia 2).

- Sunitinibul la pH acid este protonat la gruparea amino terciară (Figura 8.21), iar imatinibul poate admite protonări la mai multe grupări de tip amină (Figura 8.22).

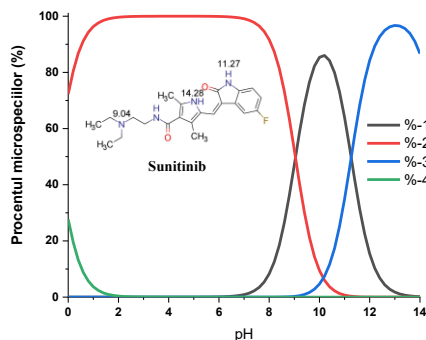


Figura 8.21: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru sunitinib în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 1), pH foarte acid (specia 2), pH foarte bazic (specia 3).

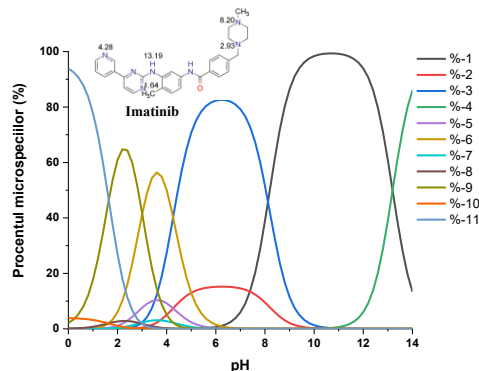


Figura 8.22: Microspeciile posibile prezente în soluție pentru imatinib în funcție de pH. Structurile speciilor majoritare la pH 7.4 (specia 3), pH foarte acid (specia 11), pH foarte bazic (specia 1).

Înainte de studiile de andocare, moleculele acestor liganzi au fost prelucrate (protonate/deprotonate) ținând cont de specia preponderentă la pH-ul considerat, iar structurile lor au fost optimizate, adică au fost aduse la o geometrie care corespunde unui minim energetic. Pentru optimizarea geometriilor s-a folosit platforma Open Babel versiunea 3.0 [252]. Totodată, au fost calculate și sarcinile de tip Gasteiger pentru atomi.

Acidul rozmarinic din *Melissa officinalis* se leagă cu afinitate mai mică la situsul de legare al imatinibului și sunitinibului (-7,89 kcal/mol) din receptorul A2B al adenozeinei corespunzător lantului R. El prezintă o afinitate mai mare pentru lantul B (-9,70 kcal/mol). De aceea, în prezența sunitinibului și imatinibului afinitatea rămâne mare (-9,68 kcal/mol și respectiv -9,52 kcal/mol) (Figura 8.26).

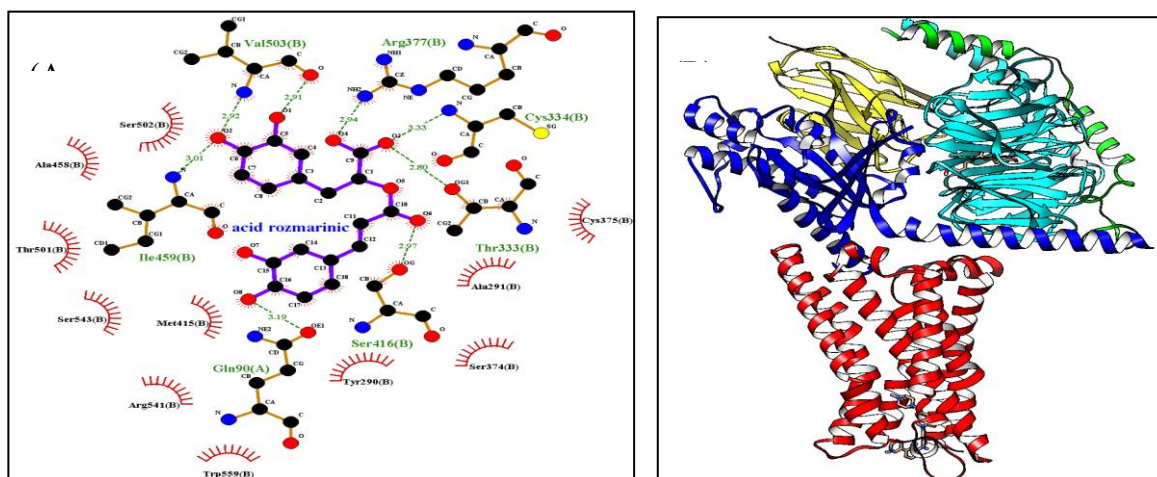


Figura 8.26: (A) Principalele tipuri de interacții între acidul rozmarinic din *Melissa officinalis* și aminoacizii din receptorul A2B al adenozeinei. (B) Structura complexului acid rozmarinic - receptorul A2B al adenozeinei în prezența imatinibului (legat la lantul R, zona roșie din structură).

Silibina din *Silybum marianum* se leagă la același situs al receptorului apelinei precum imatinibul și sunitinibul. Singură, are o afinitate mare (-9,40 kcal/mol), mai mare decât a sunitinibului (-8,14 kcal/mol), dar sub cea a imatinibului (-9.66 kcal/mol). În prezența celor două medicamente apare o competiție pentru situsul de legare și afinitatea scade mult:

- 7.89 kcal/mol în prezența sunitinibului și
- 7.67 kcal/mol în prezența imatinibului (Figura 8.27).

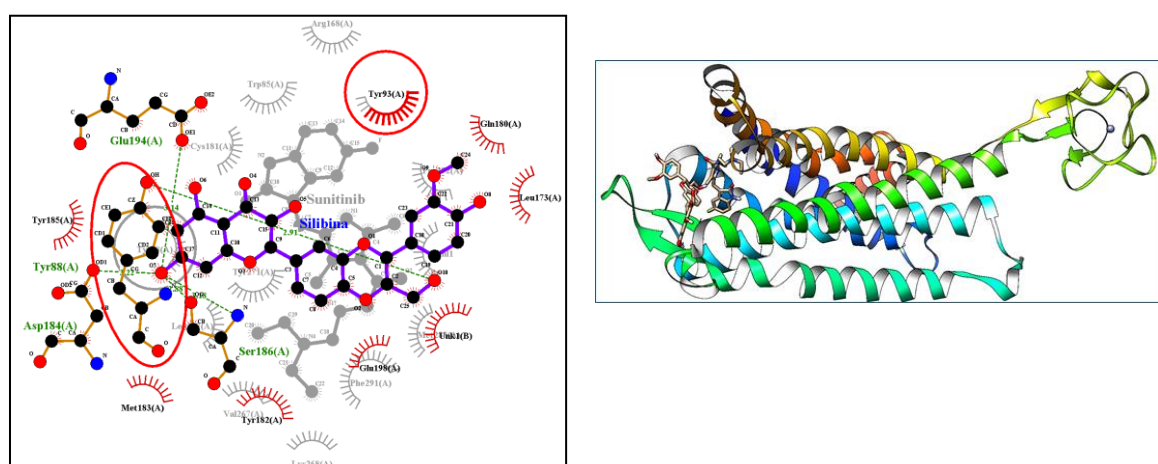


Figura 8.27: (A) Principalele tipuri de interacții între silibina din *Silybum marianum* și aminoacizii din receptorul apelinei în prezența sunitinibului. (B) Structura complexului silibina - receptorul apelinei în prezența sunitinibului

Acidul taraxinic din *Silybum marianum* și *Taraxacum officinale* are afinitate relativ scăzută pentru toți cei trei receptori studiați (Tabelul VIII.I). În cazul receptorului apelinei se leagă la același situs cu sunitinibul (Figura 8.28) și imatinibul, ceea ce îi va reduce și mai mult afinitatea dacă legarea se face în prezența acestora (de la -8,60 kcal/mol la -6,20 kcal/mol și respectiv -5,69 kcal/mol).

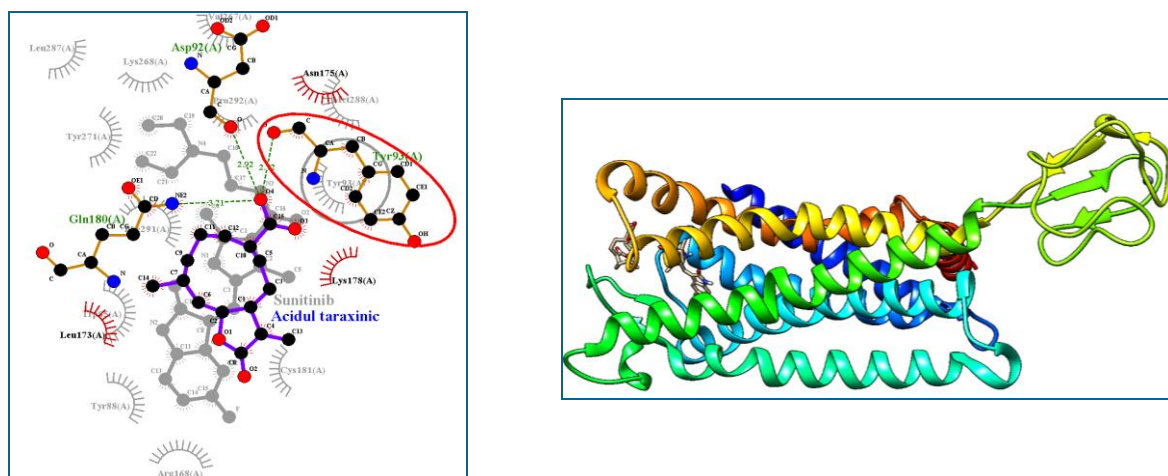


Figura 8.28: (A) Principalele tipuri de interacții între acidul taraxinic din *Silybum marianum* și *Taraxacum officinale* și aminoacizii din receptorul apelinei în prezența sunitinibului. (B) Structura complexului acid taraxinic - receptorul apelinei în prezența sunitinibului.

Acidul oleanolic din *Clematis vitalba* are afinitate mare pentru receptorul A2B al adenozei (-9,76 kcal/mol) și receptorul apelinei (-8,57 kcal/mol) și reactivitate mai mică pentru adrenoceptorul beta 2 (-7,43 kcal/mol) (Tabel VIII.1). În prezența de sunitinib legarea la același situs al receptorului A2B al adenozei este dramatic influențată (afinitate -5,34 kcal/mol) (Figura 8.29).

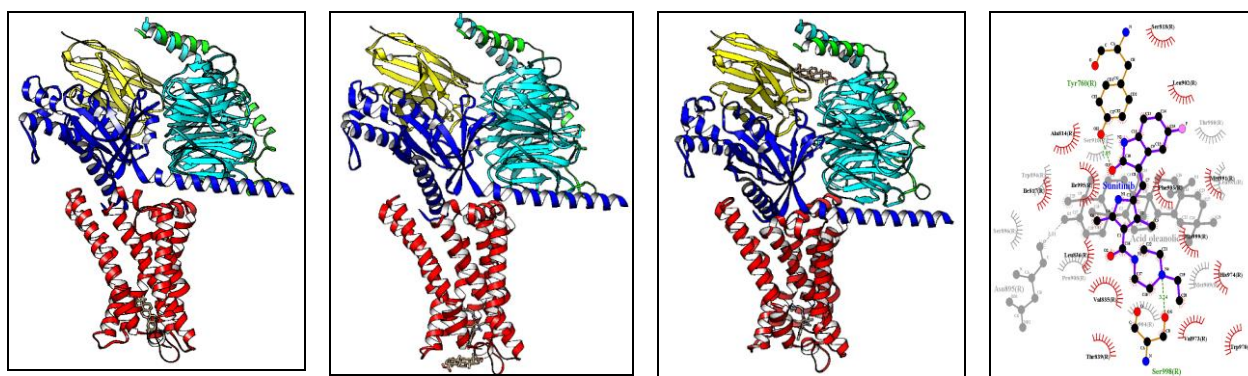


Figura 8.29: Structura complexului acidul oleanolic din *Clematis vitalba*- receptorul A2B al adenozei (A), în prezența sunitinibului legare la același situs (B) vs. legare la situsuri diferite (C). Principalele tipuri de interacții între acidul oleanolic și aminoacizii din receptorul A2B al adenozei (D).

Pe baza simulărilor de andocare se poate spune ca mulți dintre compușii studiați au prezentat afinități mari de legare prezise față de receptorii analizați. Ei reprezintă candidați potențiali pentru validare experimentală și investigații suplimentare ca modulatori ai interacțiunilor cu receptorii specificați în linii celulare canceroase.

CAPITOLUL IX: EVALUAREA EFECTELOR ADVERSE ȘI A SIGURANȚEI ONCOTERAPIILOR

EVALUAREA EFECTELOR ADVERSE ȘI A SIGURANȚEI TRATAMENTELOR ONCOLOGICE

9.1 Introducere

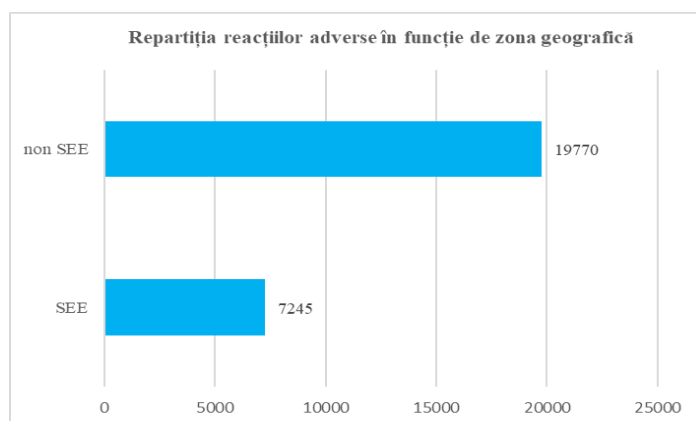
Înregistrarea evenimentelor adverse contribuie semnificativ la acumularea de date esențiale pentru aprecierea siguranței terapiilor medicamentoase. Raportarea acestor reacții determină îmbunătățirea calității și eficacității tratamentelor disponibile.

Cisplatinul, agent din clasa compușilor cu platină, este utilizat pe scară largă în tratamentul cancerului testicular, ovarian, pulmonar, de vezică și alte tumori solide. În ciuda eficacității sale, este cunoscut pentru toxicități severe, inclusiv nefrotoxicitate, ototoxicitate, neuropatie periferică, greață și vărsături severe, mielosupresie și toxicitate vasculară. Imatinib și sunitinib, inhibitori ai tirozin kinazei, sunt medicamente ce reprezintă un progres important în tratamentul cancerului, dar utilizare lor este limitată de toxicitățile specifice care pot influența aderența la tratament și calitatea vieții pacienților.

Obiectivul acestui studiu este de a analiza reacțiile adverse raportate la imatinib, sunitinib și cisplatin în baza de date Eudra Vigilance, cu scopul de a compara profilele de siguranță ale acestor agenți antineoplazici cu mecanisme de acțiune diferite, dar utilizări comune în oncologie.

9.2. Farmacovigilența Cisplatinului

Numărul de cazuri individuale identificate în Eudra Vigilance pentru CISPLATIN este de 36347, până la data de 09 februarie 2025.



37,3% din cazuri provin din țările Spațiului Economic European (SEE), iar 62,7% sunt raportate din afara acestui spațiu (non-SEE).

Figura 9.1: Numărul de cazuri de reacții adverse în funcție de zona geografică

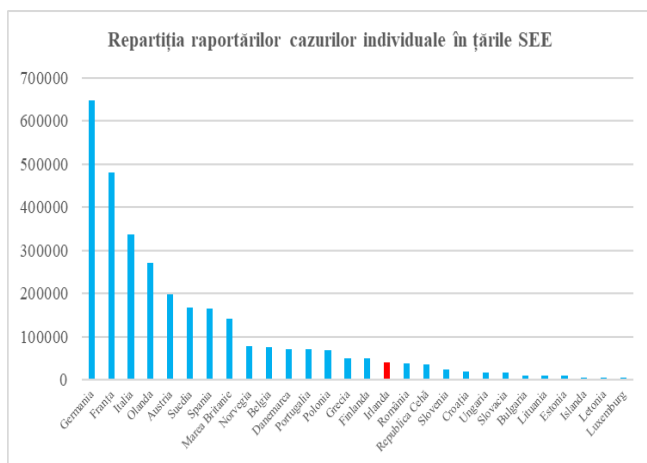


Figura 9.2: Numărul de cazuri individuale raportate în țările SEE

Ratele de raportare sunt cele mai ridicate în Italia (3270 raportări), Franța (3031 cazuri), Polonia (1750 cazuri), Germania (1272 cazuri), în timp ce România se situează pe poziția 16 cu 125 raportări (0,92%).

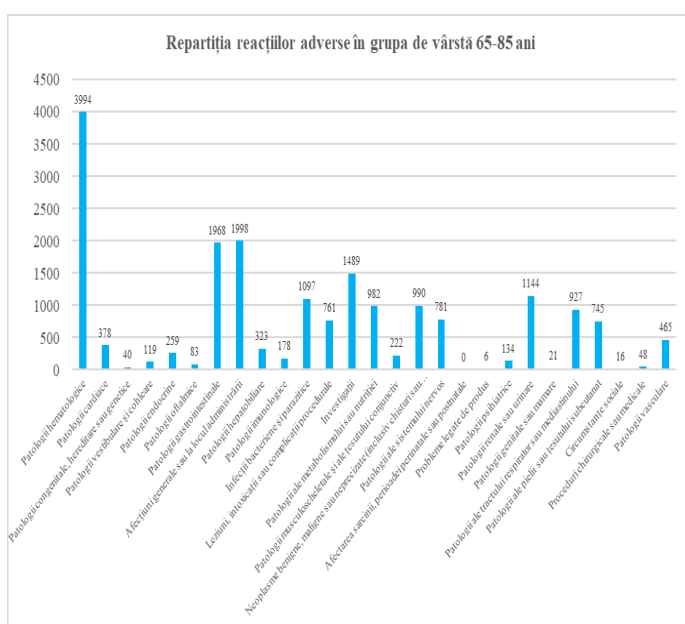


Figura 9.10: Numărul de cazuri de reacții adverse, din grupa de vârstă 65-85 ani, în funcție de tipul de reacție

În grupa de vârstă 65-85 ani, cele mai frecvente reacții adverse sunt cele asociate cu *patologiile hematologice* (20,84%), *afecțiunile generale sau la locul de administrare* (10,42%), *patologii gastrointestinale* (10,42%).

Reacțiile adverse grave sunt predominante în majoritatea categoriilor de reacții, în special în tulburările sanguine și limfatice, gastrointestinale și cardiovasculare, fiind strâns legate de toxicitatea cisplatinului asupra măduvei osoase.

9.3 Farmacovigilența inhibitorilor de tirozin-kinază

9.3.1. Imatinib

Numărul de cazuri individuale identificate în Eudra Vigilance pentru IMATINIB este de 46255, până la data de 09 februarie 2025.

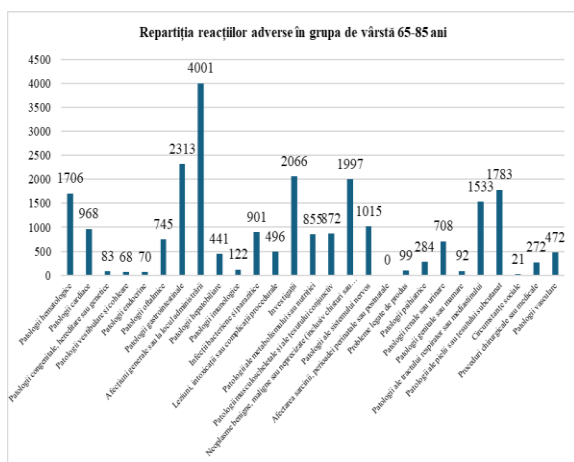


Figura 9.20: Numărul de cazuri de reacții adverse, din grupa de vârstă 65-85 ani, în funcție de tipul de reacție

Aproape toate reacțiile adverse raportate sunt considerate serioase (92,12%). Aceasta este o preocupare majoră, având în vedere că imatinibul este un medicament utilizat în tratamentele oncologice unde riscurile pot fi mai mari din cauza naturii bolii și a efectelor secundare. Monitorizarea continuă și ajustarea dozei sunt esențiale pentru a reduce riscurile.

9.3.2. Sunitinib

Numărul de cazuri individuale identificate în Eudra Vigilance pentru SUNITINIB este de 27015, până la data de 09 februarie 2025.

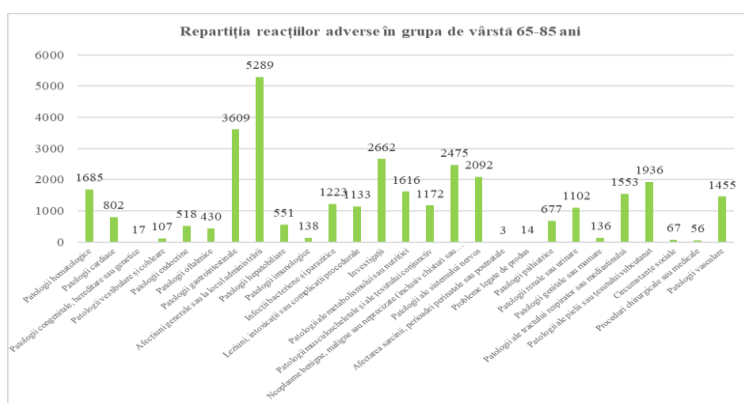


Figura 9.30: Numărul de cazuri de reacții adverse, din grupa de vârstă 65-85 ani, în funcție de tipul de reacție

Cele mai frecvente reacții adverse raportate au fost tulburările generale și la locul de administrare, afectarea gastro-intestinală, neoplasmale, tulburările sistemului nervos și tulburările țesuturilor subcutanate. Datele privind sunitinib indică o prevalență mai mare a reacțiilor adverse în rândul bărbaților și al pacienților din grupele de vârstă adulte, cazurile serioase dominând raportările.

9.4. Concluzii

Astfel, fiecare dintre cele trei medicamente prezintă un profil distinct de reacții adverse, cu suprapuneri notabile în ceea ce privește afectarea generală, gastro-intestinală și hematologică, dar și particularități ce reflectă mecanismele farmacologice diferite și tipurile de pacienți cărora le sunt destinate.

În grupa de vârstă 65-85 ani, reacțiile adverse cele mai întâlnite sunt cele asociate cu *afecțiunile generale sau la locul de administrare* (16,68%), *patologiile gastrointestinale* (9,64%) și *neoplasme benigne, maligne sau neprecizate – inclusiv chisturi sau polipi* (8,33%).

CAPITOLUL X: STUDIU DE CAZ: PHGIST: TUMORĂ GIGANTICĂ INTRAHEPATICĂ DE NATURĂ STROMALĂ

10.1 Introducere

Tumorile stromale gastrointestinale reprezintă cele mai întâlnite forme de tumori mezenchimale ale tractului digestiv, având originea în celulele interstițiale ale Cajal. De regulă, acestea apar în locații extrahepatice, însă un mic procent provine din ficat și sunt denumite tumori stromale gastrointestinale hepatice primare (PHGIST). Diagnosticul de PHGIST se face prin excludere, întrucât acestea prezintă aceleași trăsături moleculare imunohistochimice și histologice ca și tumorile stromale gastrointestinale clasice. Datorită numărului redus de studii publicate, informațiile privind morbiditatea și mortalitatea asociate PHGIST sunt încă limitate. Imunohistopatologia poate contribui la elaborarea unor recomandări de screening și la evaluarea rezidenței la tratament [77].

Pentru a ilustra această situație particulară, vă prezint cazul pacientei SDM, în vârstă de 79 de ani, fără antecedente patologice personale sau tratamente cronice.

10.2 Etapele cazului clinic

Etapa 0: Prediagnostic - perioada 22.02.2017-27.02.2017

Pacienta manifesta o fatigabilitate accentuată, inapetență, o scădere moderată în greutate și o mărire a volumului abdominal.

Examinarea clinică a relevat o pacientă cu aspect palid și semne de astenie, având o stare generală ușor compromisă. Abdomenul era extrem de distensat și simetric, prezentând o cantitate mare de ascită tensionată, însă cu tranzit intestinal normal și o disfuncție respiratorie de tip restrictiv. De asemenea, tușeul rectal a fost în limite normale.

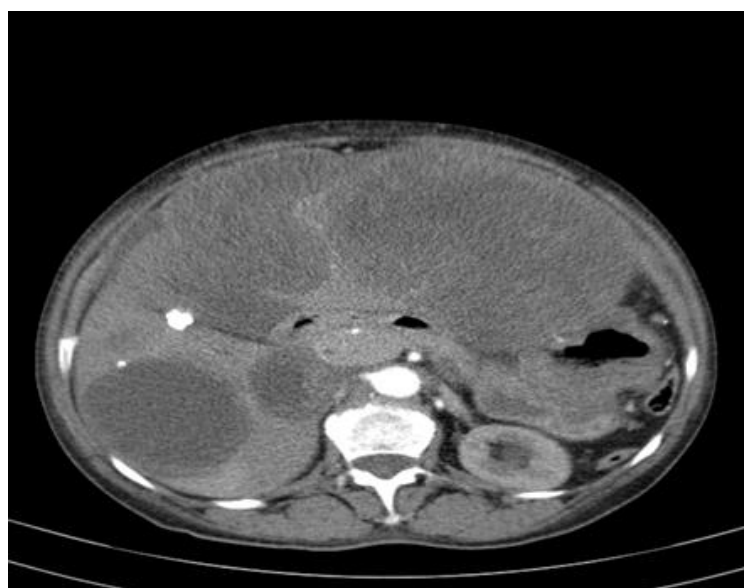


Figura 10.1: Aspect CT în momentul diagnosticării– Formațiuni tumorale hepatice având aspect chistic, cu pereți de grosime variabilă și priză de contrast neomogenă

Pe secțiunile transversale se evidențiază trei calcificări parenchimatoase în lobul drept hepatic: cea mai mare măsoară 14 mm, cea mai mică între 2 și 3 mm, iar două dintre ele sunt în contract cu peretele chistic. La nivelul segmentelor IVB și III se remarcă două formațiuni voluminoase care ocupă aproape toată întreaga cavitate peritoneală. Colecistul nu poate fi identificat, cel mai probabil fiind comprimat de formațiunea învecinată, iar în zona perihepatică și hepatodiafragmatică se observă o lamă de fluid de grosime variabilă, între 1 și 3 cm.

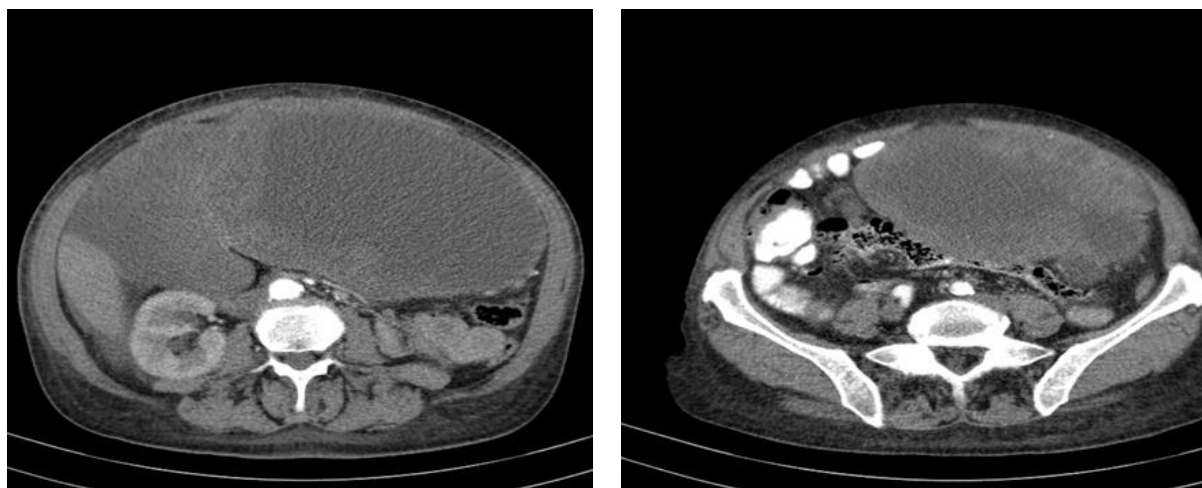


Figura 10.2: Aspect CT în momentul diagnosticării– Polul inferior al formațiunii chistice din lobul stâng ajunge până în pelvis (14/18/18,5 cm) și dislocă posterior colonul transvers și intestinul subțire spre fosa iliacă dreaptă

După corectarea dezechilibrului hidroelectrolitic și a anemiei, s-a decis intervenția chirurgicală cu scopul de a confirma diagnosticul și de a realiza o tumorectomie reducțională.

Etapă I: Primo intervenție – perioada 01.03.2017-01.04.2017

Internare Spitalul CF1 Witting București: Consultul clinic chirurgical la internare relevă abdomen mult mărit de volum, în tensiune, cu hepatomegalie importantă la nivelul ambilor lobi, marginea inferioară a lobului stâng ajungând până în fosa iliacă stângă.

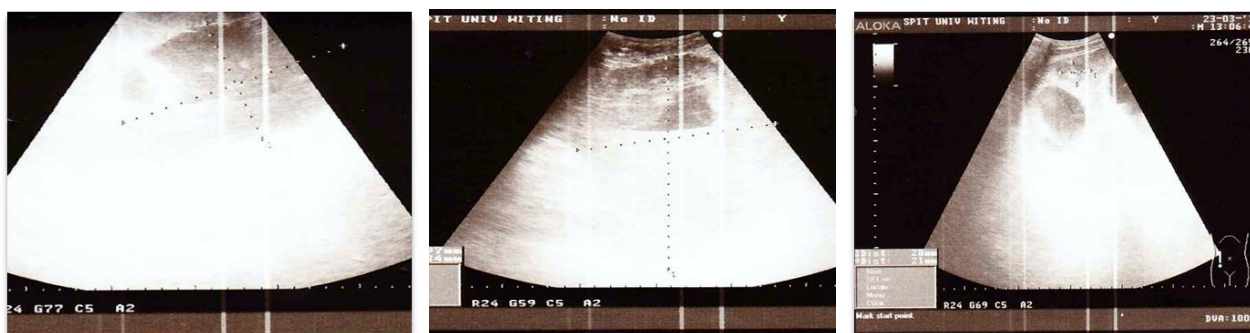


Figura 10.3: Aspecte ecografice în momentul diagnosticării

Se intervine chirurgical când, pentru formațiune tumorală polichistică gigantă hepatică (formațiune tumorală care practic înlocuiește ambii lobi hepatici, prezentând cavități chistice voluminoase cu lichid limpede, cea de la nivelul lobului stâng coboară până în fosa iliacă stângă; tumora are aspect encefaloid, este ușor friabilă, sângerează abundent, este aderentă la masa intestinală și nu poate fi mobilizată; lichid de ascită în cantitate

moderată; parenchim hepatic de aspect normal este vizibil doar la nivelul segmentului VI-VII), se practică laparatomie diagnostică, biopsie excizională, evacuare formațiune tumorală chistică lob hepatic stâng, drenaj intracavitar, drenaj peritoneal multiplu; piesele de biopsie (fragmente de 1-3,5 cm se trimit la examinare anatomo-patologică - proliferare tumorală cu celule clare de origine mezenchimală - GIST confirmat de examenul imunohistochimic).

Evoluția postoperatorie a fost inițial trenantă, înregistrându-se pierderi semnificative de lichid de ascită cu aspect hemoragic prin drenurile peritoneale, necesitând administrarea repetată de transfuzii cu masă eritocitară. Pacienta a fost externată după 30 de zile de la internare, prezentând o placă vindecată, tranzit intestinal activ și administrație orală, deși a persistat un drenaj peritoneal de aproximativ 500 ml/zi cu aspect ascitic.

Examenul anatomopatologic a evidențiat fragmente de țesut tumoral compus din celule fuziforme, cu citoplasmă vacuolară clară și nuclei ovalari relativ omogeni, ce prezintă aspect tahicrom și vacuolizat, nucleolii fiind greu de evidențiat. Limitele celulare sunt neclare, iar celulele se aranjează în jurul unor vase ectaziate cu pereți subțiri. Activitatea mitotică este scăzută (3mitoze/50HPF). Analiza histopatologică a concluzionat că este vorba de o proliferare tumorală cu celule clare, de origine mezenterică, de tip GIST.

Pentru a stabili diagnosticul de certitudine, fragmentele tumorale au fost evaluate prin teste de imunohistochimie, utilizând o gamă extinsă de imunomarkeri. Rezultatele obținute au fost următoarele:

- imunomarkerii **CD117, VIMENTINA, PDGFR-Alpha, CD34, DOG1** au ieșit pozitivi în celulele tumorale,
- imunomarkerul **ACTININA** a ieșit negativ în celulele tumorale și pozitiv în vase,
- imunomarkerul **Ki67** a ieșit pozitiv cu indice de proliferare 25% în celulele tumorale
- imunomarkerul **S100** a ieșit negativ.

Concluzia testelor imunohistochimice a fost următoarea ***Tumoră stromală gastrointestinală (GIST) malignă hepatică.***

Etapa II: Tratament cu Inhibitor de Tirozin-Kinază de primă linie - IMATINIB – perioada 03.05.2017-05.05.2021

Se instituie tratamentul cu IMATINIB (GLIVEC) 400mg, administrat sub formă de 2 comprimate/zi, ceea ce a determinat o ameliorare rapidă a stării generale, reducerea drenajului la 50 ml/24h, scăderea volumului abdominal și îndepărtarea tuburilor de dren după aproximativ o lună de la inițierea terapiei.

La 6 luni, controalele imagistice evidențiază un răspuns parțial la tratamentul cu inhibitori de tirozin-kinază, conform Criteriilor Choi, manifestat prin reducerea dimensiunilor și scăderea densității formațiunilor tumorale hepatice.

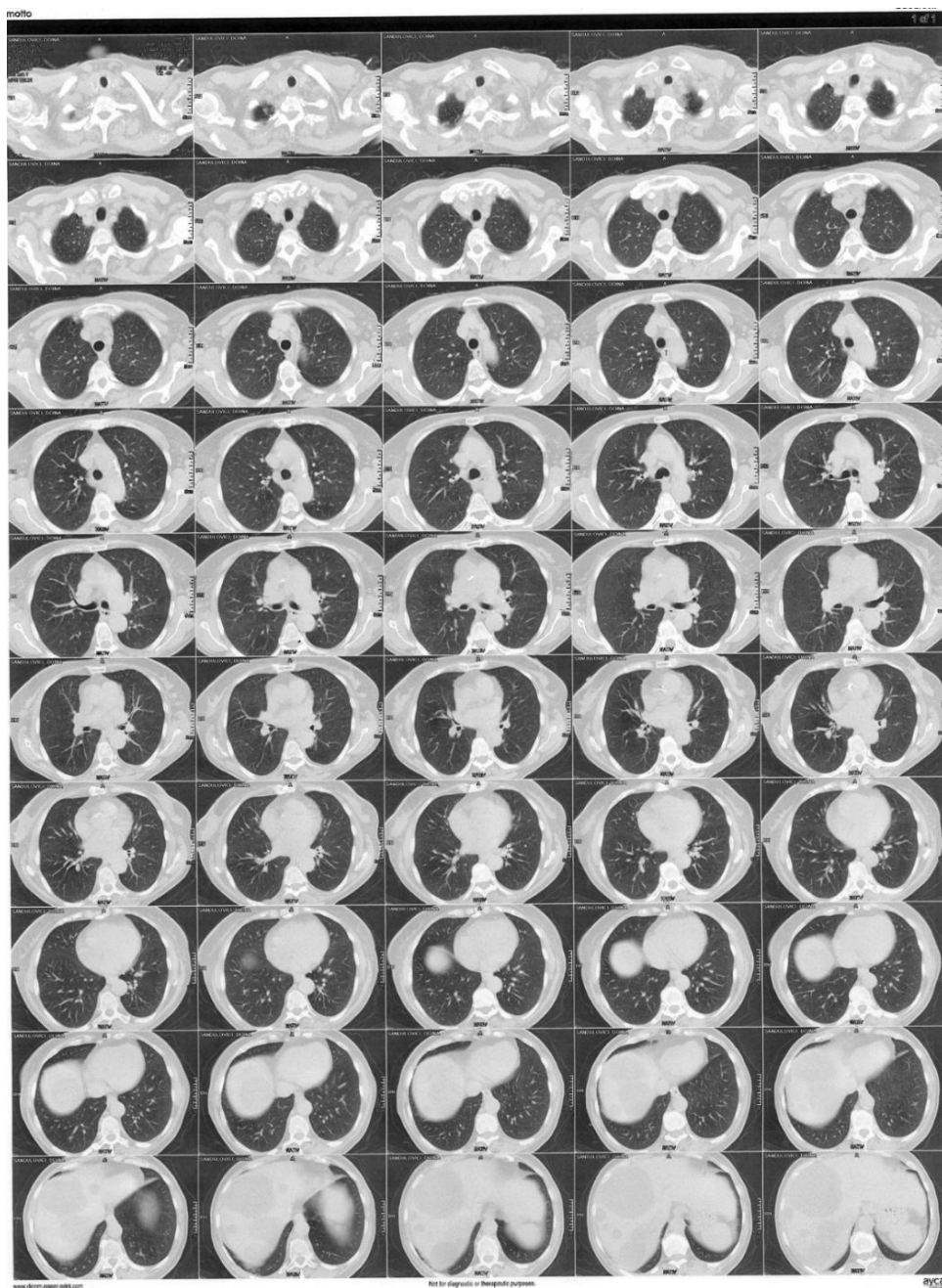


Figura 10.4.1: Aspect CT la 6 luni

Cea mai voluminoasă formațiune tumorală intrahepatică măsoară 90 / 54 / 46 mm, situată între segmentele II-III. Formațiunile tumorale hepatice se încarcă mai discret cu substanță de contrast față de evaluarea anterioară.

În data de 03.03.2021, la 4 ani de la diagnosticare, ficatul prezintă multiple macrochisturi biliare simple de până la 8cm, descrise și anterior, stabile în timp. Colecist - aparent fără calculi. În spațiul Morrison nodul nespecific staționar de 35/22mm. Rinichi funcționali, fără tumori, hidronefroză sau calculi. Fără noduli suprarenalieni suspecti. Pancreas omogen. Stomac: modificări parietale la nivelul antrului, pe o lungime de aproximativ 4cm - pereții apar moderat îngroșați, circumferențial, grosime maximă de 14mm. Fără adenopatii celio-mezenterice sau retroperitoneale cu aspect macroscopic tumoral. Vezica urinară evacuată. Coproastă difuză -

grad moderat. Fără ascită. Uter mic involuat. Loje anexiale libere. Schelet axial surprins în achiziții: fără leziuni secundare.

Etapă III: Instalarea rezistenței la IMATINIB – perioada 14.06.2021-03.12.2021

Multiple tumori hepatice chistice cu diametrul de până la 8 cm în lobul drept, stabile față de investigațiile anterioare. Formațiune subcapsulară cu dezvoltare extrahepatică în spațiul Morrison, izodensă cu parenchimul hepatic, de 3/3,7 cm de asemenea staționară.

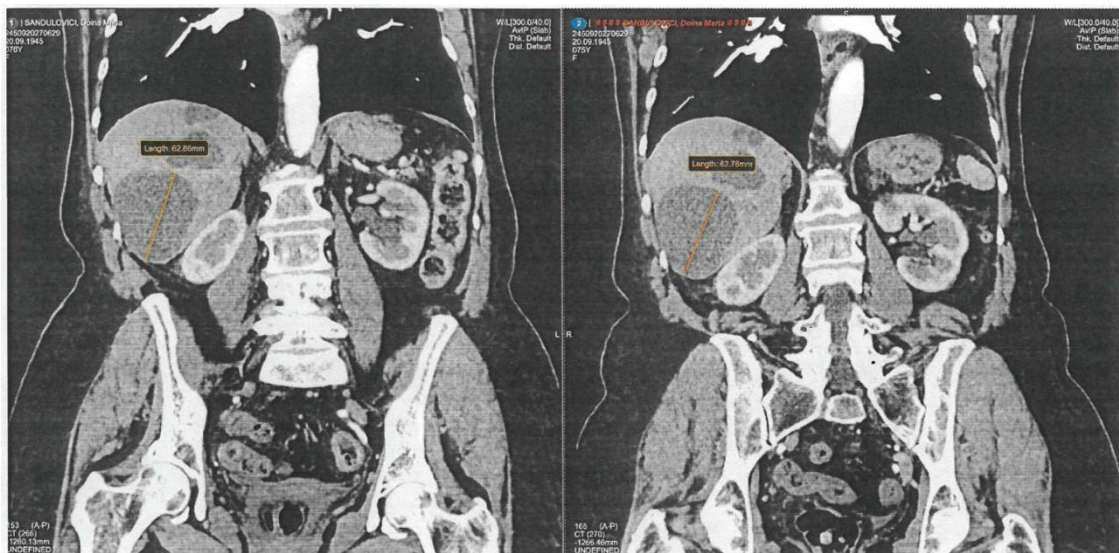


Figura: 10.10.1: Aspect CT la 48 luni sub tratament cu Imatinib

Colecist destins, CBP, CBIH nedilate. Pancreas omogen. Stomac cu pliuri hipertrofice. Pereții antrului gastric cu o grosime variabilă segmentar: proximal 14 mm, mai distal 8 mm - aspect stabil față de martie 2021.

Etapă IV: Întrerupere tratament cu IMATINIB – perioada 04.01.2022-26.06.2022

Formațiune chistică tumorală, voluminoasă, de 12/12 cm nou apărută în epigastru, probabil desprinsă din peretele posterior al antrului gastric, care amprentează marginea inferioară a lobului stâng hepatic. În rest, aspect staționar.

Se constată apariția unei formațiuni tumorale de tip chistic, cu perete iodofil, cu densitate centrală parafluidă, formațiunea face corp comun cu marginea inferioară stângă a ficatului și cu peretele posterior al antrului gastric, având dimensiuni de 12/12 cm.

Se decide sistarea tratamentului cu ITK linie I – Imatinib.

Etapă V: A doua intervenție chirurgicală – perioada 27.06.2022-11.07.2022

Pacienta se internează prezentând vărsături reduse cantitativ, sporadice, astenie fizică și formațiune tumorală voluminoasă palpabilă în epigastru, dura, imobilă, nedureroasă. Investigațiile clinice și paraclinice efectuate (EKG, RxPulmonar, EDS) nu decelează alte modificări patologice, stomacul fiind amprentat posterior în regiunea verticală, dar fără leziuni de mucoasă. Datele de laborator relevă Anemie Cronică (normocromă, normocitară) - Hb = 8,4 g/dl. Se intervine chirurgical pentru formațiune tumorală chistică lob hepatic stâng (formațiune

tumorală desprinsă din lobul hepatic stâng, care se întinde posterior până pe planul vaselor mari, inferior până în mezocolonul transvers, având dimensiuni de aproximativ 12/15 cm, în tensiune, cu perete relativ fibros.

Se transferă la Institutul Clinic Fundeni, Clinica Chirurgie Generală. Se reintervine chirurgical în data de 04.07.2022 cu diagnosticul de tumoră chistică voluminoasă segment III, operată pentru care se practică hepatectomei atipică segment III în bloc cu formațiunea tumorală. Postoperator evoluția pacientei este favorabilă, pacienta fiind afebrilă, cu reluarea tranzitului intestinal pentru gaze și materii fecale, scăderea debitului pe tuburile de drenaj peritoneal cu suprimarea acestora în urma ecografiei de control care descrie: ficat restant cu ecostructură neomogenă prin prezența a câteva leziuni macronodulare cu conținut transonic, în segmentele VII-VIII și alte leziuni nodulare cu structura heterogenă la nivelul segmentelor VI-VII; Axe vasculare hepatice permeabile; Fără dilatații de arbore biliar; Splină și rinichi fără particularități; Fără ascită, fără colecții intraabdominale. Se externează cu stare generală bună, cu toleranță digestivă, cu plagă în curs de vindecare din punct de vedere chirurgical. Recomandări generale post-chirurgicale.

Etapa VI: Tratament cu Inhibitor de Tirozin-Kinază de linie secundară - SUNITINIB – perioada 04.11.2022-23.01.2025

După o lună post operator se decide inițierea tratamentului linia a II-a (Sunitinib). Necesită evaluare cardiologică cu FEV. Consult de specialitate cardiologie: Valvulopatii degenerative ușoare. Dislipidemie ușoară. Nu există contraindicații de tratament oncologic.

Aspectul HP descris este sugestiv pentru diagnosticul de tumori mezenchimale cu celule fuziforme (tip GIST). Testele IHC efectuate pledează pentru diagnosticul de tumoră stromală GIST cu grad înalt de malignitate (determinare secundară). Urmează inițiere tratament linia a II-a cu Sunitinib 50mg/zi 28 zile ulterior 14 zile pauză.

La CT-ul efectuat la 15 luni de tratament cu Sunitinib se remarcă aspect stabil al formațiunilor hepatice cunoscute. Fără leziuni nou apărute cu caracter suspect de determinări secundare la nivel toraco-abdomino-pelvin comparativ cu examinarea anterioară inițierii tratamentului cu Sunitinib.

La 6 ani și jumătate de la diagnosticare și la 18 an de la ultimul examen CT se constată: apariția unei noi leziuni chistice hepatice la nivelul segmentului VII. Majoritatea formațiunilor chistice hepatice cunoscute prezintă dimensiuni mai reduse. Lipsa vizualizării în prezent a leziunii tisulare de la nivelul segmentului VI hepatic. Fără leziuni secundare nou apărute la nivel pulmonar și osos. Stenoze semnificative la nivelul arterelor femurale superficiale.

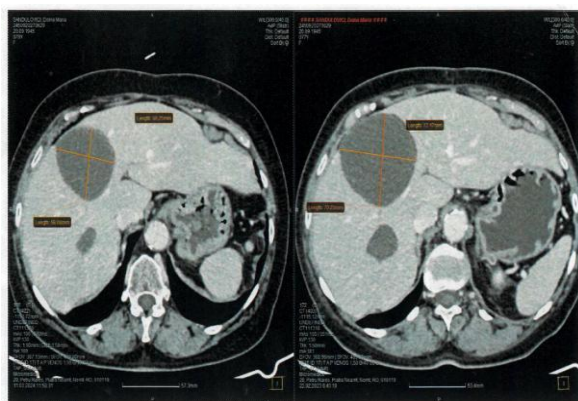


Figura 10.11.2: Aspect CT la 18 luni sub tratament cu Sunitinib

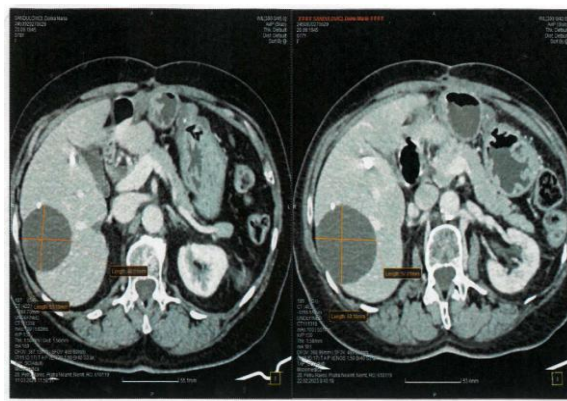


Figura 10.11.3: Aspect CT la 18 luni sub tratament cu Sunitinib

Apariția unei leziuni chistice de 21/24 mm subcapsular la nivelul segmentului VII.

10.3 Particularitățile clinice ale cazului

Un aspect de remarcat este că, în ciuda utilizării unor tehnici imagistice performante și efectuării laparotomiei exploratorii, originea GIST în TGI nu a fost identificată. Deși examenul imunohistochimic indică o posibilă origine hepatică, unii autori contestă această concluzie, argumentând că tumorile apărute în organele parenchimatoase (ficat, pancreas, prostată) ar putea reprezenta metastaze rezultate prin extensie directă a GIST-urilor din organele digestive cavitate.

Acest caz prezintă mai multe aspecte atipice și complexe care îl diferențiază de alte cazuri de PHGIST: evoluția îndelungată și tratamentul pe termen lung, formațiunea tumorală predominant chistică și dimensiunile sale, rezistența la Imatinib și efectele secundare severe la terapiile TKI.

Literatura arată că PHGIST este o patologie rară și dificil de tratat, cu prognostic rezervat. Totuși, pacienta a avut **o supraviețuire de 8 ani de la diagnostic**, ceea ce este remarcabil. Cazurile raportate în literatura de specialitate menționează că **supraviețuirea mediană este semnificativ mai mică**, cu o rată de supraviețuire la 5 ani de aproximativ **33%** în unele studii [77].

În majoritatea cazurilor de PHGIST, tumorile sunt solide și pot avea necroză centrală, dar **cazurile chistice sunt rare**. În cazul acestei paciente, tumorile hepatice au prezentat un comportament predominant chistic, cu dimensiuni semnificative, neobișnuite, ajungând până la 12/12 cm.

După aproximativ 4 ani de tratament, pacienta a dezvoltat rezistență la TKI de primă linie, fenomen raportat în literatura de specialitate, dar în mod obișnuit observat mai devreme (după 2-3 ani).

Efectele adverse severe raportate de către pacientă pe parcursul tratamentelor TKI: Imatinib - spasme musculare intense pe toată durata tratamentului, Sunitinib - hipertensiune de

grad moderat-ridicat, dekeratinizări ale patului unghial, alopecie, dezvoltarea cataractei binocular, Anemie severă controlată prin aport suplimentar de Fe

Aceste efecte adverse sunt mai puțin frecvent raportate, în special cele la Sunitinib, dar aparțin spectrului de toxicitate cutanată și vasculară descris în literatură.

Aspecte care fac cazul unic

- Supraviețuirea lungă (7+ ani) în ciuda unei patologii cu prognostic rezervat
- Caracterul chistic al tumorii, rar întâlnit în PHGIST
- Efectele secundare severe la terapiile TKI, mai ales dekeratinizările, dezvoltarea cataractei binocular și stenoze arteriale periferică și centrală progresivă
- Intervențiile chirurgicale complexe cu complicații postoperatorii severe

10.6 Concluzii

Cazul prezentat ilustrează complexitatea diagnosticului, tratamentului și monitorizării evoluției unei PHGIST, o entitate rară și controversată în literatura de specialitate. Particularitățile biochimice și clinice au evidențiat o interacțiune complexă între procesul tumoral, tratamentele sistemice cu inhibitori de tirozin-kinază (TKI) și răspunsul biologic al organismului.

Din punct de vedere hematologic și biochimic, pacienta a prezentat profil stabil în ansamblu, dar influențat semnificativ de tratamentul cu Imatinib și Sunitinib. S-au remarcat un sindrom anemic persistent, modificări imunologice sugestive pentru inflamație tumorală cronică și efecte adverse hematologice și metabolice, precum leucopenia tranzitorie care a necesitat monitorizare și ajustare terapeutică atentă.

Sub aspect clinic, evoluția bolii a fost marcată de: o prezentare atipică, cu tumori hepatice chistice de mari dimensiuni, dificultăți de diagnostic diferențial, în absența unei leziuni digestive primare evidente, dezvoltarea rezistenței la Imatinib după o perioadă mai lungă decât media raportată în literatură, efecte adverse severe și rare asociate terapiei TKI, precum cataractă binoculară, dekeratinizări și stenoze vasculare progresive

Tratamentul multimodal, constând în administrarea secvențială de TKI și intervenții chirurgicale majore, a permis o **supraviețuire remarcabilă de peste 8 ani**, în ciuda prognosticului rezervat caracteristic acestui tip tumoral. Acest aspect subliniază importanța unei monitorizări riguroase, a adaptării terapeutice individualizate și a colaborării multidisciplinare în gestionarea cazurilor oncologice rare.

Cazul aduce în discuție și problema validității diagnosticului de PHGIST ca entitate primară, întrucât originea hepatică a tumorii rămâne un subiect de dezbatere. Totuși, datele clinico-patologice și evolutive susțin unicitatea acestui caz și necesitatea de a reevalua criteriile de diagnostic în contextul formelor atipice de GIST.

CONCLUZII GENERALE

1. Nanoparticulele și extractele vegetale reprezintă o direcție promițătoare în terapiile oncologice.

Rezultatele obținute indică faptul că nanoparticulele de Argint biosintetizate din extracte vegetale pot avea un rol important în tratamentele anticanceroase. Acestea oferă o citotoxicitate moderată, mai puțin agresivă decât Cisplatina, dar mai eficientă decât extractele vegetale simple. Sinergia dintre nanoparticule și extractele din plante contribuie la îmbunătățirea eficacității tratamentului, reducerea efectelor adverse și protejarea celulelor sănătoase. În plus, aceste combinații pot reduce toxicitatea terapiilor convenționale, făcându-le mai ușor de tolerat pe termen lung.

2. Extractele vegetale au un potențial terapeutic semnificativ, dar necesită standardizare și studii aprofundate.

Compușii bioactivi extrași din plante precum rostopasca, păpădia sau roinița au demonstrat efecte antitumorale, antioxidante și antimicrobiene. Aceștia pot modula răspunsul celular la tratamentele convenționale, oferind o alternativă mai sigură sau un adjuvant care să sporească eficiența chimioterapiei. Cu toate acestea, efectele variabile observate între diferitele extracte și metode de obținere sugerează necesitatea unor studii suplimentare pentru a standardiza dozajele și pentru a determina mecanismele exacte de acțiune.

3. Sinergismul între terapiile convenționale și cele alternative poate optimiza tratamentele împotriva cancerului.

Rezultatele sugerează că administrarea combinată de medicamente oncologice și extracte vegetale sau nanoparticule poate avea efecte benefice asupra viabilității celulelor canceroase, crescând eficacitatea tratamentului. Mai mult, unele combinații au demonstrat un efect protector asupra celulelor normale, ceea ce ar putea contribui la reducerea efectelor secundare ale chimioterapiei. Aceste observații subliniază importanța unor strategii terapeutice combinate care să permită utilizarea unor doze mai mici de chimioterapice, menționând în același timp eficiența tratamentului.

4. Activitatea antioxidantă și antimicrobiană a extractelor vegetale sugerează aplicații extinse în medicina preventivă.

Plantele bogate în polifenoli, precum *Melissa officinalis* și *Clematis vitalba*, au demonstrat un puternic efect antioxidant, ceea ce poate contribui la prevenirea bolilor asociate stresului oxidativ, inclusiv a cancerului și bolilor neurodegenerative. De asemenea, activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale testate sugerează o posibilă utilizare în combaterea infecțiilor bacteriene și fungice. Aceste rezultate deschid noi oportunități pentru dezvoltarea unor

terapii naturale împotriva infecțiilor rezistente la antibiotice și a bolilor cronice asociate stresului oxidativ.

5. Profilul reacțiilor adverse ale chimioterapicelor actuale impune o monitorizare atentă și personalizarea tratamentelor.

Analiza farmacovigilenței a arătat că medicamentele utilizate în tratamentele oncologice precum Cisplatina, Imatinib și Sunitinib, au un profil de toxicitate ridicat, în special în rândul pacienților vârstnici și al bărbaților. Cele mai frecvente reacții adverse includ tulburări gastrointestinale, hematologice și renale, iar majoritatea raportărilor indică severitate ridicată. Acest lucru subliniază importanța monitorizării continue a pacienților și a ajustării tratamentului în funcție de particularitățile fiecăruia, pentru a reduce riscurile asociate.

6. Noi molecule descoperite prin andocare moleculară ar putea fi utilizate în dezvoltarea unor medicamente mai eficiente și mai sigure.

Simulările de andocare moleculară au evidențiat compuși cu afinități ridicate pentru receptorii implicați în proliferarea celulelor canceroase. Acești compuși ar putea deveni puncte de plecare pentru dezvoltarea unor noi terapii oncologice, cu efecte mai bine direcționate și toxicitate redusă față de medicamentele convenționale. Validarea experimentală a acestor compuși este următorul pas necesar pentru a le confirma potențialul terapeutic.

7. Efectele tratamentelor sunt dependente de doză și de timp.

Toate studiile analizate au demonstrat că eficiența tratamentelor este strâns legată de concentrație și de durata expunerii. Substanțele testate au avut un efect citotoxic mai pronunțat la doze mai mari și după o perioadă mai lungă de timp (48 de ore comparativ cu 24 de ore). Acest efect cumulativ este esențial în determinarea schemelor de tratament optime, evitând subdozarea (care ar putea duce la ineficiență) sau supradozarea (care ar putea crește toxicitatea).

8. Extractele vegetale și nanoparticulele pot contribui la reducerea efectelor secundare ale chimioterapiei.

Un aspect important evidențiat de studii este faptul că anumite combinații de extracte vegetale și nanoparticule au protejat celulele sănătoase de toxicitatea medicamentelor citotoxice, fără a compromite efectul asupra celulelor canceroase. Acest lucru sugerează că terapiile bazate pe compuși naturali ar putea fi utilizate pentru a diminua efectele adverse ale chimioterapiei, reducând astfel disconfortul pacienților și îmbunătățind calitatea vieții acestora.

9. Monitorizarea farmacologică a medicamentelor oncologice trebuie îmbunătățită pentru a asigura siguranța pacienților.

Analiza farmacovigilenței arată că reacțiile adverse ale chimioterapicelor sunt semnificative și necesită o supraveghere constantă. Diferențele de raportare între regiunile geografice sugerează că există o nevoie de standardizare a monitorizării efectelor secundare la

nivel global. În plus, sub-raportarea reacțiilor adverse din partea pacienților poate influența percepția asupra siguranței unui medicament, ceea ce subliniază importanța unei educații mai bune a pacienților și a unei colaborări mai strânse între aceștia și profesioniștii din domeniul sănătății.

10. Medicina personalizată ar putea juca un rol cheie în optimizarea tratamentelor oncologice.

Rezultatele studiilor arată că nu toate terapiile funcționează la fel pentru fiecare pacient, iar toxicitatea poate varia în funcție de vârstă, sex și alți factori biologici. Personalizarea tratamentului pe baza profilului genetic și metabolic al fiecărui pacient ar putea ajuta la îmbunătățirea eficacității terapiilor și la reducerea efectelor secundare. Implementarea unor strategii de tratament adaptate fiecărui pacient ar putea reprezenta viitorul oncologiei, oferind rezultate mai bune și o tolerabilitate mai ridicată.

Aceste concluzii generale subliniază direcțiile majore ale cercetării în domeniul tratamentelor oncologice și antimicrobiene, evidențiind avantajele și provocările utilizării nanoparticulelor, extractelor vegetale și terapiile combinate. Viitoare studiile ar trebui să se concentreze pe validarea experimentală a acestor descoperiri, optimizarea formulărilor și integrarea acestor strategii în tratamentele clinice pentru a maximiza beneficiile pentru pacienți.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

77. Becker, E.C., G. Ozcan, and G.Y. Wu, *Primary Hepatic Extra-gastrointestinal Stromal Tumors: Molecular Pathogenesis, Immunohistopathology, and Treatment*. Journal of Clinical and Translational Hepatology, 2023. **11**(4): p. 942.
223. Parsania, et al., *Chelidonium majus L. alkaloid extract enhances TRAIL-induced apoptosis in HeLa cell line through death receptors 4 and 5 upregulation*. Gene Reports, 2021. **25**: p. 101311.
224. Shen, L., Lee, S., Joo, J. C., Hong, E., Cui, Z. Y., Jo, E., Jang, H. J. et. al, *Chelidonium majus induces apoptosis of human ovarian cancer cells via ATF3-mediated regulation of Foxo3a by Tip60*. Journal of microbiology and biotechnology, 2022. **32**(4): p. 493.
225. Ahmad, et al., *Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells*. Clinical cancer research, 2000. **6**(4): p. 1524–1528.
226. Ahsan, et al., *Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins*. Cancer letters, 2007. **249**(2): p. 198–208.
227. Vrba, et al., *Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells*. Toxicology in vitro, 2008. **22**(4): p. 1008–1017.
228. Nouredini, et al., *Transcriptional down regulation of hTERT and senescence induction in HepG2 cells by chelidonine*. World Journal of Gastroenterology, 2009. **15**(29): p. 3603.
229. Vrba, et al., *Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells*. Toxicology in vitro, 2009. **23**(4): p. 580–588.
230. Qu, et al., *Chelidonine induces mitotic slippage and apoptotic-like death in SGC-7901 human gastric carcinoma cells*. Molecular Medicine Reports, 2016. **13**(2): p. 1336–1344.
231. Havelek, et al., *Comparative cytotoxicity of chelidonine and homochelidonine, the dimethoxy analogues isolated from Chelidonium majus L.(Papaveraceae), against human leukemic and lung carcinoma cells*. Phytomedicine, 2016. **23**(3): p. 253–266.
232. Jang, et al., *Chelidonine induces apoptosis via GADD45a-p53 regulation in human pancreatic cancer cells*. Integrative Cancer Therapies, 2021. **20**.
233. Lin, et al., *Chelerythrine-induced apoptotic cell death in HepG2 cells involves the inhibition of Akt pathway and the activation of oxidative stress and mitochondrial apoptotic pathway*. Antioxidants, 2022. **11**(9): p. 1837.
234. Biswas, et al., *Efficacy of a plant extract (Chelidonium majus L.) in combating induced hepatocarcinogenesis in mice*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(5): p. 1474–1487.
235. Mikołajczak, et al., *Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from herb of Chelidonium majus L.* Central European Journal of Immunology, 2015. **40**(4): p. 400–410.
236. Vl and S, *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. Methods in Enzymology, 1999. **299**: p. 152–178.
237. Waisundara, V., *Antioxidants: Benefits, Sources, Mechanisms of Action*. 2021: IntechOpen.
238. Sarwar, et al., *Evaluation of antioxidant, free radical scavenging, and antimicrobial activity of Quercus incana Roxb*. Frontiers in Pharmacology, 2015. **6**: p. 277.
247. Yue, et al., *Structural insight into apelin receptor-G protein stoichiometry*. Nature structural & molecular biology, 2022. **29**(7): p. 688–697.
248. Ring, et al., *Adrenaline-activated structure of β 2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 575–579.
249. Cai, et al., *Structures of adenosine receptor A2BR bound to endogenous and synthetic agonists*. Cell Discovery, 2022. **8**(1): p. 140.
250. Laskowski, et al., *PDBsum: Structural summaries of PDB entries*. Protein science, 2018. **27**(1): p. 129–134.
252. O'Boyle, et al., *Open Babel: An open chemical toolbox*. Journal of cheminformatics, 2011. **3**: p. 1–14.

Anexa 4 – Index Lucrări Științifice

4.1 Lucrări publicate în extenso ca prim autor în reviste cotate ISI, indexate Web of Science:

4.1.1 Mirela Claudia Rîmbu, Liliana Popescu, Mirela Mihăilă, Roxana Colette Sandulovici, Daniel Cord, Carmen Marinela Mihailescu, Mona Luciana Galatanu, Mariana Panturoiu, Carmen Elisabeta Manea, Adina Boldeiu, Oana Brincoveanu, Mihaela Savin, Alexandru Grigoriu, Florin Dan Ungureanu, Emilia Amzoiu, Mariana Popescu, Elena Truta, *Synergistic Effects of Green Nanoparticles on Antitumor Drug Efficacy in Hepatocellular Cancer*, *Biomedicines* 2025, 13, 641, <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030641>, **FI=3,9**

4.1.2 Mirela Claudia Rîmbu, Dan Florin Ungureanu, Cosmin Modovan, Madalina Toba, Marinela Chirila, Elena Truta, Daniel Cord, *Cystic Hepatic GIST: A Case Report of Rare Presentation and Long-Term Survival*, *Curr. Oncol.* 2025, 32, 383 <https://doi.org/10.3390/curroncol32070383>, **FI=3,4**

4.1.3 Mirela Claudia Rîmbu, Daniel Cord, Mihaela Savin, Alexandru Grigoriu, Mirela Antonela Mihăilă, Mona Luciana Gălățanu, Viorel Ordeanu, Mariana Panțuroiu, Vasilica Țucureanu, Iuliana Mihalache, Oana Brîncoveanu, Adina Boldeiu, Veronica Anăstăsoaie, Carmen Elisabeta Manea, Roxana Colette Sandulovici, Marinela Chirilă, Adina Turcu Știolică, Emilia Amzoiu, Victor Eduard Peteu, Cristiana Tănase, Bogdan Firtat, Crmen Marinela Mihăilescu, *Harnessing Plant-Based Nanoparticles for Targeted Therapy: A Green Approach to Cancer and Bacterial Infections*, *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, 26(14), 7022; <https://doi.org/10.3390/ijms26147022> (registering DOI) <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/14/7022>, **FI=4,9**

4.1.4 Daniel Cord, **Mirela Claudia Rîmbu** - autor corespondent, Cristiana Tănase, Cristina Tăbleț, Gheorghe Duca, *Molecular docking study of some active principles from *Silybum marianum*, *Chelidonium majus*, *Ginkgo biloba*, *Gelsemium sempervirens*, *Artemisia annua* and *Taraxacum officinale**, *Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry.* 2025, 20(1), 100-105 <https://doi.org/10.19261/cjm.2025.1337>, **FI=0,5**

4.2 Lucrări publicate în extenso ca prim autor (respectiv coautor) în reviste indexate PubMed:

4.2.1 Daniel Cord, **Mirela Claudia Rîmbu** – autor corespondent, Liliana Popescu, *New prospects in oncotherapy: bioactive compounds from *Taraxacum officinale**, *Medicine and Pharmacy Reports*, <https://doi.org/10.15386/mpr-2875>

4.3 Lucrări prezentate ca prim autor (respectiv coautor) la manifestări științifice naționale și internaționale:

4.3.1 Daniel Cord, **Mirela Claudia Rîmbu**, Cristiana Tanase, *Alkaloid Constituents of *Chelidonium majus* L.: An Overview of Their Biological Activity and Toxicity*, Conferința cu participare internațională a Facultății de Medicină a Universității Titu Maiorescu, Abordări inovatoare transdisciplinare în medicina modernă, ediția a VIII-a, București, 16-18 mai 2025

4.3.2 Mirela Claudia Rîmbu, Daniel Cord, Raluca Neacșa, Cristiana Tănase, Mariana Popescu, *Chemopreventive potential of *Taraxacum officinale*: a natural approach to cancer prevention* (Abstract), International Conference, Education and creativity for a knowledge based society (18th edition), Universitatea Titu Maiorescu, november 21 - 23, 2024, București

4.3.3 Mariana Panțuroiu, Mona Luciana Gălățanu, Luiza Mădălina Cima, Roxana Măriuca Gavrilăoia, Roxana Colette Sandulovici, Mariana Popescu, Daniel Cord, **Mirela Claudia Rîmbu**, *Evaluation of antioxidant activity and bioactive compound content in *Silybum marianum*, *Cynara scolymus* and *Taraxacum officinale*: Synergistic potential and therapeutic implications*, International Conference, Education and creativity for a knowledge based society (18th edition), Universitatea Titu Maiorescu, november 21 - 23, 2024, București

4.3.4 Mirela Mihăilă, Marinela Bostan, Viviana Roman, Camelia Hotnog, Mariana Popescu, Roxana Colette Sandulovici, Daniel Cord, **Mirela Claudia Rîmbu**, *Compositional study and evaluation of the antiproliferative action of *Chelidonium majus* extract on tumor cell lines*, Al 10-lea Congres al Federației Societății Române de Cancer, al 30-lea Congres al Societății Române de Radioterapie și al 35-lea Congres al Societății Române de Radioterapie și Oncologie Medicală, 24-27.10.2024, Sinaia, România (poster)

4.3.5 Rîmbu Mirela, Toba Mădălina Elena, Moldovan Cosmin, Ungureanu Florin Dan, *New developments in the correlation of imaging with the diagnosis and evolution of gastrointestinal stromal tumours*, Conferința cu participare internațională a Facultății de Medicină a Universității Titu Maiorescu, Abordări inovatoare transdisciplinare în medicina modernă, ediția a VI-a (01-03 iunie 2023)

4.3.6 Mariana Panțuroiu, Mona Luciana Gălățanu, **Mirela Claudia Rîmbu**, *The anticancer effect of polyphenols*, International Conference, Education and creativity for a knowledge based society (16th edition), Universitatea Titu Maiorescu, november 24 - 26, 2022, București