

# TEZĂ DE ABILITARE

## COMPUȘI NATURALI ȘI DE SINTEZĂ CU POTENȚIAL ANTIOXIDANT ȘI ANTITUMORAL

Conf. Dr. ROXANA LIANA STAN

### REZUMAT

Activitatea științifică, profesională și academică a dnei conferențiar universitar dr. Roxana Liana Stan, desfășurată ulterior conferirii titlului de doctor (2007) până în prezent, s-a derulat în domeniul științelor farmaceutice și este prezentată în cadrul tezei de abilitare cu titlul „Compuși naturali și de sinteză cu potențial antioxidant și antitumoral”. Principala temă de cercetare consecutiv susținerii tezei de doctorat este în strânsă legătură cu terapia bolii canceroase, una dintre cele mai mari probleme de sănătate publică din secolul XXI.

Cercetările științifice s-au axat pe dorința de a descoperi un nou compus cu acțiune antioxidantă/antitumorală care să poată fi utilizat preventiv și/sau curativ în terapia cancerului, care să prezinte citotoxicitate selectivă și care să fie introdus în uz ca potențial agent antitumoral. În acest scop, cercetările întreprinse au fost orientate spre două direcții. Prima direcție, a constat în obținerea unor compuși naturali, pentru care au fost recoltate plante de pe teritoriul României, au fost obținute extracte vegetale care ulterior au fost caracterizate și apoi a fost evaluat potențialul lor antioxidant/antitumoral. Au fost luate în studiu șapte extracte vegetale, obținute din *Văscum album* L., *Euonymus europaeus* L., *Centaurea cyanus* L., *Calendula officinalis* L., *Verbascum phlomoides* L., *Salvia officinalis* L. și *Artemisia annua* L. A doua direcție de cercetare a fost reprezentată de sinteza în laborator a unor noi compuși ai Cu(II) care au fost caracterizați din punct de vedere structural și a căror activitate biologică a fost consecutiv evaluată. Au fost sintetizați nouă noi complecși ai Cu(II) cu liganzi de tip sulfonamide N-substituite, care au fost caracterizați prin analiză chimică elementală, difracție cu raze X pe monocristal, spectroscopie în UV-Vis, IR, RES și prin determinări de susceptibilitate magnetică.

Activitatea biologică a extractelor vegetale și a complecșilor de Cu(II) a fost evaluată având ca scop determinarea activității lor antioxidante și antitumorale. Pentru extractele vegetale s-a studiat efectul lor antioxidant *in vitro* utilizând metodele DPPH, FRAP și ABTS precum și activitatea SOD-mimetică *in vivo* utilizând tulpini de *Saccharomyces cerevisiae*. Extractele vegetale testate au prezentat o activitate antioxidantă *in vitro*. Testarea activității SOD-mimetice *in vivo* s-a realizat prin inducerea unor condiții de stres oxidativ tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae*  $\Delta$ sod1 (tratate cu menadionă/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) și studierea capacității extractelor vegetale de a completa deficiența enzimatică SOD de la nivelul acestor tulpini. Extractele testate și-au dovedit eficiența împotriva anionului radical superoxid, posedând astfel activitate SOD-mimetică. Pentru complecșii de Cu(II) nou sintetizați, s-a evaluat activitatea lor SOD-mimetică *in vitro*, utilizând sistemul xantină/xantinioxidază și s-a studiat de asemenea capacitatea acestora de a scinda molecula de ADN, prin intermediul studiilor de activitate nucleazică. Rezultatele obținute au indicat o activitate nucleazică superioară a complecșilor de Cu(II) nou sintetizați în comparație cu sulfatul de cupru. Studiile de activitate nucleazică efectuate în prezența unor agenți inhibitori (dimetilsulfoxid, alcool terț-butilic, azidă sodică, 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidonă, distamicină, neocuproină) au permis stabilirea speciilor reactive de oxigen implicate în distugerea moleculei de ADN. Astfel, radicalii HO· și anionul radical superoxid O<sub>2</sub><sup>-</sup> sunt responsabili de scindarea moleculei de acid nucleic. Complecșii de Cu(II) testați au dovedit activitate SOD-mimetică *in vitro*, dar inferioară enzimei SOD native.

Datorită faptului că atât extractele vegetale cât și complecșii de Cu(II) nou sintetizați au prezentat o activitate antioxidantă promițătoare atât *in vitro* cât și *in vivo* au fost continuate studiile pe diferite linii de culturi celulare tumorale (B16F10, WM35, HeLa, A2780, A2780cis) având ca scop demonstrarea

citotoxicității selective a compușilor naturali și de sinteză luați în studiu. S-a utilizat testul de proliferare celulară cu MTT, ca și control antitumoral s-au folosit doxorubicina, cisplatina, carboplatina, iar ca linii celulare normale: HFL1, HDFa și D407. S-a dorit obținerea unui nou produs care să nu fie citotoxic și pentru celulele normale, deci înlăturarea marelui dezavantaj al produselor antitumorale utilizate în practica clinică din zilele noastre. S-a demonstrat că toate extractele vegetale prezintă citotoxicitate. Extractele de *Vâscum album* L., *Euonymus europaeus* L., *Artemisia annua* L. prezintă citotoxicitate selectivă asupra celulelor tumorale și *Artemisia annua* L. prezintă o citotoxicitate doar de aproximativ șase ori mai scăzută decât doxorubicina asupra celulelor tumorale. Noii complecși de Cu(II), prezintă citotoxicitate pe liniile de celule tumorale testate, unii dintre ei mai mare decât antitumoralele de referință. De subliniat este faptul că complecșii testați au dovedit o citotoxicitate selectivă, ceea ce reprezintă un avantaj fantastic. Pentru extractul vegetal de *Euonymus europaeus* L. și pentru doi dintre complecșii de sinteză ai Cu(II) s-au efectuat și studii de apoptoză/necroză tumorală utilizând dubla colorare a celulelor tumorale și normale cu Anexină V-FITC/iodură de propidium prin citometrie de flux. În urma studiilor efectuate *in vitro* cea mai bună activitate antitumorală a prezentat-o un complex cu fenantrolină.

Având în vedere faptul că în urma studiilor *in vitro* au fost obținute rezultate încurajatoare o parte dintre extractele vegetale (*Vâscum album* L., *Euonymus europaeus* L. și *Artemisia annua* L.) și un singur complex al Cu(II) au fost testate și *in vivo* pe șoareci de laborator. Experimentele au fost autorizate de Comisiile de Bioetică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, respectiv a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Ca model tumoral a fost inoculat i.p. carcinomul ascitic Ehrlich (EAC), iar ca antitumoral de referință a fost utilizată doxorubicina administrată i.p. În cazul administrării i.p. a extractelor vegetale de *Vâscum album* L. și *Artemisia annua* L. post inoculare EAC s-a demonstrat eficacitatea asocierii extractului vegetal la doxorubicină prin potențarea acțiunii antitumorale și a faptului că extractele nu prezintă toxicitate hepatică, renală sau/și hematologică. Pentru extractul de *Euonymus europaeus* L. administrat post inoculare EAC s-a demonstrat că efectul antitumoral este dozo-dependent, că este influențat de calea de administrare (i.p. sau orală), fiind eficace în urma administrării i.p. și că nu prezintă toxicitate hepatică, renală și/sau hematologică. Pentru complexul de Cu(II) s-a demonstrat acțiunea sa antitumorală post inoculare EAC și faptul că toxicitatea sa la nivel hematologic este acceptabilă. Având ca scop demonstrarea activității antitumorale s-au urmărit parametrii de proliferare tumorală: greutate corporală, volum ascitic, concentrația și numărul de celule ascitice. În urma administrării extractelor de *Vâscum album* L. și *Artemisia annua* L. la șoareci s-au determinat din sânge și din celulele ascitice SOD, CAT, Px și XOD, având ca și scop evaluarea influenței speciilor reactive de oxigen asupra efectului antitumoral observat. S-a demonstrat o corelație pozitivă/negativă interesantă între dezvoltarea EAC și activitatea enzimelor implicate în stresul oxidativ. S-a pus în balanță efectul antitumoral al extractelor vegetale/compușului de Cu(II) și riscul lor de toxicitate având ca scop demonstrarea eficacității acestora. Putem concluziona că, asocierea unui extract vegetal la un antitumoral consacrat potențează acțiunea sa antitumorală și că singurul complex al Cu(II) testat *in vivo* pe șoareci prezintă activitate antitumorală promițătoare și toxicitate acceptabilă.

Activitatea științifică postdoctorală s-a concretizat prin publicarea a 30 de articole în extenso dintre care 16 articole în reviste cotate ISI (14 în calitate de autor principal) și 14 articole în reviste BDI. Unul dintre articole a fost premiat de către UEFISCDI în anul 2018. După susținerea tezei de doctorat am fost implicată în 4 proiecte de cercetare câștigate prin competiții la nivel național (unul în calitate de responsabil și 3 în calitate de membru). Rezultatele obținute au fost comunicate la numeroase manifestări științifice. Impactul activității de cercetare este reprezentat de indicele Hirsch din baza de date ISI Thomson Web of Science (=7).

Activitatea didactică am desfășurat-o în cadrul Disciplinei de Biochimie farmaceutică și Laborator clinic și a constat în predare de cursuri, susținere de seminarii și efectuarea de lucrări practice la nivel de licență, anul I și II, Specializarea Nutriție și Dietetică, anul II și III Facultatea de Farmacie, la nivel de rezidențiat și de cursuri postuniversitare. Am publicat un număr de 6 cărți, 12 capitole de carte și 8 caiete de lucrări practice și am coordonat un număr de 21 lucrări de licență.

Pe plan științific, voi urmări continuarea direcțiilor de cercetare desfășurate până în prezent, dar și abordarea unor noi teme de cercetare din domeniul de interes al grupului de cercetători din care fac

parte. Dorim să obținem alți noi compuși de sinteză ai Cu(II) cu activitate nucleazică, antioxidantă și/sau antitumorală și în plus să le testăm și activitatea antimicrobiană și antiinflamatoare. Pentru compușii ce prezintă solubilitate redusă ne propunem să încercăm încorporarea lor în ciclodextrine, în nanoparticule pe bază de materiale biocompatibile și biodegradabile (naturale/ sintetice) sau să obținem nanoparticule de aur cu complecși de Cu(II) biologic activi. Odată demonstrată activitatea acestora *in vitro* intenționăm să le testăm activitatea *in vivo*, pe șoareci de laborator. Am dori de asemenea să ne lărgim domeniul de cercetare prin sintetizarea, caracterizarea și testarea activității biologice a unor noi combinații complexe cu alți ioni metalici, de exemplu Co(II), Zn(II), Ni(II), Mn(II). Legat de domeniul fitoterapiei experimentale, dorim să ne perfecționăm în ceea ce privește caracterizarea și standardizarea extractelor vegetale pentru a avea posibilitatea să demonstrăm datorită cărui principiu activ extractul vegetal deține efectul biologic urmărit (antioxidant, antitumoral, antiinflamator, antimicrobian) și să reușim să elucidăm mecanismul său de acțiune. Pentru fitoproduse am dori de asemenea să testăm activitatea biologică și toxicitatea acestora și după administrare topică, nu doar după administrare orală și intra peritoneală.

Pentru a asigura infrastructura și resursele materiale necesare îmi propun să particip la competiții naționale având ca și scop câștigarea de proiecte de cercetare cu finanțare. Rezultatele studiilor vor fi comunicate la manifestări științifice și publicate în reviste de specialitate.

Pe plan didactic voi adapta și actualiza în permanență cursurile, seminariile și lucrările practice ce urmează să le prezint studenților de la Facultatea de Farmacie, specializările Farmacie și Nutriție Dietetică, voi încerca să-mi adaptez continuu metodele de predare în funcție de rezultatele concrete obținute, voi corela informațiile teoretice prezentate cu aplicațiile practice, voi redacta materiale didactice având ca scop formarea unor profesioniști bine pregătiți în domeniul practicii farmaceutice și al nutriției.

Ca și concluzie, doresc să-mi construiesc o carieră academică și o reputație profesională excelentă, care să-mi asigure succes și împlinire personală, dar și o vizibilitate crescută a Disciplinei de Biochimie farmaceutică și Laborator clinic și a Facultății de Farmacie din cadrul Facultății de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

## ABSTRACT

The scientific, professional and academic activity of Ms. Associate Professor Phd Roxana Liana Stan, since she was awarded the PhD title (2007) until now, took place in the field of pharmaceutical sciences and is presented within the habilitation thesis entitled "Natural and synthetic compounds with antioxidant and antitumor potential". The main research theme after the defense of the PhD thesis is closely related to cancer therapy, one of the greatest public health problems in the 21st century.

Scientific research has focused on the desire to discover a new compound with antioxidant/antitumor action, which could be used preventively and/or curatively in cancer therapy, which exhibits selective cytotoxicity and which may be introduced into therapeutic use as a potential antitumor agent. For this purpose, the research has been focused towards two directions. The first research direction consisted in obtaining natural compounds with antioxidant and antitumor activity. Plants were harvested from Romanian territory, plant extracts were obtained and characterized and then their antioxidant/antitumor potential was evaluated. There were studied seven plant extracts, obtained from *Vâscum album* L., *Euonymus europaeus* L., *Centaurea cyanus* L., *Calendula officinalis* L., *Verbascum phlomoides* L., *Salvia officinalis* L. and *Artemisia annua* L. The second direction of the research was represented by the synthesis of some new Cu(II) compounds which were structural characterized and for which the biological activity studies were performed. So, nine complex combinations of Cu(II) with N-substituted sulfonamide ligands were synthesized and characterized by elemental analysis, X-ray diffraction on monocrystal, UV-Vis, IR, RES spectroscopy and by magnetic susceptibility determinations.

The biological activity of the plant extracts and of the Cu(II) complexes was evaluated in order to determine their antioxidant and antitumor activity. For the plant extracts, the *in vitro* antioxidant activity was studied using the DPPH, FRAP and ABTS methods as well as their *in vivo* SOD-mimetic activity using *Saccaromyces cerevisiae* strains. The tested plant extracts presented *in vitro* antioxidant activity. Testing SOD-mimetic activity *in vivo* was performed by inducing oxidative stress condition for *Saccaromyces cerevisiae*  $\Delta$ sod1 strains (treated with menadione/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and studying to what extent the tested plant extracts complete the deficiencies of the SOD enzyme from these strains. The tested plant extracts can be considered as effective agents against the toxicity of the radical superoxide anion, thus possessing SOD-mimetic activity. For the new Cu(II) complexes we evaluated the *in vitro* SOD-mimetic activity using the xanthine/xanthineoxidase system and we also studied their ability to split the DNA molecule through nuclease activity studies. The obtained results indicated a superior nuclease activity for the new synthesized Cu(II) complexes compared to copper sulphate. Nuclease activity studies performed in the presence of certain inhibitory agents (DMSO, t-butyl alcohol, sodium azide, 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone, distamycin, neocuproine) allowed to establish which reactive oxygen species are involved in the destruction of DNA molecule. So, HO· and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals have been determined to be responsible for the cleavage of the nucleic acid. The tested Cu(II) complexes have proven some *in vitro* SOD-mimetic activity, but inferior to the native SOD enzyme.

Due to the fact that both the plant extracts and the newly synthesized Cu(II) complexes showed promising *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity, studies were continued on different tumor cell lines (B16F10, WM35, HeLa, A2780, A2780cis) with the aim of demonstrating the selective cytotoxicity of the natural and synthetic compounds under study. MTT cell proliferation assay was used. As antitumor control where used doxorubicin, cisplatin and carboplatin and as normal cell lines: HFL1, HDFa and D407. It was desired to obtain a new product that is non-cytotoxic on normal cells, thus removing the great disadvantage of the antitumor products used nowadays in clinical practice. All plant extracts have been shown to exhibit cytotoxicity. More than that, *Vâscum album* L., *Euonymus europaeus* L., *Artemisia annua* L. extracts have showed to exhibit selective cytotoxicity on tumor cells. *Artemisia annua* L. extract has a cytotoxicity of only about six times lower than doxorubicin on tumor cells. The new Cu(II) complexes present cytotoxic activity on the tested tumor cells, some of them superior to the antitumor control. To be emphasized the fact that the Cu(II) complexes proved a lack of toxicity on normal cell lines, which is a

great advantage. For *Euonymus europaeus* L. extract and for two of the Cu(II) complexes we have also performed the evaluation of tumor apoptosis/necrosis by double staining of tumor and normal cells with Annexin V-FITC/propidium iodide using the flow cytometry assay. Following *in vitro* studies, the best antitumor activity was showed by a complex with phenanthroline.

Considering the fact that the *in vitro* studies showed encouraging results we performed *in vivo* studies on laboratory mice for a part of the plant extracts (*Vâscum album* L., *Euonymus europaeus* L. și *Artemisia annua* L.) and for a single Cu(II) complex. The experiments were approved by the Bioethical Boards of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu-Hațieganu" Cluj-Napoca and of the University of Agricultural Science and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. As tumor model, Ehrlich Ascitic Carcinoma (EAC) was inoculated intraperitoneal and as antitumor control was used doxorubicin, also intraperitoneal administrated. We demonstrated the efficacy of the association of the plant extract (*Vâscum album* L. or *Artemisia annua* L. intraperitoneal administrated) to doxorubicin after EAC inoculation, in the fact that the antitumor activity of doxorubicin is increased. Also, the plant extracts do not have hepatic, renal and/or hematological toxicity. For the *Euonymus europaeus* L. extract administrated intraperitoneal after EAC inoculation it had been demonstrated that the antitumor activity is dose-dependent and that it is influenced by the route of administration (intraperitoneal or oral) being effective after intraperitoneal administration. *Euonymus europaeus* L. extract had no hepatic, renal and/or haematological toxicity. For the Cu(II) complex it had been demonstrated its antitumor activity after EAC inoculation and the fact that its haematological toxicity is acceptable. With the aim of proving the antitumor activity, the tumor proliferation parameters were observed: body weight, ascitic volume, concentration and number of ascitic cells. Following the administration of *Vâscum album* L. and *Artemisia annua* L. at mice, the SOD, CAT, Px and XOD enzymes from blood and ascitic cells were determined, with the purpose of assessing the influence of reactive oxygen species on the observed antitumor effect. An interesting positive/negative correlation has been demonstrated between the development of EAC and the activity of enzymes involved in oxidative stress. The antitumor effect of plant extracts/Cu(II) compounds and their toxicity risk were assessed in order to demonstrate their efficacy. We can conclude that associating a plant extract to an established antitumor increases its antitumor activity and that the only Cu(II) complex tested *in vivo* on mice exhibits promising antitumor activity and acceptable toxicity.

The scientific activity carried out after obtaining the PhD title has been materialized by publishing a number of 30 in extenso articles. 16 articles were published in ISI rated journals (14 as principal author) and 14 articles in BDI journals. One of the articles was awarded by UEFISCDI in 2018. After defending the PhD thesis I was involved in 4 research projects won through competitions at national level (one as responsible and 3 as a member). The results of the research have been communicated at numerous scientific manifestations. The impact of the research activity is represented by the Hirsch index from the ISI Thomson Web of Science database (= 7).

The didactic activity was carried out within the Pharmaceutical biochemistry and Clinical laboratory Department and consisted of teaching courses, supporting seminars and carrying out practical works at bachelor level (second and third year students from Faculty of Pharmacy and first and second year students from Nutrition and Dietetics specialization, Faculty of Pharmacy), at residency level and postgraduate courses. After obtaining the PhD title I have published 6 books, 12 chapters in books, 8 practical lab books and I have coordinated a number of 21 bachelor's papers.

At the scientific level, I propose to continue the research directions approached since I obtained the PhD title until now, but also addressing new research themes in the area of interest for the group of researchers I belong to.

We want to synthesize other new Cu(II) complexes with nuclease, antioxidant and/or antitumor activities and in addition to test their antimicrobial and antiinflammatory activity. For the complexes with low solubility we aim to try to incorporate them into cyclodextrins, nanoparticles based on biocompatible and biodegradable materials (natural/synthetic) or to obtain gold nanoparticles with biological active Cu(II) complexes. Once their *in vitro* activity is demonstrated, we intend to test their *in vivo* activity on laboratory mice. We also want to enlarge our field of research by synthesizing, characterizing and testing the biological activity of new complex combinations with other metal ions, for example Co(II), Zn(II),

Ni(II), Mn(II). Regarding the field of experimental phytotherapy, we want to improve the characterization and standardization of the plant extracts in order to have the possibility to demonstrate due to which active principle the plant extract holds the sought biological effect (antioxidant, antitumor, antiinflammatory, antimicrobial). In this way, we want to elucidate its mechanism of action. For the phytoproducts, we also intend to test their biological activity and their toxicity after topical administration, not only after oral and intraperitoneal administration.

To provide the necessary infrastructure and material resources, I wish to participate to national competitions with the aim of winning research projects with funding. The research results will be communicated at scientific manifestations and published in specialized journals.

For the didactic activity I will constantly update the courses, seminars and practical works which I will present to the students of the Faculty of Pharmacy, Pharmacy and Nutrition Dietetics specializations and I will try to continuously adapt my teaching methods according to the concrete obtained results. In my exposures I will correlate the theoretical information with the practical applications and also I will elaborate teaching materials with the purpose to train well prepared professionals in the field of pharmaceutical and nutrition practice.

As a conclusion, I wish to build my academic career and to get an excellent professional reputation, to ensure my success and personal fulfillment, but also to increase the visibility of the Pharmaceutical biochemistry and Clinical laboratory Department and of the Faculty of Pharmacy within the Faculty of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.