

RAPORT ȘTIINȚIFIC

Titlul proiectului: "Chemical profiling and *in vitro* biological properties of extracts containing rosmarinic acid, obtained from *Thymus* sp. and *Rosmarinus* sp. (Lamiaceae)"

Lista publicații

1. Ielciu I., Filip G.A., Oniga I., Olah N.K., Bâldea I., Olteanu D., Burtescu R.F., Turcuș V., Sevastre-Berghian A.C., Benedec D., Hanganu D. - „Oxidative Stress and DNA Lesions Reduction of a Polyphenolic Enriched Extract of *Thymus marschallianus* Willd. in Endothelial Vascular Cells Exposed to Hyperglycemia” (Plants 10/2810, 2022 - Q1 cu FI = 4.658)
2. Ielciu I., Niculae M., Pall E., Barbălată C., Tomuță I., Olah N.-K., Burtescu R.F., Benedec D., Oniga I., Hanganu D. - Antiproliferative and Antimicrobial Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Loaded Liposomes (Molecules 27/3988, 2022 - Q2 cu FI = 4,927)
3. Ielciu I., Oniga I., Tămaș M., Mărculescu A., Benedec D., Hanganu D. - Composition chimique et activités pharmacologiques de *Rosmarinus officinalis* L.: une revue générale mise à jour (Ethnopharmacologia 66/2022, 1 - BDI)

Obiectivele prevăzute/realizate, activitățile asociate și realizate

Pentru îndeplinirea obiectivelor proiectului, s-au realizat o serie de activități asociate obiectivelor generale și specifice ale proiectului (**Tabelul 1**).

Tabelul 1. Obiectivele generale și specifice proiectului și activitățile realizate în cadrul acestora

Nr. Crt.	Obiective generale	Obiective specifice	Activități asociate
1.	Obținerea materialului vegetal	Obținerea materialului vegetal	Recoltarea celor două specii
			Stabilirea identității celor două specii
			Prelucrarea și conservarea materialului vegetal
2.	Analiza fitochimică a extractelor vegetale aparținând celor două specii	Analiza fitochimică a extractelor de <i>T. marschallianus</i>	Obținerea unor extracte vegetale îmbogățite în polifenoli și a unor macerate etanolice
			Identificarea și cuantificarea polifenolilor din componența celor 2 extracte
		Analiza fitochimică a extractelor de <i>R. officinalis</i>	Obținerea unor extracte vegetale îmbogățite în polifenoli și a unor macerate etanolice
			Identificarea și cuantificarea polifenolilor din componența celor 2 extracte
3.	Testarea activității biologice a extractelor aparținând celor două specii	Testarea activității biologice a extractelor speciei <i>T. marschallianus</i> prin studii <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i>	Studierea comparativă <i>in vitro</i> a efectelor a două extracte îmbogățite în polifenoli, obținute din specia recoltată din flora spontană și din culturi asupra celulelor endoteliale ale venei ombilicale umane (HUVEC) expuse la condiții normoglicemice și hiperglicemice: cuantificarea stresului oxidativ și a expresiilor NF-κB, pNF-κB, HIF-1α și γ-H2AX
			Studierea comparativă a efectelor extractelor celor două specii și ale AR asupra inimilor și aortelor șobolanilor diabetici
		Testarea activității biologice a extractelor speciei <i>R. officinalis</i> prin studii <i>in vitro</i>	Încorporarea extractului speciei <i>R. officinalis</i> în lipozomi și studiarea efectelor antiproliferative și antimicrobiene ale acestor forme farmaceutice încărcate cu extractul vegetal al speciei

			<p>Studierea efectului <i>in vitro</i> unui extract îmbogățit în polifenoli asupra viabilității celulelor de carcinom hepatocelular uman (HepG2) și pe trei tulpini bacteriene, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la metilicilină (MRSA) și <i>Escherichia coli</i></p> <p>Studierea comparativă a efectelor extractelor celor două specii și ale AR asupra inimilor și aortelor șobolanilor diabetici</p>
4.	Diseminarea rezultatelor obținute în urma experimentelor întreprinse în cadrul proiectului	Publicarea de articole științifice în reviste cotate ISI	Redactarea și trimiterea spre publicare a unor articole ISI către reviste din Q1 sau Q2
		Participarea la manifestări științifice naționale și internaționale	Pregătirea prezentării rezultatelor obținute sub formă de poster pentru prezentarea la o manifestare națională (Zilele Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România) și o manifestare internațională (The Seventh International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, İzmir, Turcia)

Prezentarea rezultatelor obținute, a indicatorilor de rezultat realizați

Obiectivul specific 1 (Obținerea materialului vegetal) și activitățile asociate

Părțile aeriene înflorite de *T. marschallianus* și frunzele de *R. officinalis* au fost recoltate din flora spontană și din culturile din România și Moldova. Materialul vegetal a fost identificat prin utilizarea de instrumente specifice, în funcție de caz și compararea observațiilor cu determinatoarele florelor existente. Identificarea s-a realizat în cadrul Disciplinei de Botanică Farmaceutică și Farmacognozie a Facultății de Farmacie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, unde s-au păstrat și exemplarele voucher. Materialul vegetal a fost ulterior uscat la temperatura camerei, etichetat și conservat corespunzător (1–3).

Obiectivul specific 2 (Analiza fitochimică a extractelor vegetale aparținând celor două specii) și activitățile asociate

2.1. Obținerea extractelor vegetale îmbogățite în polifenoli aparținând speciilor *T. marschallianus* și *R. officinalis*

S-a pornit de la extractele vegetale ale celor două specii, obținute prin ultrasonicare în amestec etanol: apă 50% (v/v), iar extractele îmbogățite în polifenoli au fost obținute prin extracție în fază solidă (SPE) pe o coloană LiChrolut RP-18 E (40-63 mm) 500 mg/3 ml. Ambele tipuri de extracte au fost analizate comparativ printr-o metodă HPLC-DAD-MS. Coloanele SPE au fost spălate cu apă acidulată cu acid clorhidric și apoi s-au eluat extractele îmbogățite cu acetat de etil. Întreaga procedură s-a repetat de 3 ori și soluțiile eluate au fost uscate în vid la maximum 50°C. Reziduul uscat a fost ulterior dizolvat în amestec etanol:apă (70% V/V) și microfiltrat pentru a determina conținutul de polifenolici prin metoda HPLC-DAD-MS și conținutul polifenolic total prin metode spectrofotometrice (4).

2.2. Analiza fitochimică a extractelor vegetale aparținând speciilor *Thymus marschallianus* și *R. officinalis*

A fost realizată pe extractele îmbogățite în polifenoli, utilizând metode spectrofotometrice și HPLC-DAD-MS.

Rezultatele obținute la compararea extractelor inițiale și îmbogățite au arătat, în cazul *T. marschallianus*, faptul că conținutul de polifenoli și flavonoide a crescut prin concentrare SPE cu 80,8 % și 134,5 % la proba prelevată din cultură, respectiv cu 34,7 % și 94,1 % în cazul celei recoltate din flora spontană. Rezultatele obținute în analiza cantitativă au arătat valori mai mari pentru TFC în ambele

probe. Prin determinările HPLC-DAD-MS, s-a putut observa că acizii fenolici se găsesc în cantități mai mari în proba prelevată din flora spontană, iar flavonoidele se găsesc în cantități mai mari în proba obținută din cultură. În general, proba obținută din cultură este mai bogată în polifenoli, comparativ cu proba recoltată din flora spontană. Același tip de rezultate s-au obținut și în cazul *R. officinalis*, arătându-se astfel că extracția SPE a ajutat la îmbogățirea extractului în TPA, TFC, acid rosmarinic și luteolină. Cantitățile acestor compuși au fost aproape de dublare.

Obiectivul specific 3 (Testarea activității biologice a extractelor aparținând celor două specii) și activitățile asociate

3.1. Testarea activității biologice a extractelor îmbogățite în polifenoli aparținând speciei *T. marschallianus*

Scopul acțiunilor asociate acestui obiectiv a fost evaluarea efectului asupra stresului oxidativ, factorilor de transcripție și leziunilor ADN ale extractelor îmbogățite în polifenoli obținute din *T. marschallianus* asupra celulelor vasculare endoteliale expuse la condiții normoglicemice și hiperglicemice (2,4). Pentru a demonstra potențialul antidiabetic al TMSE și TMCE, celulele HUVEC au fost expuse la un condiții hiperglicemice iar rezultatele au arătat că hiperglicemia a indus stres oxidativ, efect diminuat de administrarea celor două extracte. Totodată, administrarea extractelor a scăzut expresia NF-κB în celulele expuse la hiperglicemie și a promovat activarea NF-κB, cu rol în proliferarea celulară, supraviețuirea celulelor și răspunsul imun adaptativ, în special extractul obținut din cultură. Extractul TMSE a inhibat activarea NF-κB și a protejat celulele împotriva inflamației și apoptozei. De asemenea, hiperglicemia a îmbunătățit expresiile HIF-1α, în timp ce extractele testate au ajutat la creșterea acestuia, ceea ce duce, prin urmare, la protecție față de efectele dăunătoare ale hipoxiei. Nu în ultimul rând, hiperglicemia a indus leziuni ale ADN-ului și formarea de rupturi ireparabile ale ADN-ului dublu catenar, proces atenuat de administrarea TMSE și TMCE. Aceste rezultate sugerează rolul protector al celor două extracte testate asupra leziunilor ADN, independent de doza utilizată sau proba testată (4).

3.2. Încorporarea extractului speciei *R. officinalis* în lipozomi și studierea efectelor antiproliferative și antimicrobiene ale acestor forme farmaceutice încarcate cu extractul speciei

Scopul acestei activități a constat în investigarea încapsulării în lipozomi a unui extract de frunze de *R. officinalis* și testarea potențialului său antimicrobian și antiproliferativ, ca și completare a studiilor realizate în etapele anterioare. Noutatea studiului constă în faptul că este singurul care propune și caracterizează sisteme speciale de eliberare precum lipozomii pentru încapsularea extractului de frunze de *R. officinalis*, cu scopul final de a îmbunătăți activitățile biologice ale polifenolilor săi, cum ar fi cele antimicrobiene și citotoxice. Astfel, se oferă premisele necesare pentru a continua studiile întreprinse în cele etapele desfășurate în cadrul acestui proiect.

Au fost dezvoltate formulări lipozomale, cu caracteristici specifice, potrivite pentru încorporarea extractului speciei, menite să scoată în evidență și să sporească activitățile sale biologice. Analiza LC-MS a lipozomilor a arătat cantități semnificative de polifenoli. Compușii care s-au găsit în cele mai mari cantități aparțin clasei acizilor fenolici (acid cafeic, acid clorogenic, acid rosmarinic și acid elagic). Acidul carnosic, un acid diterpenic, și carnosolul, diterpenul fenolic corespunzător, au fost de asemenea găsite în cantități semnificative. Cu toate acestea, acidul elagic (compusul de dimerizare al acidului galic) s-a dovedit a fi compusul majoritar în compoziția lipozomilor testați, fiind urmat de acidul cafeic și acidul clorogenic. Flavonoidele care s-au regăsit în compoziția lipozomilor sunt reprezentate atât prin agliconi (apigenina, luteolina, crisina, quercetina, naringenina, hesperetina), cât și prin glicozide (luteolin-7-O-glucozida, rutozida, hiperozida).

Potențialul antiproliferativ *in vitro* lipozomilor a fost evaluat pe două linii celulare umane, SK-Hep-1 (HTB-52™), derivate din lichidul ascitic al unui pacient cu adenocarcinom hepatic și pe LX-2, o linie de celule stelate hepatice umane. Rezultatele au fost corelate cu cele obținute în testele de apoptoză. Testele de viabilitate și apoptoză au arătat un comportament diferit al celulelor normale și tumorale expuse la lipozomii încărcăți. S-a observat o activitate citotoxică *in vitro* relevantă, precum și diferențe legate de doze și linii celulare.

Lipozomii obținuți au prezentat activitate antimicrobiană *in vitro* împotriva tuturor tulpinilor bacteriene utilizate. Pe baza valorilor diametrului zonei de inhibiție, cel mai intens efect a fost

înregistrat față de speciile Gram-pozitive (*Bacillus cereus* > MSSA > MRSA > *Enterococcus faecalis*) comparativ cu Gram-negative (*Salmonella enteritidis* = *Salmonella typhimurium* > *Escherichia coli*). Raportat la gentamicina utilizată ca martor pozitiv, aceste valori au fost semnificativ ($p < 0,05$) mai mari în cazul *Bacillus cereus*, MSSA, MRSA, *Enterococcus faecalis* față de germeii Gram-negativ. Lipozomii obținuți au prezentat activitate inhibitorie similară gentamicinei ($p > 0,05$). În mod similar, concentrațiile minime inhibitorii și bactericide stabilite prin metoda microdiluției au indicat o activitate antimicrobiană mai bună împotriva tulpinilor Gram pozitive, în concordanță cu rezultatele obținute preliminar. Având în vedere indicii MIC, produsul testat a manifestat activitate bactericidă față de toate speciile bacteriene testate ($MBC/MIC \leq 4$).

Obiectivul specific 4 (Diseminarea rezultatelor obținute în urma experimentelor întreprinse în cadrul etapei curente) și activitățile asociate

În ceea ce privește diseminarea rezultatelor proiectului, acest obiectiv a fost realizat prin publicarea a două articole ISI și un articol BDI:

- Publicația „Oxidative Stress and DNA Lesions Reduction of a Polyphenolic Enriched Extract of *Thymus marschallianus* Willd. in Endothelial Vascular Cells Exposed to Hyperglycemia” (revista *Plants* din Q1 cu FI = 4.658), aflată în stadiu avansat al recenziei în finalul etapei anterioare a apărut în revista *Plants*
- Publicația „Antiproliferative and Antimicrobial Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Loaded Liposomes” (revista *Molecules* din Q2 cu FI = 4,927) a apărut în revista *Molecules*
- Publicația „Composition chimique et activités pharmacologiques de *Rosmarinus officinalis* L.: une revue générale mise à jour” (BDI) a apărut în revista *Ethnopharmacologia*

Toate materialele care atestă aceste modalități de diseminare au fost încărcate pe platforma <https://uefiscdi-direct.ro/EVoC/> la secțiunile corespunzătoare.

Director de Proiect,
Șef Lucr. Dr. Irina Ielciu

Bibliografie

1. Niculae M, Hanganu D, Oniga I, Benedec D, Ielciu I, Giupana R, et al. Phytochemical Profile and Antimicrobial Potential of Extracts Obtained from *Thymus marschallianus* Willd. *Molecules*. 2019;24(3101):1–12.
2. Sevastre-Berghian AC, Ielciu I, Mitre AO, Filip GA, Oniga I, Vlase L, et al. Targeting Oxidative Stress Reduction and Inhibition of HDAC1, MECP2, and NF-kB Pathways in Rats With Experimentally Induced Hyperglycemia by Administration of *Thymus marshallianus* Willd. Extracts. *Front Pharmacol*. 2020;11:1–18.
3. Ielciu I, Sevastre B, Olah N-K, Turdean A, Chișe E, Marica R, et al. Evaluation of Hepatoprotective Activity and Oxidative Stress Reduction of *Rosmarinus officinalis* L. Shoots Tincture in Rats with Experimentally Induced Hepatotoxicity. *Molecules*. 2021;26(1737):1–15.
4. Ielciu I, Filip GA, Oniga I, Olah NK, Bâldea I, Olteanu D, et al. Oxidative stress and dna lesion reduction of a polyphenolic enriched extract of *thymus marschallianus* willd. In endothelial vascular cells exposed to hyperglycemia. *Plants*. 2021;10(2810):1–16.