
TEZĂ DE DOCTORAT

Evaluarea potențialului antitumoral al extractelor de *Mahonia aquifolium*

Doctorand **Andra-Diana Cecan (Andreicuț)**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Alexandru Irimie**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Stresul oxidativ în oncogeneză	19
1.1. Generalități	19
1.2. Oxidul nitric	20
1.3. Speciile reactive de oxigen - Ținte și efecte patologice	20
1.4. De la inflamație la cancer. Micromediul tumoral	23
1.4.1. Factori de transcripție	25
1.4.1.1. P53	25
1.4.1.2. Factorul nuclear eritroid-2	25
1.4.1.3. Kinaze proteice activate de mitogeni	26
1.4.1.4. Proteina activatoare-1	26
1.4.1.5. Factorul nuclear κ B	26
1.4.2. Metastazarea	27
1.4.2.1. Factorul inductibil al hipoxiei-1 α	28
1.4.2.2. Factorul de creștere a endoteliului vascular	28
1.4.2.3. Metaloproteinaza matriceală	28
2. Principii terapeutice în oncogeneză	31
2.1. Chimioterapie	31
2.2. Radioterapie	31
2.3. Agenți anticanceroși și ținte moleculare în cancer	31
2.4. Reacții adverse	33
2.5. Rezistența medicamentoasă	33
3. Fitoterapia în oncologie	35
3.1. Speciile de <i>Mahonia</i> în fitoterapie	35
3.2. Compușii fitochimici din speciile de <i>Mahonia</i>	36

3.2.1. Alcaloizi	36
3.2.2. Polifenoli	38
3.3. Utilizarea extractelor naturale pentru reducerea efectelor secundare ale celorlalte terapii	41
3.4. Ținte moleculare ale compușilor fitochimici în oncogeneză	41
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Ipoteza de lucru/Obiective	45
2. Studiul 1 - Analiza fitochimică a extractelor de <i>Mahonia aquifolium</i>	47
2.1. Introducere	47
2.2. Material și metodă	47
2.2.1. Reactivi	47
2.2.2. Prepararea extractelor de <i>Mahonia aquifolium</i>	47
2.2.3. Analiza HPLC a polifenolilor și alcaloizilor	48
2.3. Rezultate	49
2.4. Discuții	52
2.5. Concluzii	53
3. Studiul 2 - Evaluarea efectelor antioxidante și antiinflamatorii ale extractelor de <i>Mahonia aquifolium</i>	55
3.1. Introducere	55
3.2. Material și metodă	56
3.2.1. Reactivi	56
3.2.2. Efectele antioxidante <i>in vitro</i>	56
3.2.3. Inflamația experimentală	56
3.2.4. Evaluarea efectului antiinflamator	57
3.2.5. Evaluarea efectului antioxidant <i>in vivo</i>	57
3.2.6. Analiza statistică	58
3.3. Rezultate	59
3.3.1. Activitatea antioxidantă <i>in vitro</i>	59
3.3.2. Efectele antiinflamatorii și antioxidante <i>in vivo</i>	59

3.4. Discuții	62
3.5. Concluzii	65
4. Studiul 3- Efectele extractelor de <i>Mahonia aquifolium</i> asupra răspunsului imun celular	67
4.1. Introducere	67
4.2. Material și metodă	68
4.2.1. Reactivi	68
4.2.2. Evaluarea modulării răspunsului imun celular <i>in vitro</i> . Izolarea subseturilor de celule din PBMC	68
4.2.3. Determinarea citotoxicității	69
4.2.4. Detectia celulelor IL-10 pozitive și CD-25 pozitive	70
4.2.5. Determinarea factorului de necroză tumorală- α	70
4.3. Rezultate	71
4.4. Discuții	81
4.5. Concluzii	81
5. Studiul 4- Extractele de <i>Mahonia aquifolium</i> alterează comunicarea intercelulară și activează calea apoptotică dependentă de caspaze în celulele tumorale <i>in vitro</i>	83
5.1. Introducere	83
5.2. Material și metodă	84
5.2.1. Reactivi	84
5.2.2. Prepararea extractelor de <i>Mahonia aquifolium</i> în vederea testării biologice	84
5.2.3. Culturile celulare	84
5.2.4. Testarea citotoxicității	85
5.2.5. Metode imuno-enzimatice	86
5.2.6. Evaluarea conținutului proteic în probe	86
5.2.7. Molecula-1 de adeziune intercelulară	87
5.2.8. Molecula-1 de adeziune celulară vasculară	87
5.2.9. Caspaza-3 intracelulară	88
5.2.10. Caspaza-8 intracelulară	88
5.2.11. Matrix metaloproteinaza-9	89

5.3. Rezultate	89
5.3.1. Citotoxicitatea extractelor 1-5 de <i>Mahonia aquifolium</i>	89
5.3.2. Conținutul proteic al probelor supuse tratamentului	92
5.3.3. Inducerea apoptozei extrinseci	94
5.3.4. Modularea moleculelor de adeziune	95
5.3.5. Efectele extractelor 1-5 asupra matrix metaloproteinazei-9	97
5.4. Discuții	97
5.5. Concluzii	101
6. Studiul 5- Evaluarea efectelor cardioprotectoare, hepatoprotectoare și nefroprotectoare ale extractelor de <i>Mahonia aquifolium</i>	103
6.1. Introducere	103
6.2. Material și metodă	105
6.2.1. Reactivi	105
6.2.2. Grupurile de animale experimentale	105
6.2.3. Evaluarea efectelor antioxidante	105
6.2.4. Infarct miocardic acut experimental	105
6.2.4.1. Explorarea electrocardiografică	106
6.2.5. Inducerea insuficienței hepatice	106
6.2.6. Evaluarea insuficienței renale	106
6.2.7. Examenul histopatologic	106
6.2.8. Analiza statistică	107
6.3. Rezultate	107
6.3.1. Evaluarea efectelor cardioprotectoare	107
6.3.1.1. Parametrii infarctului miocardic acut	107
6.3.1.2. Efectele antioxidante <i>in vivo</i>	109
6.3.1.3. Evaluarea modificărilor electrocardiografice	112
6.3.1.4. Examen histopatologic	114
6.3.2. Evaluarea efectelor hepatoprotectoare	117
6.3.2.1. Parametrii insuficienței hepatice acute	117
6.3.2.2. Efectele antioxidante <i>in vivo</i>	120

6.3.2.3. Examen histopatologic	123
6.3.3. Evaluarea efectelor nefroprotectoare	126
6.3.3.1. Parametrii insuficienței renale acute	126
6.3.3.2. Efectele antioxidante <i>in vivo</i>	130
6.3.3.3. Examen histopatologic	133
6.4. Discuții	136
6.4.1. Efectele cardioprotectoare	136
6.4.2. Efectele hepatoprotectoare	137
6.4.3. Efectele nefroprotectoare	138
6.5. Concluzii	140
7. Concluzii generale	141
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	143
REFERINȚE	145

CUVINTE CHEIE

Cancer, stres oxidativ, oxid nitric, inflamatie, polifenoli, alcaloizi, *Mahonia aquifolium*.

INTRODUCERE

Cancerul este o patologie hiperproliferativă unde invazia și angiogeneza determină metastaze tumorale. Despre tumori se spune că sunt “răni care nu se vindecă”. Legătura dintre cancer și inflamație a fost făcută pentru prima oară în secolul XIX, pornind de la observația că tumorile se dezvoltă adesea la situsul inflamațiilor cronice și că celulele inflamatorii au fost prezente în probele de biopsie din tumori. În prezent, inflamația este privită ca și un “marker cheie” al cancerului, cu dovezi de necontestat care asociază inflamația cronică precum un factor de risc major pentru multe cancere.

Plantele sunt bogate în biomolecule, vitamine și minerale care sunt cruciale în menținerea sănătății organismului, demonstrând efecte promițătoare antitumorale *in vitro* și *in vivo*. Aceste efecte sunt datorate mai ales conținutului în flavonoide, care dețin importante activități antioxidante. Genul *Mahonia* cuprinde o serie de specii, printre care și *Mahonia aquifolium* (*M. aquifolium*), care a fost mult timp utilizată în medicina tradițională pentru diverse patologii ale pielii. Berberina, alcaloidul principal din *Mahonia* este utilizat în medicina asiatică ca și medicament datorită potențialului antimicrobian.

În stadiile inițiale ale cancerului este necesară fie excizia sau rezecția, fie chimioterapie și uneori radioterapie. Acestea din urmă adesea sunt însoțite de un număr mare de efecte secundare. Tratamentul în cancer țintește fiecare din pașii din dezvoltarea neoplazică, incluzând strategii anti-inițiere precum și strategii anti-proliferare tumorală. În plus la reacțiile adverse și rezistența medicamentoasă este factor care limitează terapia anticanceroasă.

Diverse studii epidemiologice au evidențiat reducerea incidenței cancerului în țările cu un consum bogat în plante și în antioxidanți, astfel că utilizarea antioxidanților ca și suplimente nutriționale poate să contribuie la prevenția cancerului. În prezent, statisticile arată că mai mult de 30% din pacienții cancerosi utilizează extractele de plante ca și terapie alternativă sau complementară în cancer.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Capitolul intitulat *Stadiul actual al cunoașterii* prezintă generalități privind stresul oxidativ în oncogeneză, cu accent asupra țintelor și efectelor patologice ale speciilor reactive de oxigen, precum și evoluția procesului inflamator spre boala canceroasă. Asociat au fost descrise și principalele mijloace terapeutice din oncologie. În ultimul capitol sunt prezentate principalele mecanisme prin care compușii din plante interacționează cu mecanismele care stau la baza procesul canceros.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Scopul și obiectivele studiului

Scopul studiului a fost evaluarea potențialului antitumoral al extractelor de *Mahonia aquifolium*.

Obiectivele studiului au fost:

- Analiza fitochimică a extractelor de *Mahonia aquifolium*
- Evaluarea efectelor antioxidante și anti-inflamatorii ale extractelor de *Mahonia aquifolium*
- Evaluarea potențialului imunomodulator al extractelor de *Mahonia aquifolium*
- Evaluarea toxicității și a efectelor antiproliferative ale extractelor de *Mahonia aquifolium*

- Evaluarea efectelor cardioprotectoare, hepatoprotectoare și nefroprotectoare ale extractelor de *Mahonia aquifolium*.

STUDIUL 1. Analiza fitochimică a extractelor de *Mahonia aquifolium*

Material și metodă. Șase polifenoli și patru alcaloizi au fost măsurați prin HPLC în extractele etanolice de *Mahonia aquifolium*, respectiv frunze (ML), flori (MF), fructe verzi (MGF), fructe coapte (MRF) și scoarță (MB).

Rezultate. Cel mai abundent polifenol a fost acidul clorogenic și alcaloizii au fost identificați doar în MB.

STUDIUL 2. Evaluarea efectelor antioxidante și anti-inflamatorii ale extractelor de *Mahonia aquifolium*

Material și metodă. Activitatea antioxidantă *in vitro* a fost măsurată prin testul DPPH. Activitatea antioxidantă și antiinflamatorie *in vivo* a extractelor etanolice de *Mahonia aquifolium*, a fost evaluate pe un model experimental de inflamație acută, indusă cu ulei de terebentină la șobolani. Activitatea antiinflamatorie a fost evaluată prin măsurarea oxidului nitric (NOx) și a factorului de necroză tumorală α (TNF- α), iar stresul oxidativ prin statusul oxidativ total (TOS), reactivitatea totală antioxidantă (TAR), indicele de stres oxidativ (ISO), 3-nitrotirozina (3NT), malondialdehida (MDA) și tiolii plasmatici totali (SH). Extractele au fost administrate oral (100%, 50%, 25%) timp de șapte zile înainte de inducerea inflamației acute. Efectele au fost comparate cu cele ale diclofenacului.

Rezultate. Activitatea antioxidantă *in vitro* a fost bună, exceptând MB. Toate extractele au redus NOx, TOS, 3NT și au crescut SH. TNF- α a fost redus și TAR a fost crescut doar de ML, MF, MGF. MDA nu a fost influențat. Studiul a demonstrat activitatea antiinflamatorie și antioxidantă a extractelor de *Mahonia aquifolium*.

STUDIUL 3. Evaluarea potențialului imunomodulator al extractelor de *Mahonia aquifolium*

Material și metodă. Studiul a evaluat potențialul modulator asupra sistemului imun, al extractelor de scoarță (1), frunze (2), flori (3), fructe verzi (4) și fructe coapte (5) de *Mahonia aquifolium*. Imunitatea înăscută constituie prima linie de apărare împotriva diverșilor agenți patogenici. Macrofagele și neutrofilele sunt celulele principale care contribuie semnificativ la răspunsul imun și dobândit fiind celule efortorii importante în îndepărtarea agenților patogeni⁶, în timp ce limfocitele constituie componenta umorală specifică a imunității. Extractele au fost testate pe celule mononucleare din sângele periferic.

Rezultate. Extractele 1-5 au avut un control moderat asupra răspunsului imun, prin modularea căii CD25 de activare limfocitară, calea de semnalizare mediată de interleukina-10 și factorul de necroză tumorală α (TNF- α) în patru subpopulații de celule sanguine

mononucleate din sângele periferic (PBMC), fără o anumită selectivitate față de nici unul din cele patru subseturi studiate.

STUDIUL 4. Evaluarea toxicității și a efectelor antiproliferative ale extractelor de *Mahonia aquifolium*

Material și metodă. Studiul a evaluat efectele extractelor etanolice de scoarță (1), frunze (2), flori (3), fructe verzi (4) și fructe coapte (5) de *Mahonia aquifolium* asupra a cinci linii celulare umane: carcinom de colon DLD-1 și HT-29, liniile celulare de adenocarcinom de ovar A2780, melanomul malign A375 și liniile celulare de fibroblaști de piele sănătoși. MTT a fost utilizat pentru a evalua citotoxicitatea.

Rezultate. Extractul 1 a avut cea mai mare citotoxicitate, iar 2 a exercitat citotoxicitatea de pe locul doi. Inducerea apoptozei extrinseci a fost evaluată prin măsurarea caspazei-8 inițiatorii, caspazei-3 efectorii și a TNF- α . Inițierea procesului apoptotic prin caspaza-8 s-a petrecut în toate liniile celulare tumorale pentru toate extractele 1-5. Caspaza-3 activată a crescut după expunerea la 1 în toate liniile celulare tumorale și 2 a indus și a crescut nivelele acesteia în celulele DLD-1 și A375. De asemenea, studiul a evaluat și modularea moleculelor de adeziune implicate în extravazarea moleculei-1 de adeziune intracelulară (ICAM-1) sau moleculei-1 de adeziune celulară vasculară (VCAM-1). Toate extractele au avut un efect inhibitor consecvent împotriva ICAM-1 și VCAM-1 secretate de fibroblaștii normali BJ, *in vitro*. Metaloproteinaza matriceală-9 (MMP-9) este în corelație cu invazia celulară și metastazarea, iar extractul 1 a fost capabil să inhibe MMP-9 în celulele de melanom A375.

STUDIUL 5. Evaluarea efectelor cardioprotectoare, hepatoprotectoare și nefroprotectoare ale extractelor de *Mahonia aquifolium*

Material și metodă. Ultimul studiu a evaluat efectele protectoare hepatice, cardiace și renale ale celor cinci extracte de *Mahonia aquifolium* în trei modele experimentale de infarct miocardic acut indus cu Izoprenalina, hepatită acută indusă cu CCl₄ și insuficiență renală acută secundară Gentamicinei. Evaluarea efectelor cardioprotectoare a fost efectuată prin creatinkinaza-MB (CK-MB), aspartat transaminaza (AST), alanin transaminaza (ALT) și explorarea electrocardiografică. Evaluarea efectelor hepatoprotectoare a fost efectuată prin AST, ALT și GammaGT (GGT). Evaluarea efectelor nefroprotectoare a fost efectuată prin determinare creatininei serice (Cr ser) și urinare (Cr Urin), ureei serice (Uree ser) și urinare (Uree urin), a diurezei și calcularea clearanceului creatininic. Studiul a urmărit și modificările histopatologice de la nivelul organelor vizate.

Rezultate. În infarctul miocardic acut indus experimental, extractele de *Mahonia aquifolium* au avut efect cardioprotector deoarece au redus enzimele marker de necroză cardiacă împreună cu parametrii de stres oxidativ, fără a influența semnificativ modificările electrocardiografice. MF a redus semnificativ ALAT, împreună cu MRF și MGF iar CKMB a fost mai eficient redusă de ML și MF. Extractele de *Mahonia aquifolium* au avut efect hepatoprotector deoarece au îmbunătățit valorile parametrilor insuficienței hepatice precum și parametrii de stres oxidativ. Toate extractele de *Mahonia aquifolium* au redus

semnificativ nivelele ALAT și ASAT în hepatita acută experimentală. Activitatea antioxidantă din hepatita toxică experimentală a fost explicată creșterea TAC, reducerea TOS, NO, MDA și creșterea SH. În insuficiența renală acută experimentală, extractele de *Mahonia aquifolium* au îmbunătățit parametrii insuficienței renale, stresului oxidativ, fără a modifica semnificativ valorile diurezei. Toate extractele au avut efect nefroprotector deoarece au redus nivelele de creatinină serică, creatinina urinară, ureea serică și ureea urinară. Extractele de MB, MGF și MRF au fost mai eficiente decât MF în reducerea ureei serice.

CONCLUZII GENERALE

1. Extractele etanolice din frunze, flori, fructe verzi, fructe coapte și scoarță de *Mahonia aquifolium* pot fi potențiali candidați în tratamentul patologiilor care au la baza stres oxidativ și procese inflamatorii.
2. Compușii polifenolici și alcaloizii identificați în cele cinci extracte de *Mahonia aquifolium* explică proprietățile antioxidante și antiinflamatorii ale acestora.
3. Cele mai eficiente extracte antioxidante și antiinflamatorii au fost ML și MRF.
4. Cele cinci extracte au un bun potențial în tratamentul cancerului.
5. Raportat la abilitatea extractelor de a stimula sistemul imun în apărarea anticanceră, extractul MB a fost cel mai eficient în creșterea nivelului celulelor CD4⁺ helper reglatorii, iar extractele ML, MGF și MRF au activat mai eficient celulele CD8⁺ efectoare, monocitele și celulele B.
6. Extractul MB deține capacitatea antiproliferativă cea mai mare pe liniile tumorale testate, dar toate extractele au modulată căile de semnalizare legate de adeziunea celulară, proliferarea și migrarea tumorală.
7. Administrarea extractelor de scoarță, frunze, flori, fructe verzi și fructe coapte de *Mahonia aquifolium* poate fi benefică în terapia antitumorală dar și în reducerea efectelor secundare asociate tratamentelor uzuale deoarece au proprietăți cardioprotectoare, hepatoprotectoare și nefroprotectoare.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

1. În cadrul studiului 1 în premieră a fost efectuată analiza fitochimică comparativă a cinci extracte de *M. aquifolium*.
2. În cadrul studiului 2 pentru prima dată au fost testate efectele antiinflamatoare și antioxidante ale celor cinci extracte de *M. aquifolium* pe model experimental de inflamație *in vivo*.
3. În cadrul studiului 3 s-a evaluat pentru prima oară în literatura de specialitate influența extractelor de *M. aquifolium* asupra răspunsului imun celular, iar rezultatele obținute deschid noi perspective în vederea testării ulterioare a extractului de scoarță din *M. aquifolium*.
4. Studiul 4 a evidențiat pentru prima oară efectele antitumorale ale extractelor de *M. aquifolium*, precum și potențialele mecanisme implicate în apărarea anticanceră.
5. Rezultatele obținute în studiul 5 recomandă utilizarea extractelor de *M. aquifolium* ca agenți adjuvanți terapiei antitumorale prin efectele cardioprotectoare, hepatoprotectoare și nefroprotectoare.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Evaluation of the antitumor potential of *Mahonia aquifolium* extracts

PhD Student **Andra-Diana Cecan (Andreicuț)**

PhD Supervisor Prof.dr. **Alexandru Irimie**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Oxidative stress in oncogenesis	19
1.1. Generalities	19
1.2. Nitric oxide	20
1.3. Reactive oxygen species – Targets and pathological effects	20
1.4. From inflammation to cancer. Tumor microenvironment	23
1.4.1. Transcription factors	25
1.4.1.1. P53	25
1.4.1.2. Erythroid nuclear factor-2	25
1.4.1.3. Mitogen activated protein kinases	26
1.4.1.4. Activator protein-1	26
1.4.1.5. Nuclear factor κ B	26
1.4.2. Metastasis	27
1.4.2.1. Hypoxia inducible factor -1 α	28
1.4.2.2. Vascular endothelial growth factor	28
1.4.2.3. Matrix metalloproteinase	28
2. Therapeutic principles in oncogenesis	31
2.1. Chemotherapy	31
2.2. Radiotherapy	31
2.3. Anticancer agents and molecular targets in cancer	31
2.4. Adverse reactions	33
2.5. Drug resistance	33
3. Phytotherapy in oncology	35
3.1. <i>Mahonia</i> species in phytotherapy	35
3.2. Phytochemical compounds from <i>Mahonia</i> species	36
3.2.1. Alkaloids	36

3.2.2. Polyphenols	38
3.3. Utilisation of natural extracts to reduce the side effects of other therapies	41
3.4. Molecular targets of phytochemical compounds in oncogenesis	41
PERSONAL CONTRIBUTION	43
1. Background/Objectives	45
2. Study 1 – Phytochemical analysis of <i>Mahonia aquifolium</i> extracts	47
2.1. Introduction	47
2.2. Materials and methods	47
2.2.1. Chemicals	47
2.2.2. Preparation of <i>Mahonia aquifolium</i> extracts	47
2.2.3. HPLC analysis of polyphenols and alkaloids	48
2.3. Results	49
2.4. Discussions	52
2.5. Conclusions	53
3. Study 2 – Evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory effects of <i>Mahonia aquifolium</i> extracts	55
3.1. Introduction	55
3.2. Materials and methods	56
3.2.1. Chemicals	56
3.2.2. <i>In vitro</i> antioxidant effects	56
3.2.3. Experimental inflammation	56
3.2.4. Evaluation of the anti-inflammatory effect	57
3.2.5. <i>In vivo</i> evaluation of the antioxidant effect	57
3.2.6. Statistic analysis	58
3.3. Results	59
3.3.1. <i>In vitro</i> antioxidant activity	59
3.3.2. <i>In vivo</i> anti-inflammatory and antioxidant effects	59
3.4. Discussion	62
3.5. Conclusions	65

4. Study 3- Effects of <i>Mahonia aquifolium</i> extracts on cellular immune response	67
4.1. Introduction	67
4.2. Material and methods	68
4.2.1. Chemicals	68
4.2.2. <i>In vitro</i> assessment of cellular immune modulation. Isolation of cell subsets from PBMC	68
4.2.3. Determination of cytotoxicity	69
4.2.4. Detection of IL-10 and CD-25 positive cells	70
4.2.5. Detection of tumor necrosis factor- α	70
4.3. Results	71
4.4. Discussions	81
4.5. Conclusions	81
5. Study 4- <i>Mahonia aquifolium</i> extracts alter intercellular communication and activate the caspase-dependent apoptotic pathway in tumor cells <i>in vitro</i>	83
5.1. Introduction	83
5.2. Material and methods	84
5.2.1. Chemicals	84
5.2.2. Preparation of <i>Mahonia aquifolium</i> extracts for biological testing	84
5.2.3. Cell cultures	84
5.2.4. Cytotoxicity testing	85
5.2.5. Immuno-enzymatic methods	86
5.2.6. Evaluation of protein content in samples	86
5.2.7. Intercellular adhesion molecule-1	87
5.2.8. Vascular adhesion molecule-1	87
5.2.9. Intracellular caspase-3	88
5.2.10. Intracellular caspase-8	88
5.2.11. Matrix metalloproteinase-9	89
5.3. Results	89
5.3.1. Cytotoxicity of 1-5 extracts of <i>Mahonia aquifolium</i>	89

5.3.2. Protein content of the samples subjected to treatment	92
5.3.3. Induction of extrinsic apoptosis	94
5.3.4. Modulation of adhesion molecules	95
5.3.5. The effects of 1-5 extracts on the matrix metalloproteinase-9	97
5.4. Discussions	97
5.5. Conclusions	101
6. Study 5- Evaluation of the cardioprotective, hepatoprotective and nephroprotective effects of <i>Mahonia aquifolium</i> extracts	103
6.1. Introduction	103
6.2. Material and methods	105
6.2.1. Chemicals	105
6.2.2. Groups of experimental animals	105
6.2.3. Evaluation of the antioxidant effects	105
6.2.4. Experimental acute myocardial infarction	105
6.2.4.1. Electrocardiographic exploration	106
6.2.5. Induction of liver failure	106
6.2.6. Evaluation of kidney failure	106
6.2.7. Histopathological examination	106
6.2.8. Statistic analysis	107
6.3. Results	107
6.3.1. Assessment of cardioprotective effects	107
6.3.1.1. Acute myocardial infarction parameters	107
6.3.1.2. <i>In vivo</i> antioxidant effects	109
6.3.1.3. Evaluation of electrocardiographic changes	112
6.3.1.4. Histopathological examination	114
6.3.2. Evaluation of hepatoprotective effects	117
6.3.2.1. Parameters of acute liver failure	117
6.3.2.2. <i>In vivo</i> antioxidant effects	120
6.3.2.3. Histopathological examination	123
6.3.3. Evaluation of nephroprotective effects	126

6.3.3.1. Parameters of acute kidney failure	126
6.3.3.2. <i>In vivo</i> antioxidant effects	130
6.3.3.3. Histopathological examination	133
6.4. Discussions	136
6.4.1. Cardioprotective effects	136
6.4.2. Hepatoprotective effects	137
6.4.3. Nephroprotective effects	138
6.5. Conclusions	140
7. General conclusions	141
8. Originality and innovative contributions of the thesis	143
REFERENCES	145

KEYWORDS

Cancer, oxidative stress, nitric oxide, inflammation, polyphenols, alkaloids, *Mahonia aquifolium*.

INTRODUCTION

Cancer is a hyperproliferative pathology where invasion and angiogenesis cause tumor metastasis. Tumors are said to be „non-healing wounds“. The link between cancer and inflammation was made for the first time in the XIX century, starting from the observation that tumors often develop at the site of chronic inflammation and the inflammatory cells were present in tumor biopsy samples. Currently, inflammation is seen as a „key marker“ of cancer with undeniable evidence which associates chronic inflammation as a major risk factor for many cancers.

The plants are rich in biomolecules, vitamins and minerals that are crucial to maintaining the health of the body, demonstrating promising antitumor effects *in vitro* and *in vivo*. These effects are mainly due to the content of flavonoids that have important antioxidants activities. The genus *Mahonia* includes a number of species, including *Mahonia aquifolium* (*M. aquifolium*), which has long been used in traditional medicine for various skin pathologies. Berberine, the major alkaloid in *Mahonia*, is used in Asian medicine as a medicine due to its antimicrobial potential.

Initial stages of cancer require either excision, or resection, or chemotherapy and sometimes radiotherapy. The latter are often accompanied by a large number of side effects. Cancer treatment targets each of the steps in neoplastic development, including anti-initiation strategies as well as tumor antiproliferation strategies. In addition to adverse reactions and drug resistance, it is a factor limiting the anticancer therapy.

Various epidemiological studies have highlighted the reduction of incidence of cancer in countries with high plant-based consumption and antioxidants, so using antioxidants as nutritional supplements can help plant extracts as alternative or complementary therapy in cancer.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The chapter titled *The current state of knowledge* presents generalities regarding the involvement of oxidative stress in oncogenesis with an emphasis on the targets and pathological effects of reactive oxygen species as well as the evolution of the inflammatory process towards cancerous disease. The main therapeutic techniques in oncology are described and the last chapter presents the main mechanisms by which the plants compounds interact with the mechanisms underlying the cancerous process.

PERSONAL CONTRIBUTION

Purpose and aims of the study

The purpose of the study was to evaluate the antitumoral effects of *Mahonia aquifolium* extracts.

The aims of the study were:

- Phytochemical analysis of *Mahonia aquifolium* extracts
- Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory effects of *Mahonia aquifolium* extracts
- Evaluation of immunomodulatory potential of *Mahonia aquifolium* extracts
- Evaluation of toxicity and antiproliferative effects of *Mahonia aquifolium* extracts
- Evaluation of cardioprotective, hepatoprotective and nephroprotective effects of *Mahonia aquifolium* extracts.

STUDY 1. Phytochemical analysis of *Mahonia aquifolium* extracts

Materials and methods. Six polyphenols and four alkaloids were measured by HPLC in *Mahonia aquifolium* ethanolic extracts, namely leaves (ML), flowers (MF), green fruits (MGF), ripe fruits (MRF) and bark (MB).

Results. The most abundant polyphenol was chlorogenic acid and the alkaloids were identified only in MB.

STUDY 2. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory effects of *Mahonia aquifolium* extracts

Materials and methods. The antioxidant activity was measured *in vitro* by DPPH assay.

The antioxidant and anti-inflammatory activity of *Mahonia aquifolium* ethanolic extracts was evaluated *in vivo* in an experimental model of acute inflammation induced by turpentine oil in rats. The anti-inflammatory activity was assessed by measuring nitric oxide (NO_x) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and oxidative stress index (ISO), 3-nitrotyrosine (3NT), malondialdehyde (MDA) and total plasma thiols (SH). The extracts were administered orally (100%, 50%, 25%) for seven days prior to induction of acute inflammation. The effects were compared with those of diclofenac.

Results. DPPH results were good except MB. All extracts reduced NO_x, TOS, 3NT and increased SH. TNF- α was reduced and TAR was increased only by ML, MF, MGF. MDA has not been influenced. The study identified the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Mahonia aquifolium* extracts.

STUDY 3. Evaluation of immunomodulatory potential of *Mahonia aquifolium* extracts

Materials and methods. The study evaluated the modulatory potential of the immune system of the bark (1), leaves (2), flowers (3), green fruits (4) and ripe fruits (5) extracts of *Mahonia aquifolium*. Inborn immunity is the first line of defense against various pathogens. Macrophages and neutrophils are the major cells that contribute significantly to the immune response and are the cells that are important effectors in the removal of pathogens⁶, while lymphocytes are the specific humoral component of immunity. The extracts were tested on peripheral blood mononuclear cells.

Results. Extracts **1-5** caused a moderate immune response control by modulating the lymphocyte activation CD25 pathway, the interleukin-10 mediated signaling pathway and the tumor necrosis factor- α (TNF- α) in four sub-populations of peripheral blood mononuclear blood cells (PBMC), without any selectivity to any of the four studied subsets.

STUDY 4. Evaluation of toxicity and antiproliferative effects of *Mahonia aquifolium* extracts

Materials and methods. The study evaluated the effects of *Mahonia aquifolium* ethanolic bark (1), leaves (2), flowers (3), green fruits (4) and ripe fruits (5) extracts on five human cell lines: DLD-1 and HT-29 colon carcinoma, A2780 ovary adenocarcinoma cell lines, A375 malignant melanoma, and healthy skin fibroblast cell lines. MTT was used to evaluate cytotoxicity.

Results. Extract **1** had the highest cytotoxicity, and **2** exercised the second place cytotoxicity. Induction of extrinsic apoptosis was evaluated by measuring caspase-8 initiator, caspase-3 effector and TNF- α . The initiation of the apoptotic process by caspase-8 occurred in all tumor cell lines for all of the **1-5** extracts. Activated caspase-3 increased after exposure to **1** in all tumor cell lines and **2** induced and increased its levels in DLD-1 and A375 cells. The study also evaluated the modulation of adhesion molecules involved in the extravasation of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) or vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). All extracts had a consistent inhibitory effect against ICAM-1 and VCAM-1 secreted by normal BJ fibroblasts *in vitro*. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is correlated with cell invasion and metastasis, and extract 1 was able to inhibit MMP-9 in melanoma A375 cells.

STUDY 5. Evaluation of cardioprotective, hepatoprotective and nephroprotective effects of *Mahonia aquifolium* extracts

Materials and methods. The last study evaluated the hepatic, cardiac and renal protective effects of the five *Mahonia aquifolium* extracts in three experimental models of isoprenaline induced acute myocardial infarction, acute CCl₄ induced acute hepatitis and acute secondary renal failure of Gentamicine. The evaluation of cardioprotective effects was performed by creatinase-MB (CK-MB), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), and electrocardiographic exploration. Evaluation of hepatoprotective effects was performed by AST, ALT and GammaGT (GGT). Evaluation of nephroprotective effects was performed by serum creatinine (Cr ser) and urine (Cr urin), serum urea (Uree ser) and urine (Uree urin), diuresis, and creatinine clearance. The study also followed histopathological changes from the target organs.

Results. In experimental induced acute myocardial infarction *Mahonia aquifolium* extracts had cardioprotective effect by improving cardiac necrosis marker enzymes along with oxidative stress parameters without significantly affecting electrocardiographic changes. MF significantly reduced ALT, along with MRF and MGF, and CKMB was more effectively reduced by ML and MF. *Mahonia aquifolium* extracts had hepatoprotective effect

by improving liver failure parameters as well as oxidative stress parameters. All *Mahonia aquifolium* extracts significantly reduced the levels of ALAT and ASAT in acute experimental hepatitis. In toxic experimental hepatitis, the antioxidant activity has been explained through enhancement of TAC and SH, and reduction of TOS, NO and MDA. In acute renal failure *Mahonia aquifolium* extracts had nephroprotective effect by improving the parameters of renal failure and oxidative stress, without significantly altering the diuresis values. All extracts have reduced the levels of serum creatinine, urinary creatinine, serum urea and urine. Extracts of MB, MGF and MRF were more effective than MF in reducing serum urea.

GENERAL CONCLUSIONS

1. Ethanolic extracts of *Mahonia aquifolium* may be potential candidates in the treatment of pathologies which origin from oxidative stress and inflammatory processes.
2. The polyphenolic compounds and alkaloids identified in the five *Mahonia aquifolium* extracts explain their antioxidants and anti-inflammatory ability.
3. The most effective antioxidant and anti-inflammatory extracts were ML and MRF.
4. The five extracts have a good potential in the treatment of cancer.
5. Regarding the ability of the extracts to stimulate the immune system in anticancer protection, MB extract was the most effective in increasing the level of CD4+ helper regulatory cells and ML, MGF and MRF extracts enhanced effector CD8+ cells, monocytes and B cells.
6. The MB extract has the highest antiproliferative capacity on the tumor lines tested, but all extracts have modulated signaling pathways related to cell adhesion, proliferation and tumor migration.
7. The administration of bark extracts, leaves, flowers, green fruits and ripe fruits of *Mahonia aquifolium* may be beneficial in anti-tumor therapy, but also in the reduction of side-effects associated with common treatments.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

1. In the first study, comparative phytochemical analysis of five extracts of *M. aquifolium* was performed.
2. In Study 2 for the first time, the anti-inflammatory and antioxidant effects of the five *M. aquifolium* extracts were tested on experimental model of *in vivo* inflammation.
3. In study 3, the influence of *M. aquifolium* extracts on cellular immune response was evaluated for the first time and the results obtained open new perspectives for further testing of *M. aquifolium* bark extract.
4. Study 4 revealed for the first time the antitumoral effects of *M. aquifolium* extracts as well as the potential mechanisms involved in anticancer protection.
5. The results obtained in study 5 recommend the use of *M. aquifolium* extracts as adjunctive agents to anti-tumor therapy by cardioprotective, hepatoprotectoid and nephroprotective effects.