
DOCTORAL THESIS (SUMMARY)

Natural pro-apoptotic agents from *Securidaca longipedunculata*

PhD Candidate **Titus Chukwuemeka Obasi**

PhD Project Supervisor Prof.dr. **Radu Oprean**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINA ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Chapter 1: Natural Pro-apoptotic agents

- 1.1. Background
 - 1.1.1. Importance of apoptosis and implications in cancer
- 1.2. The mechanism of apoptosis, features and general overview
 - 1.2.1 The general mechanisms and overview
 - 1.2.1.1 Extrinsic apoptosis
 - 1.2.1.2 Intrinsic apoptosis
 - 1.2.1.3 Apoptotic mechanisms in varying cell types
 - 1.2.2 Biochemical and morphological features of apoptosis
 - 1.2.2.1. Morphological features
 - 1.2.2.2. Biochemical features
 - 1.2.2.3. The four stages of apoptosis
 - 1.2.3 Apoptosis and the immune cells involvement
 - 1.2.3.1. Immunogenic apoptosis cell death (ICD)
 - 1.2.3.2. Cytokine and NK Cell induced apoptosis
 - 1.2.3.3. Phagocytes efferocytosis (eat me signals)
 - 1.2.4 Apoptosis and other types of cell deaths
- 1.3 The Pro-apoptotic signaling
 - 1.3.1 Role of Caspases
 - 1.3.1.1 Physiologic role of caspases as apoptotic initiator and executioner of apoptosis
 - 1.3.2 Apoptotic signaling and the Bcl-2 family members
 - 1.3.2.1 Pro-apoptotic BCL-2 members
 - 1.3.2.2 The key anti-apoptotic BCL-2 family members and their roles
 - 1.3.3 The mitochondria proteins
 - 1.3.3.1. Survival proteins
 - 1.3.3.2. The mitochondria inter- space proteins
- 1.4 Conclusion

Chapter 2: Methods of Phytochemical Extraction, Characterization and Biological Screening for Apoptosis

- 2.1 Introduction
 - 2.1.1. The role of phytochemicals and plant-derived substance in drug discovery
- 2.2 General principle for isolation of bioactive compounds
 - 2.2.1 Methods of extraction and purification of natural bioactive constituents
- 2.3 Screening and characterization of natural bioactive compounds
- 2.4 Bioassay and screening for antitumor activity
 - 2.4.1 Cell-based screening and evaluation
 - 2.4.1.1 Cell Viability and Antiproliferative Assays (MTT / MTS)
 - 2.4.2 Bioanalytical screenig and detections of apoptosis.
 - 2.4.2.1 Cytomorphological modifications
 - 2.4.2.2 Membrane changes and alterations (the externalization of phosphatidylserine)
 - 2.4.2.3 DNA fragmentation

2.4.2.4 The release of caspases

2.4.2.5 Mitochondrial changes

PERSONAL CONTRIBUTION

Hypotheses and objectives

Chapter 3: *Securidaca*-saponins are natural inhibitors of AKT, MCL-1, and BCL2L1 in cervical cancer cells.

- 3.1. Introduction
- 3.2. Hypothesis/objectives
- 3.3. Material and method
- 3.4. Results
- 3.5. Discussions
- 3.6. Conclusions

Chapter 4: Molecular-trapping in emulsion's monolayer: A new strategy for production and purification of bioactive Saponins

- 4.1. Introduction
- 4.2. Hypothesis /objectives
- 4.3. Material and method
- 4.4. Results
- 4.5. Discussions
- 4.6. Conclusions

Chapter 5: Free radical activity and total polyphenol content of *Securidaca longipedunculata*

- 5.1. Introduction
- 5.2. Objectives
- 5.3. Material and method
- 5.4. Results
- 5.5. Discussions
- 5.6. Conclusion

6 General Discussion

7. General conclusions

8. Originality and innovative contributions of the thesis

REFERENCES

ANNEXES

Annex A

Supplementary data: *Securidaca*-saponins are natural inhibitors of AKT, MCL-1 and BCL2L1 in cervical cancer cell lines

Annex B

Studies relating to fractionation, isolation and further characterization of *Securidaca* antitumor active constituents, using HPLC, MS and Raman Spectroscopy.

Annex C

Abstract presented at the annual meeting of the American Association for Cancer Research; 2018 Apr 14-18; Chicago, IL, USA.

Keywords: Pro-apoptotic agents, PI3K-AKT dependent apoptosis, natural inhibitors (AKT-3, MCL-1 and BCL2L1), activity-guided extraction and selective precipitation.

Current state of knowledge

Scientific evidences have proven that apoptosis can be selectively activated by natural constituents of terrestrial plants, aquatic and microbial flora. While some natural compounds act as inhibitor, others act as promoters, mimetic and activators of apoptosis, displaying their activity through signaling and activation of important genes and proteins. In the context of this thesis, a natural pro-apoptotic agent can be collectively represented as wide range of naturally occurring chemical constituents, whose mode of actions are specifically mediated via type 1 programmed cell death (PCD) mechanism, commonly referred to as apoptosis. The term apoptosis was coined by Kerr and co-workers in 1972, to describe the genetically conserved suicidal death of cells and its distinct morphology, which over the years has become a very crucial terminology in the field of science.

Totally devoid of pro-inflammatory reactions, apoptosis is deemed an enticing molecular tool for treatment of cancer, on which the primary goal is to kill and remove the aberrant (malignant and diseased) cells from the tissue sites, without causing severe injury or toxicity. The mechanism is usually marked with silence execution of unwanted cells and clean-up of its debris around the neighboring corners, with the help of phagocytes, whose distinct role discriminates between living and dead cells. Though playing a very significant role in the normal physiology of multicellular organisms, apoptosis occur in stages, which are characterized by the induction of extrinsic and intrinsic pathways, and activation of signaling cascades, championed by caspases. The caspases are family of cysteine proteolytic enzyme whose role is enmeshed in demolition, disassembly and dismantling of the key structural proteins in cells destined to die. Therefore, the central character for proper definition of apoptosis, must include: the activation of caspases; condensation of chromatin (Pyknosis) and breaking of chromosomes into multiple nucleosomes (Karyoherrsis); fragmentation and formation of membrane bound apoptotic bodies, which are systematically engulfed by the specialized immune cells.

Over the years, numerous promising natural agents have been identified, having specific pro-apoptotic properties and potentials to translate into new drugs or approaches for cancer treatment and clinical intervention. At present, more than 64% of clinically approved drugs, have roots to natural origin, being directly or indirectly informed by the scaffold of novel chemical structures and pharmacophores. Amongst these sets, about 60-80% according to Newman and Cragg, constitute the antibacterial and anticancer agents. Researches have shown that these substances could be systematically isolated from the natural biomass, using activity-guided extraction and chromatography. In the recent time, several new applications are coming up for purpose of extraction, separation and purification of natural substances. The use of spectrometry (e.g. UV-vis, Raman, IR, NMR and mass spectroscopies, etc.) has become the order of the day for identification and characterization of active constituents. On the other hand, modern molecular biological tools and *in vitro* cell-based assays, are equally essential especially for bioactivity testing and screenings.

For purposes of investigating apoptosis, biological assays are skillfully designed and modelled against distinct biochemical and morphological changes, occurring during apoptotic events, as depicted in 4 stages of PCD type 1 cell deaths. Typically, these include: cytomorphological changes, membrane externalization of phosphatidylserine, DNA fragmentation, the release of caspases, mitochondrial activity, protein and enzymes expressions, etc.

Adequate skills in cell culture is also a necessity for viability testing, detection and quantification of apoptosis. Different dye staining techniques have been recommended, e.g. Annexin V (FITC-labelled), Propidium iodide, DAPI, etc., for detecting apoptotic cells from the early to late developmental stages, while several literatures support the use of PARP, TUNEL and other specific suitable tests, for detecting the end-stage apoptosis. Several confirmatory tests include those performed by electron microscopy (TEM and SEM), while relevant genes, enzymes and protein assays can be assayed, estimated or quantified using immunochemistry, immunoblotting (western blot), Elisa, fluorescence microscopy, flow cytometry and RT-qPCR, etc.

Hypotheses / Objectives

Literatures in ethno-medicine and ethno-pharmacology have shown that *S. longipedunculata*, exhibit pro-inflammatory activities, supporting the motives for its traditional uses and application in African traditional medicine in the treatment of skin inflammations, cancer and related diseases. Choosing a target-based reverse pharmacological approach, our specific aim and research objectives include: to screen, identify, isolate and evaluate the pro-apoptotic anticancer principles occurring in the root extract of this plant. It was also imperative, to determine and characterize the active constituent, whose mode of actions is directly or indirectly responsible for the signaling and activation of apoptosis. Finally, to investigate the method for selective extraction and preferential precipitation of these active pro-apoptotic constituents from the raw materials.

To realizing these goals, a cell-based assay and molecular biology tools are critically indicated, while the expected outcome is measured by the following parameters: 1) ability to inhibit growth and proliferation on selected tumor cell lines; 2) ability to activate apoptosis as a result of treatment; 3) and (or) ability to influence changes on the expressions of the key pro- or anti-apoptotic regulatory genes and proteins. Here, a cervical cancer cell line was selected as suitable biological model, being a squamous-epithelial cell carcinoma (SCC) just like skin cancers. This model was chosen in an attempt to replicate the closest practices employed by the African traditional healers, for the treatment of skin cancer as acclaimed with securidaca.

As a matter of fact, some cervical carcinomas contains “hpv E6 molecule (the chief oncogene) on whose presence causes the over-activity and excessive expression of “pro-survival proteins” as well as the MiR21. In most cervical cancers cases, the MiR21 is highly overexpressed, while the PTEN tumor suppressor gene on the other hand is usually compromised. Secondly, it is also evident that E6 ocoprotein promotes the degradation of p53 tumor suppressor through the binding interaction with E6AP, and despite this, the overexpression of EGFR is highly encouraged by E6 via the YAP/ Hippo pathway.

Based on these “rationale”, we therefore hypothesize that: Apoptosis could be activated in cervical cancer cells by overcoming the “hpv E6 induced” overexpression of pro-survival anti-apoptotic proteins, using chemical screens (inhibitors) from *S. longipedunculata* chemical library. Such treatment can hopefully bring about the restoration of PTEN tumor suppressor and its regulatory controls, especially at the PI3K-AKT check point, thereby promoting apoptosis. For non E6 related cases, mechanisms such as Ras-ERK (MAPK) could also be a contributory factor according to many literatures, considering their activity on pro-survival pathway, and having link with the enzyme (sphingosine kinase), whose role is to churns out strong antiapoptotic metabolite called sphingosine -1-phosphate (S1-P).

Study 1 - Securidaca-saponins are natural inhibitors of AKT, MCL-1 and BCL2L1 in cervical cancer cells

A bioactivity-guided extraction was performed, targeting the chemical constituents of *Securidaca longipedunculata* whose actions mediate apoptosis and type-1 programmed cell death (PCD) on malignant tumor cells. Activities were monitored and evaluated *in vitro* by cell-based assays using cervical cancer cell lines (Caski, and Bu25TK), as well as HeLa and normal HFL-1. The major objectives include: to identify, isolate, purify and characterize the anticancer constituents. Several methodologies were employed, e.g., chromatography (preparative TLC ((RP-C18, F254as), HPLC, Flash and Semi-preparative chromatography); Cell culture, MTT, SRB, 96 well-plates, apoptotic assays (DAPI fluorescent microscopy, Annexin Vitexin PI staining), cell migration/wound healing assay, RT-qPCR gene analysis and confirmatory quantitative assays (immuno-staining and Elisa) for BCL-2 and VEGF protein. Also applied mass spectrometry (HR-QToF-ESI/MS), UV-Vis and Raman spectroscopy, as well as TLC-post derivatization to characterize the active substances. Results show that two TLC fractions (4A3 and 4A4) exhibited an outstanding IC50 of (0.02502 and 0.04833) ug/mL respectively on Caski cell line 48h post-treatments (MTT).

Data revealing that 4A4 has selectivity index (SI) of 58 folds more cytotoxic on diseased (tumoral) Caski cell lines than normal (healthy) HFL-1 cells. Also having significant reduction in cell migration within 48 and 72 hours on Caski and Bu25TK cell lines, giving an early apoptosis with Annexin V, PI staining. The RT-qPCR data revealed a fold change (FC) inhibition of anti-apoptotic proteins (MCL-1 and BCL2L1), with diminished level of AKT-3, VEGFA, while significant changes detected on CDH-1, MALAT1 and GAP5, etc. The separation of 4A4 by Flash chromatography produced 24 fractions, 3 out of which (FR-15, FR-16 and FR-17) maintained strong cytotoxicity on Hela cell line using SRB assay. Further separation of FR-15 by Prep-HPLC, yielded two prominent sub-fractions [FR-15(no.6) and FR-15(no.7)] among others. These two partially purified substances produced notable fragments (stable ions) of [455 and 425] m/z respectively on MS/MS spectrum (negative mode), confirming the presence of triterpenoid aglycone earlier detected by TLC.

Raman spectroscopy of 4A4 and sub-fractions i.e. FR-15(no.6 and no.7) revealed an Oligosaccharide C-OC absorption mode at 1162 cm⁻¹ and C=O carbonyl/ester 1704cm⁻¹, CH₂ and CH₃ lipid bonds (1442 and 1462) cm⁻¹ among others, indicating the presence of natural glycosides. Conclusion: Data revealed the presence of pro-apoptotic principles, whose activity is mediated via PI3K-AKT dependent pathway.

Study 2 - Molecular-trapping in Emulsion's Monolayer: A New Strategy for Production and Purification of Bioactive Saponins.

The study deals with novel methodology for selective extraction/enrichment purification / preferential precipitation of target (desired) natural products, using emulsion-based technology. This invention utilizes the emulsion monolayer thin-film as tool (or reservoir) for selective adsorption and precipitation of desired compounds from their natural extracts. The principle is purely based on reverse-engineering theory of emulsion and supra-molecular chemistry (molecular self-assembly and phase separation).

Here the natural saponins constituents of *Securidaca longipedunculata* were systematically isolated from crude extract, by entrapping their molecules in emulsion monolayer thin-film, leading to their final recovery in pure and original forms, through phase separation. First, their rich extracts were dispersed in water to generate the monomolecular emulsion film architecture, via self-assembly. Emulsifying with ethyl-ether resulted in swollen micelles and engendered phase-inversion and phase separation, due to unbalanced thermodynamic equilibrium. As positive outcome, a Winsor II system was obtained, having saponin-rich upper phase (ethyl-ether) and impurities rich lower phase (aqueous). Further, the saponin particles in the monolayer, underwent a transition in an insoluble solvent ethyl-ether, precipitated and were recovered as solids.

The entire process was monitored by cell-based antiproliferative bioassay, using cervical cancer cell line (Caski) as biological model. The experiment was validated using a pooled fractions of securidaca saponins, purified by TLC (RP-C18, F254S). Electron micrograph (TEM and SEM) revealed interesting morphologies and particle sizes between nanometer and micron, while the SEM/EDS spectrum of energy-dispersive X-ray microanalysis show a dominant distribution of elemental carbon and oxygen. At the end, was achieved a homogenous chemical product of purity output (over 90% of saponins), at total recovery rate of 94%. Here we have shown that our novel emulsion-based separation method ("molecular-trapping in emulsion's monolayer") is an effective method for recovery, production and purification of natural saponin glycosides from the rich natural biomass and renewable sources.

From our preliminary results, the concept is deemed very attractive for enhanced production of natural glycoconjugates and for purification of natural surfactant mixtures. Also for fractionation and clean-up of extracts used in bio analytical studies and metabolomics e.g. lipidomics, proteomics and chemotaxonomic research, etc.

Study 3 – Free Radical Scavenging Activity and Total Polyphenol Content of *Securidaca Longipedunculata* Root and Leaves Extracts

Considering the role of antioxidants in the activation of apoptosis and mopping up of dangerous reactive oxygen species, the study-3, extensively dealt with polyphenolic and antioxidant contents of natural extracts obtained from *S. longipedunculata* roots and leaves, using different organic solvent media: ethanol (E), petroleum ether (PE), ethyl acetate (EtOAc), and water (W). Flavonoids and polyphenols were analyzed by chromatographic method, spectrophotometric and mass spectrometry. Evaluation of antioxidant activity was performed by several *in vitro* methods (DPPH bleaching, FRAP, nitrite-induced auto-oxidation of haemoglobin, and inhibition of lipid peroxidation catalyzed by cytochrome C).

Our results revealed that the leaves were abundant in phenolic principles than the roots, while ethyl acetate exhibited the highest yield of polyphenols, as well as the antioxidant potential. Flavonoid and polyphenol profile show higher distributions in the leaves, while identified for the first time in the leaves, the following compounds: hyperoside, isoquercitrin, rutin, *p*-coumaric acid.

General Conclusion

The outcome of this PhD thesis, comprised two major breakthroughs and several innovative contributions to the field of science. We reported for the first time that *S. longipedunculata* contains certain inhibitors (pro-apoptotic agents), whose mode of actions are significantly dependent on PI3K-AKT pathway for signaling and activation of apoptosis. These could be potentially attractive for natural anticancer development of therapeutic agents of high clinical relevance. On the other hand, the second breakthrough pertains to new invention, devised for selective extraction, separation and “enrichment purification” of homogenous natural bioactive substances such as glycosides, proteins and glycoconjugates, from the natural biomass and renewable sources. This strategy however, could be harnessed, optimized and adapted for large-scaled industrial liquid-liquid downstream processing and production of important raw materials, such as active pharmaceutical ingredients (API), excipients, nutraceuticals and vaccine adjuvants etc., from the nature’s renewable sources. Other possible areas of application include: drug discovery, metabolomics and bio-analytical research, for fractionation, separation and clean-up of natural extracts, from plants, cell lysis, exudates and fermentation broths, etc.

The experimental approaches and designs are quite unique, introducing a new methodology for targeted recovery and purification of bioactive complexes from the natural biomass, based on existing principles of supra-molecular chemistry (molecular self-assembly) and “reverse-engineering theory of emulsion”. Despite this, the new scientific terminology introduced by this PhD thesis – “molecular trapping in emulsion monolayer” is the first of its kind in the field of separation science, providing new window for the next generation separation and molecular scientists. Our future interest therefore, is to develop a novel monolayer tool, for harnessing the bioactive natural ingredients from plants and microbial flora, for purpose of healthcare and human consumptions. Also to continue in the pursuit of realizing these natural inhibitors from *S. longipedunculata*, as potential candidate for pro-apoptotic anticancer drug development.

This PhD thesis was supported by: 1) Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy (UMF Cluj-Napoca), through internal grants (5200/ 70 /01.03.2017 and 7690/81/15.04.2016); 2). The European Union (EU) – through Erasmus+ mobility; and 3). Martin-Luther University of Halle-Wittenberg, Germany, under the DAAD-Program (STIBET-Doctorandenforderung). Lastly, I would like to use this medium to thank the Romanian government for the “award of scholar of Romanian state” 112457/CMJ/16.09.2014 (Ministry of foreign affairs no. A10/1924/1914). A scholarship awarded for the regular full term of my PhD program.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Agenți pro-apoptotici naturali din Securidaca longipedunculata

Doctorand **Titus Chukwuemeka Obasi**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Radu Oprean**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL CURENT AL CUNOȘTIINȚELOR

1. Agenți pro-apoptotici naturali

1.3. Introducere

1.1.1. Importanța apoptozei și implicațiile în cancer

1.4. The mechanism of apoptosis, features and general overview

1.2.1 Mecanismul apoptozei, caracteristici și prezentare generală

1.3.2.1 Apoptoza extrinsecă

1.3.2.2 Apoptoza intrinsecă

1.3.2.3 Mecanisme apoptotice în variante tipuri de celule

1.3.3 Caracteristici biochimice și morfologice ale apoptozei

1.2.2.4. Trăsături morfologice

1.2.2.5. Trăsături biochimice

1.2.2.6. Cele patru etape ale apoptozei

1.3.4 Apoptoza și implicarea celulelor imune

1.2.3.4. Apoptoza imunogenă

1.2.3.5. Apoptoza indusă de citokine și celule NK

1.2.3.6. "Efferocytosis" semnalizare în apoptoză

1.3.5 Apoptoza și alte tipuri de decese celulare

1.4 Semnalizarea proapoptotica

1.4.1 Rolul caspazelor

1.3.1.1 Rolul fiziologic al caspazelor ca inițiator și executant al apoptozei

1.4.2 Semnalizarea apoptotică și membrii familiei Bcl-2

1.3.2 Pro-apoptotic BCL-2 membri

1.3.2.2 Principalii membri ai familiei BCL-2 antiapoptotic și rolurile lor

1.3.4 Proteinele mitocondriale

1.3.3.3. Proteine de supraviețuire

1.3.3.4. Proteinele inter spațiale ale mitocondriilor

1.4 Concluzie

2. Metode de extracție fitochimică, caracterizare și screening biologic pentru apoptoză

2.2 Introducere

2.1.2. Rolul substanțelor fitochimice și substanțelor derivate din plante în descoperirea medicamentelor

2.2 Principiul general pentru izolarea compușilor bioactivi

2.2.2 Metode de extracție și purificare a constituenților bioactivi naturali

2.3 Screening și caracterizarea compușilor bioactivi naturali

2.4 Bio-test și screening pentru activitatea antitumorală

2.4.1 Screening și evaluare bazate pe celule

2.4.1.2 Viabilitatea celulară și analizele antiproliferative (MTT / MTS)

2.4.2 Screening bioanalitic și detectarea apoptozei.

2.4.2.2 Modificări citomorfologice

2.4.2.2 Modificări ale membranei (externalizarea fosfatidilserinei)

2.4.2.3 DNA fragmentation

2.4.2.4 Fragmentarea ADN-ului

CONTRIBUȚII PERSONALE

Ipoteze și obiective

3. Securidaca - saponinele sunt inhibitori naturali ai AKT, MCL-1 și BCL2L1 în celulele canceroase ale colului uterin.

- 3.1. Introducere
- 3.2. Obiective
- 3.3. Materiale si metode
- 3.4. Resultate
- 3.5. Discuții
- 3.6. Concluzie

4. Studiul 2 – Captarea Moleculară în Monostratul Emulsiei: O Nouă Strategie pentru Producția și Purificarea Saponinelor Bioactive

- 4.1. Introducere
- 4.2. Obiective
- 4.3. Materiale si metode
- 4.4. Resultate
- 4.5. Discuții
- 4.6. Concluzie

5. Studiul 3 – ACTIVITATEA DE PURJARE A RADICALILOR LIBERI ȘI CONȚINUTUL TOTAL DE POLIFENOL AL EXTRACTELOR DE RĂDĂCINI ȘI FRUNZE DE SECURIDACA LONGIPEDUNCULATA

- 5.1. Introducere
- 5.2. Obiective
- 5.3. Materiale si metode
- 5.4. Resultate
- 5.5. Discuții
- 5.6. Concluzie

6. Discutii generale

7. Concluzii generale

8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

REFERINȚE

ANNEXE

Anexă A

Date suplimentare: Securidaca Saponinele sunt inhibitori naturali ai AKT, MCL-1 și BCL2L1 în liniile celulare de cancer de col uterin

Anexă B

Fracționarea, izolarea și caracterizarea suplimentară a constituenților activi antitumorali ai securidaca, folosind Spectroscopie HPLC, MS și Raman.

Anexă C

Rezumat prezentat la conferința anuală a Asociației Americane pentru Cercetarea Cancerului; 2018 14-18 aprilie; Chicago, IL.

Cuvinte cheie: agenți proapoptotici, extracție ghidată de activitate și precipitații selective, apoptoza dependentă de PI3K-AKT, inhibitori naturali ai AKT-3, MCL-1 și BCL2L1.

Stadiul curent al cunoștințelor

Dovezi științifice au dovedit că apoptoza poate fi selectiv activată de componente naturale ale plantelor terestre, acvatică sau ale florei microbiene. În timp ce unii compuși naturali acționează ca inhibitor, alții acționează ca mimetici, promotori și activatori ai apoptozei, etalându-și activitatea prin semnalarea și activarea unor importante gene și proteine. În contextul acestei cercetări, un agent pro-apoptotic natural poate fi reprezentat în mod colectiv de o gamă largă de componente chimice care apar natural și a căror mod de acțiune este specific mediat via mecanismul de moarte celulară programată de tip 1 (PCD) menționat în mod obișnuit ca apoptoză. Termenul apoptoză a fost inventat de Kerr și colaboratorii în 1972, pentru a descrie moartea suicidală a celulelor, conservată genetic și distinctă sa morfologie care, de-a lungul anilor, a devenit o terminologie extrem de importantă în domeniul științei.

Lipsită total de reacții pro-inflamatorii, apoptoza este considerată un ispititor instrument molecular pentru tratamentul cancerului asupra căruia obiectivul primar este îndepărtarea celulelor anormale și maligne de pe locațiile țesutului fără a cauza deteriorări severe sau toxicitate. Mecanismul este de obicei marcat de o execuție tăcută a celulelor nedorite și curățarea resturilor de jur împrejur cu ajutorul fagocitelor al căror rol distinct este de a face deosebirea dintre celulele vii și celulele pe moarte. Chiar dacă joacă un rol extrem de semnificativ în fiziologia mecanismelor multicelulare, apoptozele apar în stadii și sunt caracterizate în principal prin inducerea de căi extrinsece și intrinsece și activarea de cascade de semnalizare susținute de caspaze. Caspazele sunt o familie de enzime proteolitice ale cisteinei al cărei rol este încâlcit cu demolarea, dezasamblarea și demontarea proteinelor structurale cheie în celulele destinate să moară. Așadar, personajul principal pentru definirea apoptozei trebuie să includă: activarea caspazelor; condensarea cromatinei și spargerea cromozomilor în multipli nucleozomi (scara ADN); fragmentarea și formarea de corpi apoptotici legați de membrană care sunt sistematic înghițiți de celulele imune specializate.

De-a lungul anilor, numeroși agenți naturali promițători au fost identificați cu activități pro-apoptotice specifice, ceea ce destul de des se traduce în noi abordări pentru tratamentul și intervenția în cancer. În prezent, mai mult de 64% din medicamentele aprobate clinic au rădăcini spre origine naturală, direct sau indirect prin structuri chimice informate noi (farmacoforii). Printre aceste seturi, 60-80% constituie agenți antibacterieni și anticancer, conform Newman și Cragg, 2020. Aceste substanțe pot fi sistematic izolate din biomasa naturală, utilizându-se extracție ghidată de activitate și cromatografie. Mai multe noi aplicații erup constant pentru procesare și puritate îmbunătățite, în timp de metodele spectrometrice (de ex. UV-vis, Raman, IR, NMR și spectroscopii de masă, etc.) sunt importante pentru identificarea și caracterizarea componentelor active.

Pe de altă parte, instrumentele moderne moleculare biologice, precum analizele bazate pe celule *in vitro* sunt esențiale, însă utilizate preponderent în scopuri de selecție și pentru analize ale căror proiecte sunt modelate pe baza schimbărilor centrale biochimice și morfologice descrise pe durata celor patru stadii ale apoptozei. Unele exemple tipice includ: schimbări citomorfologice, externalizarea membranei fosfatidilserinei, fragmentare ADN, eliberarea caspazelor, activitate mitocondrială, manifestarea proteinei și a enzimelor, etc. Abilități adecvate în cultura de celule sunt de asemenea o necesitate pentru testarea viabilității cât și pentru detectarea și cuantificarea apoptozei. Sunt disponibile diferite tehnici de colorare, de ex. Annexin V (etichetată FITC), iodură de propidiu, DAPI, etc., pentru detectarea celulelor apoptotice din stadiile de dezvoltare timpurii la cele târzii, în timp de analiza TUNEL și PARP detectează stadiul final al apoptozei. Testele de confirmare sunt de obicei efectuate prin utilizarea microscopiei electronice (TEM și SEM), în timp ce unele specimene relevante de gene și proteine pot fi realizate sau cuantificate utilizând imunochimia, imunoblotting (western blot), Elisa, microscopie fluorescentă, citometrie de debit și RT-qPCR, etc.

Ipoteze / Obiective

Studii etno-farmacologice au arătat că *S. longipedunculata*, manifestă activități pro-inflamatorii, sprijinind motivele pentru utilizările sale tradiționale și aplicarea în medicina tradițională africană pentru

tratamentul erupțiilor cutanate, inflamațiilor, cancerului și bolilor asociate. Alegând o abordare farmacologică inversă bazată pe țintă, scopul și obiectivele noastre specifice includ: selecția, identificarea, izolarea și evaluarea principiilor pro-apoptotice anti-cancer care apar în extrasul de rădăcină. A fost de asemenea imperativ să determinăm și să caracterizăm componentul activ al cărui mod de acțiune este, direct sau indirect, responsabil pentru semnalizarea și activarea apoptozei. La final, investigarea metodei de extracție selectivă și precipitarea preferențială a acestor componenți pro-apoptotici activi din extractele crude.

Având cele de mai sus, rămâne faptul că securidaca este bogată în biomolecule amfipathice, precum proteinele, saponinele, fosfatidele, lipidele polare și glicolipidele etc., a căror prezență împiedică extracțiile lichid-lichid datorită formării incontroleabile de emulsie. Pentru realizarea acestor obiective, o analiză bazată pe celule și instrumente biologice moleculare sunt în mod clar indicate în timp de rezultatul așteptat este determinat prin măsurarea abilității "eșantioanelor de testare" de a fi capabile să inhibe creșterea și proliferarea liniilor celulare tumorale selectate. De asemenea, prin măsurarea nivelului schimbărilor manifestărilor genelor/proteinelor cheie de reglementare pro și anti-apoptotice, pentru a determina apoptoza. Cu toate acestea, într-o încercare de a copia cea mai apropiată practică, așa cum este efectuată de vindecătorii africani tradiționali în tratarea stărilor inflamatorii cutanate (așa cum s-a proclamat cu securidaca), o linie celulară de cancer cervical a fost aleasă ca model biologic adecvat, fiind carcinom de celule scuamoase-epiteliale (SCC) exact ca și cancerul de piele.

De fapt, unele carcinoame cervicale conțin "molecula hpv E6 (ca oncogen principal) a cărei prezență explică super activitatea și super manifestarea "proteinelor de supraviețuire", cât și MiR21. În majoritatea cazurilor de cancer cervical, MiR21 este super exprimat, în timp ce gena PTEN supresoare a tumorii este, pe de altă parte, semnificativ compromisă, insuficientă sau degradată. Pe de altă parte, este de asemenea evident că oncoproteina E6 ajută la degradarea supresorului de tumori p53 prin interacțiunea liantă a E6AP, și, în pofida acestui lucru, super manifestarea EGFR este puternic încurajată de E6 via calea YAP/ Hippo.

Pe baza acestei argumentări, avansăm astfel ipoteza că: manifestarea exacerbată indusă de "hpv E6" a proteinelor anti-apoptotice de supraviețuire la tumorile cervicale ar putea fi controlată prin utilizarea unui ecran chimic (inhibitor) din biblioteca chimică a *S. longipedunculata*. Aceasta ar putea de asemenea avea ca rezultat refacerea PTEN și a mecanismelor de reglare, în special la punctul de verificare a PI3K-AKT, susținând astfel apoptoza. Alte mecanisme suspectate precum calea Ras-ERK (MAPK) pot fi un factor contributiv având o legătură cu metabolismul plutei lipidice ale membranei sfingozinei prin activitățile sfingozin-chinazei. O enzimă a cărei sarcină este de a agita metaboliți puternic apoptotici (un oncogen) denumită sfingozină -1-fosfat (S1-P).

Study 1 - Securidaca - saponinele sunt inhibitori naturali ai AKT, MCL-1 și BCL2L1 în celulele canceroase ale colului uterin.

A fost efectuată o extracție dirijată de bioactivitate, având ca țintă componentele chimice ale *Securidaca Longipedunculata* ale căror acțiuni sunt mediate de apoptoză (moarte celulară tip 1 PCD). Activitățile au fost monitorizate și evaluate in vitro prin eșantioane bazate pe celule utilizând linii celulare de cancer cervical (Caski și Bu253TK), cât și HeLa și HFL-1 normal).

Obiectivele majore includ: identificarea, izolarea, purificarea și caracterizarea componentelor anticancer. Au fost utilizate mai multe metodologii, de ex. cromatografie (TLC pregătitor ((RP-C18, F254as), HPLC, cromatografie flash); cultură de celule, MTT, SRB, 96 plăci de microtitru, eșantioane apoptotice (microscopie fluorescentă DAPI; colorare cu Annexin, Vitexin PI), eșantion de migrare celulară/vindecarea de rană, analiză de gene RT-qPCR și eșantioane cantitative confirmative (imuno-colorare și Elisa) pentru BCL-2 și proteină VEGF. De asemenea, spectrometrie de masă aplicată (HR-QToF-ESI/MS), spectroscopie UV-Vis și Raman cât și post-derivatizare TLC pentru a caracteriza substanțele active.

Rezultatele arată că două fracțiuni TLC (4A3 și 4A4) au prezentat un IC50 semnificativ de (0,02502 și 0,04833) ug/mL respectiv pe linia celulară Caski la 48 de ore post-tratament (MTT). Datele au relevat faptul că

4A4 are index de selectivitate (SI) de 58 de pliuri mai citotoxic pe linii celulare bolnave (tumorale) Caski decât celulele HFL-1 normale (sănătoase). Având de asemenea o reducere semnificativă a migrației celulelor la 48 și 72 de ore pe linii celulare Caski și Bu25TK, dând o apoptoză timpurie cu Annexin V, colorare PI. Datele RT-qPCR au relevat o inhibiție a schimbării pliului (FC) proteinelor anti-apoptotice (MCL-1 și BCL2L1) cu un nivel diminuat de AKT-3, VEGFA, MALATI, etc.

Separarea 4A4 cu cromatografie flash a produs 24 de fracțiuni, dintre care 3 (FR-15, FR-16 și FR17) au păstrat o puternică citotoxicitate pe linie celulară Hela utilizând eșantion SRB. Separarea ulterioară a FR-15 cu Prep-HPLC a produs două fracțiuni proeminente [FR-15 (nr.6) și FR-15 (nr.7)] printre altele. Aceste două substanțe purificate parțial au produs fragmente notabile (ioni stabili) de [455 și 425] m/z respectiv pe spectrul MS/MS (modul negativ), confirmând prezența triterpenoidului aglicon detectat mai devreme de TLC. Spectroscopia Raman a 4A4 și a subfracțiilor, adică FR-15 (nr.6 și nr.7) relevată prin modul absorbției oligozaharidelor C-OC la 1162 cm⁻¹ și C=O carbonil/ester 1704 cm⁻¹, legăturile lipidice CH₂ și CH₃ (1442 și 1462) cm⁻¹ printre altele, indicând prezența glicozidelor naturale.

Concluzie: datele au relevat prezența componentelor pro-apoptotice a căror activitate poate fi mediată via calea dependentă PI3K-AKT..

Studiul 2 – Captarea Moleculară în Monostratul Emulsiei: O Nouă Strategie pentru Producția și Purificarea Saponinelor Bioactive

Studiul s-a ocupat de noua metodă de extracție, îmbogățirea purificării și precipitarea preferențială a produselor naturale țintă, utilizând tehnologia bazată pe emulsii. Această invenție utilizează matricea monostratului de emulsie ca instrument (sau rezervor) pentru adsorbția selectivă și precipitarea compușilor doriți din extractele lor naturale. Principiul se bazează doar pe teoria emulsiei inverse, auto-asamblarea moleculară și separația fazelor.

Aici, componentele saponinelor naturale ale *Securidaca longipedunculata* au fost sistematic extrase prin captarea moleculelor acestora într-o barieră monostrat de emulsie și recuperându-le la final în formă pură prin separația fazelor. Pentru început, extractele lor bogate au fost dispersate în apă pentru a construi o arhitectură de film monomolecular, prin auto-asamblare. Emulsifierea cu etil-eter a avut ca rezultat miclele afectate și a pus în pericol inversarea fazelor și separația fazelor printr-un echilibru termodinamic dezechilibrat. Ca rezultat pozitiv, s-a obținut un sistem Winsor II, având o fază superioară bogată în saponine (etil-eter) și o fază inferioară delimitată de impurități (apoasă). Mai mult, particulele de saponine din monostrat au suferit o tranziție într-un solvent etil-eter insolubil, au precipitat și au fost recuperate ca solide.

Întregul proces a fost monitorizat prin bioanaliză utilizându-se o linie celulară de cancer cervical (Caski) ca model biologic. Experimentul a fost validat utilizând fracțiuni mixte de saponine securidaca, purificate de TLC (RP-C18, F254S). TEM și SEM au relevat morfologii interesante și mărimi de particule între nanometri și micrometri.

La final, a fost realizat un produs chimic omogen de o puritate de peste 90% saponine și o rată totală de recuperare de 94%. Aici am arătat că metoda noastră nouă de separație bazată pe emulsie ("captare moleculară în monostratul emulsiei") este o metodă eficientă pentru recuperarea, producerea și purificarea saponinelor cât și a diverselor glicozide de origine naturală din surse regenerabile.

Din aceste rezultate preliminare, s-a descoperit că această nouă metodă este adecvată pentru producția extinsă de glico-compuși și purificarea amestecurilor de surfactanți naturali în special extractele bogate în compuși naturali glicozilați. De asemenea, poate fi utilizată pentru fracționarea și curățarea extractelor pentru bioanaliză, analiză metabolomică, lipidomică, proteomică și studii chimio-taxonomice, etc.

Studiul 3 – ACTIVITATEA DE PURJARE A RADICALILOR LIBERI ȘI CONȚINUTUL TOTAL DE POLIFENOL AL EXTRACTELOR DE RĂDĂCINI ȘI FRUNZE DE SECURIDACA LONGIPEDUNCULATA

Având în vedere rolul antioxidantilor în activarea apoptozei și în curățarea speciilor de oxigen reactiv periculoase, studiul 3 s-a ocupat extensiv de conținutul polifenolic și antioxidant al extractelor naturale obținute din rădăcini și frunze de *S. longipedunculata* utilizând diferite medii solvente organice: etanol (E), eter de petrol (PE), acetat de etil (EtOAc), și apă (W). Flavonoidele și polifenolii au fost analizați prin metoda cromatografică, spectrometrică și prin spectrometrie de masă. Evaluarea activității antioxidante a fost efectuată prin mai multe metode *in vitro* (decolorare DPPH, FRAP, auto-oxidarea hemoglobinei indusă prin nitrit, inhibarea peroxidării lipidelor catalizată prin citocrom C).

Rezultatele noastre au relevat faptul că frunzele au fost mai bogate în principii fenolice decât rădăcinile în timp ce acetatul de etil a arătat cea mai mare emisie de polifenoli cât și potențialul antioxidant. Profilul de flavonoide și polifenoli a demonstrat o mai mare distribuție la nivelul frunzelor, în timp ce următorii compuși au fost identificați pentru prima dată în frunze: hiperozid, isoquercetin, rutină, acid *p*-cumaric.

Concluzie Generală

Rezultatul acestei cercetări constă din două realizări majore, în două zone distincte ale cercetării produselor naturale/descoperirea de medicamente anticancer din produse naturale. Am raportat pentru prima dată că *S. longipedunculata* conține anumiți inhibitori al căror mod de acțiune depinde semnificativ de calea PI3K-AKT pentru semnalarea activării apoptozei.

A doua realizare, pe de altă parte, ține de inventarea unei noi strategii bioanalitice pentru extracție selectivă, separarea și purificarea cât și pentru producerea produșilor naturali bioactivi omogeni, din biomasă naturală și surse regenerabile. Această invenție a fost menită pentru precipitarea preferențială și extracția țintită a glicozidelor, glico-compușilor și produșilor glicozilați prin adsorbție și captare moleculară în monostrat de emulsie. Făcând astfel ușoară recuperarea în cantitate mare prin separarea de fază. Această inovație este foarte robustă și ar putea fi optimizată și adaptată pentru operațiuni industriale lichid – lichid pe scară largă, pentru procesarea și producția în aval de produse naturale din resurse naturale regenerabile, (de ex. ingrediente farmaceutice active (API), excipiente, nutraceutice și adjuvante pentru vaccinuri). În plus, strategia ar putea fi de asemenea aplicată în alte domenii precum cercetare bio-analitică și metabolomică, pentru fracționarea și curățarea extractelor de extracte naturale, liza celulelor și medii lichide de fermentare și prepararea de eșantioane pentru lipidomică, proteomică și analiza glicomică, etc.

This PhD thesis was supported by: 1) Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy (UMF Cluj-Napoca), through internal grants (5200/70/01.03.2017 and 7690/81/15.04.2016); 2). The European Union (EU) – through Erasmus+ mobility; and 3). Martin-Luther University of Halle-Wittenberg, Germany, under the DAAD-Program (STIBET-Doctorandenforderung). Lastly, I would like to use this medium to thank the Romanian government for the “award of scholar of Romanian state” 112457/CMJ/16.09.2014 (Ministry of foreign affairs no. A10/1924/1914). A scholarship awarded for the regular full term of my PhD program.