

Contract nr: 30 CI / 25.07.2017

Cod proiect: PN-III-P2-2.1-CI-2017- Programul 2 – Creșterea competitivității economiei românești prin cercetare, dezvoltare și inovare. Subprogramul 2.1. – Competitivitate prin cercetare, dezvoltare și inovare. Tip proiect: Cecuri de inovare

Contractor beneficiar: SC RODIA SRL

Contractor furnizor de servicii: Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu-Hațieganu” Cluj-Napoca

Denumire proiect: Screening-ul fitochimic și evaluarea proprietăților terapeutice ale extractului fluid de Artemisia annua L

Acronim proiect: EXFLARTAN

Domeniu: Domenii de specializare inteligentă / Bioeconomie: Agro-alimentare

Perioada acoperită: 25.07.2017 – 30.12.2017

REZULTATE:

1. Identificarea și pregătirea produsului vegetal conform scopului farmaceutic urmărit:

Produsul vegetal a fost achiziționat de la centre de recoltare a plantelor medicinale din zona de Vest, Nord-Vest a României, fiind culeasă din flora spontană a județului Bihor. Pregătirea produsului vegetal a constat în îndepărtarea totală a umidității prin uscare în etuvă la 40°C și apoi mărunțirea conform Farmacopeei Române Ed. X (trecere prin sita I).

2. Obținerea extractelor vegetale, caracterizarea și standardizarea acestora:

a) Obținerea extractului vegetal a fost efectuată conform normelor compendiale (Farmacopeea Română Ed.X) și anume s-a realizat extracția principiilor active prin macerare cu alcool (raportul produs vegetal/alcool 30° = 20%), la temperatura camerei (20°C), timp de 24 ore. Soluția extractivă a fost adusă în rotavapor pentru îndepărtarea fracției volatile. Frația apoasă a fost congelată și apoi liofilizată. S-a obținut o pulbere brună cu aspect omogen, spongios.

b) Evaluarea conținutului în principii active a extractului liofilizat a fost efectuată prin metoda HPLC cu detecție în UV (Aparat HPLC - ACME 9000, cu detector UV (Younglin Instrument)). Programul de procesare folosit: Autochro 3000, Coloana: Nucleosil C18 100x4,65μ, Eluent: metanol: apa: acid acetic = 300: 600: 6, λ de detecție: 370 nm. Standardul HPLC utilizat = etalon de quercetină. S-a determinat un conținut total de flavonoide de 688.10±0.00 mg quercetină/100 masă uscată. (Figura 1)

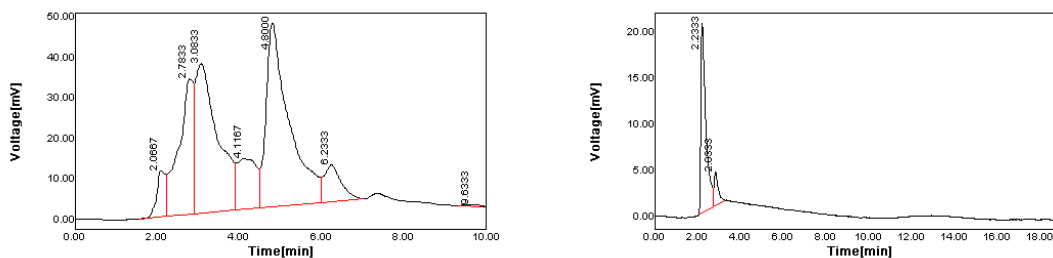


Figura 1. HPLC: stânga = extract *Artemisia annua L.* și dreapta = quercetina (etalon)

3. Demonstrarea capacității antioxidante și antitumorale *in vitro* și *in vivo*:

a) Testarea activității antioxidante a extractului vegetal *in vitro* prin metodele DPPH, ABTS și FRAP (Tabel I).

Tabel I. Determinarea capacității antioxidante a extractului *Artemisia annua L.*

Probă	DPPH%	ABTS ($\mu\text{mol Trolox echivalent/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol Trolox echivalent/g}$)
<i>Artemisia annua L.</i>	9.03 \pm 1.11	109.26 \pm 5.98	98.35 \pm 0.00

Rezultatele obținute au demonstrat activitatea antioxidantă ”*in vitro*” a extractului liofilizat de *Artemisia annua L.*

b) Determinarea activității SOD-mimetice a extractului vegetal „*in vivo*”:

Determinarea a fost efectuată utilizând o tulpină de *S. Cerevisiae* Δsod1 (ATCC96687) care are abilitatea de a delecta/inserta gena SOD_1 răspunzătoare de codificarea sintezei $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$. Stresul oxidativ a fost indus de menadionă (care generează radicali superoxid) și H_2O_2 (care generează radicali $\text{OH}\cdot$). În prezența extractului (conc. 10, 30, 50 μm) se observă o scădere a diametrului ariei de inhibiție față de proba de control (0 μm) ceea ce indică că extractul are efect protector asupra stresului oxidativ produs atât de menadionă cât și de H_2O_2 . Efectul protector nu depinde semnificativ de creșterea concentrației soluției extractive și este mai mare în cazul stresului oxidativ generat de menadionă.

c) Determinarea capacității antioxidante/antitumorale prin studii pe culturi celulare:

•**Cultura celulară:** evaluarea efectului antiproliferativ a fost efectuat pe fibroblaste dermice umane normale (HDF) și pe o linie de celule melanom (WM35) aflate în faza de creștere radială.

•**Testul de proliferare celulară:** testele de citotoxicitate celulară au fost efectuate prin metoda cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT). S-a aplicat pe culturi extractul de *Artemisia annua L.* în concentrații de la 0.05 la 50 $\mu\text{g/ml}$ timp de 24 h. Ca și control au fost utilizate culturile celulare tratate doar cu mediu. A fost determinată viabilitatea celulară. Valoarea IC_{50} (concentrația necesară inhibării a 50% din proliferarea celulară) a fost calculată utilizând curba de calibrare prin regresie liniară (Figura 2).

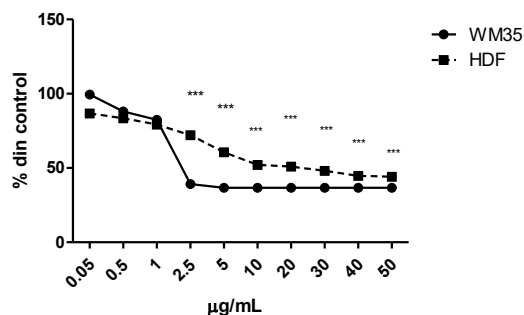


Figura 2. Evaluarea comparativă a efectului antitumoral al extractului de *Artemisia annua L.* în concentrații seriate (0.05-50 µg/ml) pe linia fibroblastică HDF și linia tumorală de melanom WM35 după 24 ore (vs. celule netratate) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=3) (Anova two way, Bonferoni post test, *** p<0.001).

Pentru linia HDF, $CI_{50}=19.19$ µg/ml, în timp ce CI_{50} pentru linia WM35 a avut valori de peste 3 ori mai mici, anume 5.550 µg/ml. Cele 2 linii celulare au avut un comportament similar până la concentrația de 1 µg/ml, dar de la concentrația de 2.5 µg/ml diferența a devenit semnificativă.

4. Evaluarea „in vivo” pe șoareci de laborator a raportului eficacitate terapeutică (antioxidantă / antitumorală) – risc (toxicitate):

Studiul a fost avizat de către Comisia de Bioetică a UMF „Iuliu-Hațieganu” Cluj-Napoca (aviz nr.369/28.IX.2017) și autorizat de către DSV Cluj (autorizație de proiect nr. 90/10.X.2017), în conformitate cu Legea 43/2014 și Directiva 63/2010 UE. Anterior testării efectului antitumoral, s-a efectuat studiul preliminar de toxicitate al extractului. Studiul propriu zis a fost efectuat pe 4 loturi a câte 8 șoareci: lot control (inoculat cu soluție salină fiziologică), lot inoculat cu Carcinomul Ascitic Ehrlich (CAE) și netratat, lot inoculat CAE și tratat cu Doxorubicină și lot CAE tratat cu Doxorubicină și extract vegetal de *Artemisia annua L.* Antitumoralul utilizat drept referință a fost Doxorubicina clorhidrică. Cantitatea de *Artemisia annua L.* administrată: 50 mg/kg masă corporală (doză stabilită în urma studiilor preliminare de toxicitate), i.p. în zilele 1, 3 și 6. După 14 zile au fost recoltate probe de sânge și prelevat ficatul și rinichii, șoarecii fiind eutanasiați.

a) Studiul de toxicitate subacută al extractului:

A fost realizat pe 10 de șoareci (5 masculi și 5 femele negestante) care au primit zilnic, timp de 14 zile, câte 1000 mg substanță uscată/kg masă corporală. Animalele au fost evaluate clinic, zilnic, pe tot parcursul experimentului. La sfârșitul experimentului au fost recoltate probe de sânge și șoarecii au fost eutanasiați. Sângele a fost utilizat pentru efectuarea examenului biochimic (determinarea toxicității la nivel hepatic și renal – Tabel II) și hematologic (determinarea eritrogramei, leucogramei, trombogramei - Tabelele III-V). Șoarecii au fost necropsiați și au fost prelevate fragmente de ficat și rinichi în vederea examenului histopatologic. Secțiunile obținute din fragmentele de ficat și rinichi au fost colorate cu hematoxină-eozină.

Tabel II. Valorile biochimiei serice, administrare extract *Artemisia annua L.* (1000 g / kg mc / 14 zile)

	Uree (mg/dL)	Creatinină (mg/dL)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	Proteină totală (g/dL)	Albumină (g/dL)
Lot M	15.97±2.35	0.350±0.130	32.56±1.34	125.78±45.98	5.54±0.22	3.45±0.32
Lot F	19.90±6.52	0.360±0.182	46.89±2.54	185.76±56.72	6.06±0.18	3.67±0.78

Valori normale: Uree 12-28 mg/ml, Creatinină 0.3-1 mg/dl, ALAT 26-77U/L, ASAT 54-269 U/L, proteină totală 3.5-7.2g/dL, albumină 2.5-4.8g/dL (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media±Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel III. Valorile eritrogramei, administrare extract *Artemisia annua L.* (1000 g / kg mc / 14 zile)

	E (10 ¹² /l)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VEM (fl)	HEM (pg)	CHEM (g/dl)	Ind.Aniz. (fl)
Lot M	8.58±0.81	13.08±1.31	41.08±3.01	47.87±1.34	15.24±0.19	31.84±0.68	33.59±1.24
Lot F	8.89±1.19	14.12±1.59	44.36±3.96	49.89±3.62	15.88±0.88	31.83±0.73	35.36±1.58

Valori normale: E 7-12.5 10¹²/l, Hb 10.2-16.6 g/dl, Ht 39-49 % (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel IV. Valorile leucogramei, administrare extract *Artemisia annua L.* (1000 g / kg mc / 14 zile)

	Lt 10 ⁹ /l	Limf 10 ⁹ /l	Cel Med 10 ⁹ /l	Gra 10 ⁹ /l
Lot M	9.02±1.93	6.49±1.14	0.23±0.04	2.30±0.91
Lot F	9.65±1.77	6.80±0.46	0.29±0.09	2.56±1.21

Valori normale: Lt 6-15 10⁹/l (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Tabel V. Valorile trombogramei, administrare extract *Artemisia annua L.* (1000 g / kg mc / 14 zile)

	Trombocite 10 ⁹ /l	Vol tromb. %	Vol tromb fl	Var.vol.tromb. fl
Lot M	905.60±149.11	0.59±0.09	6.56±0.23	7.04±0.23
Lot F	941.60±302.34	0.68±0.19	7.36±0.72	8.78±1.76

Valori normale: Trombocite 800-1100 10⁹/l (Hrapkiewicz și Medina, 2007) (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n=5)

Testarea toxicității subacute a arătat că animalele nu au prezentat modificări clinice pe parcursul experimentului, toate animalele au supraviețuit până la final. Nu s-au înregistrat modificări notabile ale masei corporale, toate loturile în studiu având o ușoară tendință ascendentă. Parametrii biochimici și hematologici nu au suferit modificări, ei menținându-se în limite normale la toate animalele luate în studiu.

Studiul histologic al ficatului a prezentat o structură normală, hepatocitele având aspect normal, fiind separate prin capilare sinusoidale, canalicule biliare și țesut de susținere. Cordoanele celulare ale lui Remack au fost bine evidențiate, țesutul de susținere intralobular a fost reprezentat de țesut conjunctiv în cantitate redusă, fibre de colagen și reticulină. **Studiul histologic al rinichiului** a evidențiat un aspect normal al parenchimului renal, la nivelul corticalei renale glomerulul renal fiind bine delimitat. Tubii contorți au prezentat celule intacte cu nucleii sferici situați central. Țesutul conjunctivo-vascular din stroma corticalei a fost slab reprezentat.

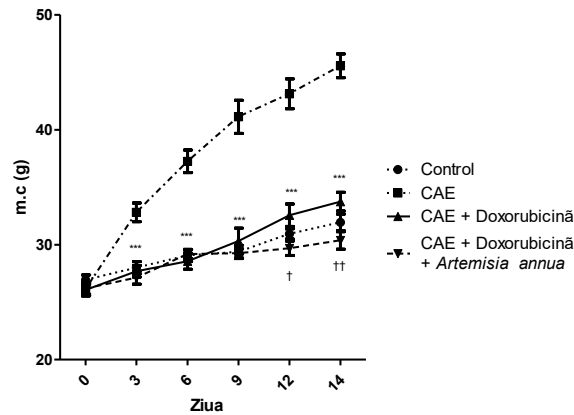


Figura 5. Influența extractului *Artemisia annua* L. asupra dinamicii masei corporale la șoarecii inoculați cu CAE (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n = 8 animale / grup) (Anova two way, Bonferoni post test, *** p<0.001 comparativ lotul CAE; † p<0.05, †† p<0.01 comparativ cu lotul CAE + Doxorubicina).

Determinarea enzimelor implicate direct (SOD, CAT) și indirect (XOD, Px) în stresul oxidativ din sânge:

Inocularea CAE este asociată cu creșterea marcată a activității celor 4 enzime deoarece celulele tumorale determină o creștere a radicalilor liberi de oxigen. Pentru loturile CAE+Doxorubicină și CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. se înregistrează scăderi semnificative ale activității celor 4 enzime comparativ cu lotul CAE. Diferență semnificativă se obține și între lotul CAE+Doxorubicină+*Artemisia annua* L. față de CAE+Doxorubicină ceea ce demonstrează intensificarea efectului antioxidant în urma asocierii *Artemisia annua* L. cu Doxorubicina (Figura 6).

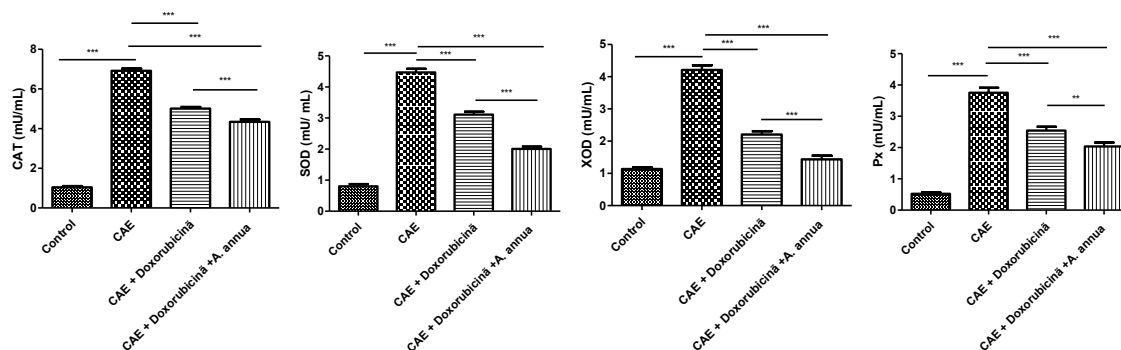


Figura 6. Influența extractului de *Artemisia annua* L. asupra activității CAT, SOD, XOD, Px (sânge) (mU/mL) la șoarecii inoculați cu CAE. (Media ± Eroarea Standard a Mediei) (n = 8 animale / grup) (Anova one way, Bonferoni post test, (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

Studiul de față a demonstrat efectul antioxidant/antitumoral al extractului de *Artemisia annua* L. și potențarea efectului antitumoral în urma administrării asocierii extractului de *Artemisia annua* L. cu Doxorubicina comparativ cu administrarea Doxorubicinei singure după inocularea CAE la șoareci.

5. Tehnologia de realizare a extractului fluid:

Pentru administrare, extractul liofilizat l-am dizolvat într-un amestec hidro-glicerinat (90:10). Extractul fluid a fost repartizat în flacoane brune, etichetate pe care se vor menționa date de identificare ale produsului, preparatorului, modul de administrare și precauțiile de utilizare.



6. Utilitatea practică a proiectului la nivelul farmaciei comunitare:

A fost realizat un preparat biocompatibil, cu utilitate în neutralizarea radicalilor liberi implicați în stresul oxidativ, cu rol în încetinirea îmbătrânirii și prevenirea/tratarea afecțiunilor cardiovasculare, neurodegenerative, neoplaziilor (terapie adjuvantă, monoterapie). Produsul este și va fi utilizat ca antioxidant/antitumoral în scop preventiv/curativ.

Introducerea pe piață și comercializarea la nivelul unităților farmaceutice a fitopreparatului este și va fi benefică la soluționarea unor probleme de sănătate cu care se confruntă populația. Pe această cale, se pune la dispoziția pacienților prin intermediul unităților farmaceutice un produs nou competitiv care deține efecte benefice, este ușor de administrat pe cale orală sub formă de picături și nu are efecte secundare.