

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA  
Facultatea de Biologie și Geologie  
Școala doctorală Biologie Integrativă

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

### **-REZUMAT-**

Student-doctorand:  
Cruceriu Daniel

Conducător științific:  
Prof. dr. Rakosy-Tican Elena

Cluj-Napoca  
2020

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA  
Facultatea de Biologie și Geologie  
Școala doctorală Biologie Integrativă

**Extrakte vegetale farmaceutice în managementul  
cancerului de sân**

*Calendula officinalis*, *Solanum chacoense* și *S. bulbocastanum*:  
profil biochimic, activitate anti-tumorală selectivă  
și efecte moleculare asociate

**-REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT-**

Student-doctorand:  
Cruceriu Daniel

Conducător științific:  
Prof. dr. Rakosy-Tican Elena

Cluj-Napoca  
2020

## Cuprinsul rezumatului

CAPITOLUL I - Cancerul de sân: epidemiologie și <i>status quo</i> în practica clinică curentă .....	3
CAPITOLUL II - Compuși de origine vegetală în managementul cancerului de sân	6
1. Compuși vegetali în terapia convențională a cancerului de sân.....	6
2. Compuși vegetali în medicina complementară și alternativă a cancerului de sân .....	7
3. Compuși vegetali în prevenția cancerului de sân: concepte de nutrigenomică.	8
CAPITOLUL III - <i>Calendula officinalis</i> : plantă medicinală cu proprietăți anti-tumorale.....	10
1. Profilul fitochimic al speciei <i>C. officinalis</i> .....	10
2. <i>C. officinalis</i> în managementul cancerului .....	11
CAPITOLUL IV - <i>Solanum spp.</i> : specii sălbatice cu potențial nutrigenomic în cancer .....	13
1. Profilul fitochimic al speciilor <i>S. chacoense</i> și <i>S. bulbocastanum</i> .....	14
2. Activitatea anti-tumorală a speciilor de <i>Solanum spp.</i> .....	14
Scopul și obiectivele lucrării .....	15
CAPITOLUL V - Materiale și metode.....	16
1. Producerea extractelor vegetale.....	16
2.1. Material vegetal și condiții de cultură.....	16
2.2. Producerea extractelor vegetale prin tehnica ultrasonicării.....	16
3. Analiza profilului fitochimic al extractelor .....	17
3.1. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici și a alcaloizilor prin HPLC-PDA/ESI-MS .....	17
3.2. Identificarea și cuantificarea relativă a compușilor volatili prin ITEX/GC-MS.....	17
4. Determinarea activității biologice a extractelor.....	18
4.1. Liniile celulare și condiții de cultură.....	18
4.2. Determinarea activității anti-tumorale a extractelor prin testul MTT.....	18
4.3. Determinarea efectelor moleculare ale extractelor prin RT-qPCR.....	19

CAPITOLUL VI – Rezultate.....	20
1. Profilul fitochimic al extractelor vegetale .....	20
1.1. Profilul fitochimic al extractelor de <i>C. officinalis</i> .....	20
1.1.1. Conținutul de compuși fenolici al extractelor de <i>C. officinalis</i> .....	20
1.1.2. Conținutul de compuși volatili al extractelor de <i>C. officinalis</i> .....	21
2.1. Profilul fitochimic al extractelor de <i>S. chacoense</i> .....	24
2.1.1. Conținutul de compuși fenolici al extractelor de <i>S. chacoense</i> .....	24
2.1.2. Conținutul de alcaloizi al extractelor de <i>S. chacoense</i> .....	24
2.1.3. Conținutul de compuși volatili al extractelor de <i>S. chacoense</i> .....	24
3. Activitatea anti-tumorală a extractelor vegetale în cancerul de sân.....	27
3.1. Activitatea anti-tumorală a extractelor de <i>C. officinalis</i> .....	27
3.2. Activitatea anti-tumorală a extractelor din speciile de <i>Solanum spp.</i> .....	28
4. Efectele moleculare ale extractelor vegetale în cancerul de sân.....	29
4.1. Efectele moleculare induse de extractele de <i>C. officinalis</i> .....	29
4.2. Efectele moleculare induse de extractele din speciile de <i>Solanum spp.</i> ..	29
CAPITOLUL VII - Discuții .....	32
1. <i>C. officinalis</i> : potențialul în managementul cancerului de sân.....	32
1.1. Profilul fitochimic al extractelor din <i>C. officinalis</i> .....	32
1.2. Selectivitatea în activitatea anti-tumorală a extractelor de <i>C. officinalis</i> .....	33
1.3. Mecanismele de acțiune ale extractelor de <i>C. officinalis</i> .....	34
2. <i>S. chacoense</i> și <i>S. bulbocastanum</i> : potențialul în prevenția cancerului de sân	36
2.1. Profilul fitochimic al extractelor din <i>S. chacoense</i> .....	36
2.2. Selectivitatea în activitatea anti-tumorală a extractelor din <i>Solanum spp.</i> .....	37
2.3. Mecanismele de acțiune ale extractelor de <i>Solanum spp.</i> .....	38
Concluzii .....	39
Bibliografie selectivă.....	40

**Cuvinte cheie:** *Calendula*, *Solanum*, polifenoli, terpeni, alcaloizi, activitate antioxidantă, cancer mamar, citotoxicitate selectivă, proliferare, apoptoză,

## **CAPITOLUL I - Cancerul de sân: epidemiologie și *status quo* în practica clinică curentă**

Cancerul de sân reprezintă cea mai frecventă tumoră malignă în rândul femeilor, peste 2 milioane de persoane fiind diagnosticate cu această patologie în 2018. Din perspectiva mortalității, cancerul de sân a cauzat în același an 626.000 de decese la nivel global, reprezentând 24,2% din totalul deceselor cauzate de cancer în rândul populației feminine (Bray și colab., 2018).

În abordarea clinică curentă, diagnosticul și prognosticul cancerului de sân presupun în principal determinarea stadiului tumoral, gradului tumorii și statusului unor biomarkeri cu valoare de prognostic și țintă terapeutică, parametrii pe baza cărora se va stabili strategia terapeutică potrivită fiecărei paciente. Cancerul de sân se clasifică la modul general în carcinom *in situ* și carcinom invaziv, în funcție de infiltrarea celulelor tumorale în țesuturile adiacente, clase care la rândul lor pot fi împărțite în carcinom ductal și carcinom lobular, în dependență de localizarea tumorii primare (Mastropasqua și Viale, 2017).

Stadiul tumorii este cel mai des determinat cu ajutorul sistemului de stadializare TNM, în funcție de dimensiunea tumorii (T), numărul ganglionilor limfatici axilari invadați (N) și existența metastazelor în alte organe (M) (Koh și Kim, 2019). Sistemul TNM indică stadiul în care se află o tumoră la momentul diagnosticului, dar nu reușește să stabilească agresivitatea celulelor tumorale, factor extrem de important din perspectiva evoluției bolii. Gradul histologic al tumorii reprezintă gradul de diferențiere al celulelor tumorale în comparație cu celulele normale din același țesut și este stabilit de cele mai multe ori în cancerul de sân cu ajutorul sistemului de gradare Nottingham. Gradul Nottingham este determinat în funcție de trei parametrii histologici: polimorfismul nuclear (indicator din perspectiva structurii celulare), indexul mitotic (indicator din perspectiva capacității de proliferare) și prezența formațiunilor epiteliale tubulare (indicator din perspectiva arhitecturii tisulare) la nivelul țesutului tumoral (Dalle și colab., 2008).

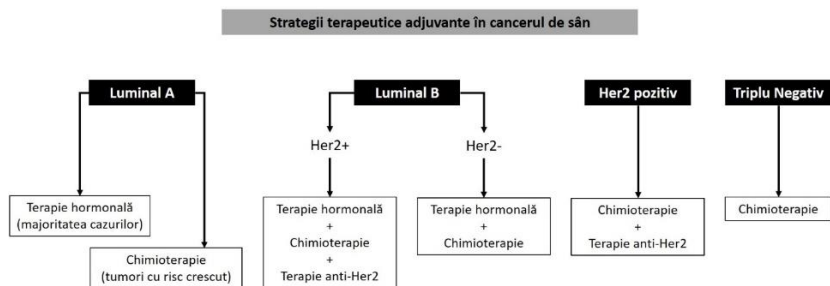
Chiar dacă stadiul și gradul tumorii sunt elemente importante ale diagnosticului cancerului mamar ce influențează strategia terapeutică (în special din punctul de vedere al intervenției chirurgicale și al radioterapiei),

decizia din perspectiva tratamentului adjuvant/ neoadjuvant bazat pe chimioterapie se bazează cu precădere pe statusul unor biomarkeri cu valoare de prognostic și țintă terapeutică. Dintre aceștia, cei mai des utilizați markeri tumorali în clasificarea moleculară a cancerului mamar sunt receptorii hormonalni pentru estrogen (ER) și progesteron (PR), receptorul tirozin-kinazic Her2/Neu (ERBB2) și markerul de proliferare Ki67 (Nounou și colab., 2015). Pe baza nivelului de exprimare al acestor patru categorii de molecule, cancerul de sân a fost împărțit în patru subtipuri moleculare generale: luminal A, luminal B, Her2 pozitiv (Her2+) și triplu negativ (Onitilo și colab., 2009). Încadrarea unei tumori într-unul dintre aceste subtipuri moleculare oferă informații atât din prisma evoluției și progresului bolii în organism, cât și din perspectiva răspunsului la tratament. Astfel, pe baza clasificării cancerului de sân în subtipuri moleculare va fi stabilită grila de tratament specifică fiecărei paciente.

Tratamentul convențional al cancerului de sân constă în intervenția chirurgicală pentru extirparea tumorii, dublată de radioterapie pe de o parte și terapie sistemică (chimioterapie, terapie hormonală și terapie țintită) pe de cealaltă parte, în dependență de caracteristicile clinice ale pacientului (Dhankhar și colab., 2010). În cazul tumorilor mamare localizate se intervine prin rezecție chirurgicală, de cele mai multe ori prin lumpectomie (operație cu conservare a sânelui) (Matsen și Neumayer, 2013). Intervenția chirurgicală poate fi precedată de tratament neoadjuvant, pentru a micșora dimensiunile tumorii. Ulterior extirpării tumorii, se apelează de cele mai multe ori și la terapie adjuvantă, cu scopul de a minimiza șansele de metastazare și recidivă a bolii (Matsen și Neumayer, 2013). Decizia terapeutică din perspectiva terapiilor sistemice ce urmează a fi administrate pacientelor cu cancer de sân este luată pe baza apartenenței tumorii la unul dintre cele patru subtipuri moleculare.

Răspunsurile clinice ale pacienților cu cancer mamar depind în mare măsură de subtipul molecular, atât datorită fenotipului caracteristic fiecăruia dintre acestea, cât și datorită opțiunilor terapeutice mai mult sau mai puțin limitate (Fig. 1). Astfel, subtipul luminal A, cu un fenotip mai puțin agresiv, cu capacitate de proliferare redusă și cu terapie hormonală disponibilă în clinică prezintă cel mai bun răspuns clinic, cu rate de supraviețuire la 5 ani de peste 90%. La polul opus se află cancerul mamare

triplu negative, ce aparțin celui mai agresiv subtip molecular de cancer de sân, în cazul cărora nu există nici o terapie țintită în practica clinică curentă.



**Fig. 1** Opțiunile terapeutice în cancerul de sân, în funcție de subtipul molecular (adaptat după Nounou și colab., 2015).

Coroborând aceste date, se evidențiază faptul că tratamentul convențional al cancerului de sân este departe de a fi într-adevăr eficient. Chiar dacă, în practica clinică curentă, există o serie de opțiuni terapeutice țintite, acestea sunt limitate la anumite subtipuri moleculare, iar rezistența la aceste tratamente a diferitelor subtipuri moleculare la care terapia țintită este recomandată, este un fenomen încă des întâlnit (Chun și colab., 2017). Totodată, lipsa unor tratamente țintite în cancerul triplu negativ, precum și ineficiența terapiei în general în cazul tumorilor mamare de stadiu avansat cresc șansele eșecului terapeutic (Ismail-Khan și Bui, 2010). Astfel, cancerul de sân metastatic este aproape universal fatal în 5-10 ani de la momentul diagnosticului, fapt rămas valabil în ultimii 30 de ani (Tevaarwerk și colab., 2013).

În acest context, o parte importantă din eforturile comunității științifice se concentrează pe identificarea de noi compuși cu acțiune anti-tumorală, cu scopul de a îmbunătăți eficiența tratamentului și de a diminua efectele secundare ale terapiei. Una dintre cele mai importante surse de compuși bioactivi cu potențial anti-cancer este reprezentată de organismele vegetale.

## **CAPITOLUL II - Compuși de origine vegetală în managementul cancerului de sân**

### **1. Compuși vegetali în terapia convențională a cancerului de sân**

Organismele vegetale reprezintă o sursă primară de compuși naturali, cu precădere metaboliți secundari pentru oncologia modernă. Peste 3000 de specii de plante au fost identificate de-a lungul timpului deținând proprietăți anti-tumorale (Tariq și colab., 2017), mecanismele de inducere a morții celulare provocate de compușii naturali fiind extrem de diverse (Gali-Muhtasib și colab., 2015). Între anii 1940 și 2014, 49% dintre medicamentele oncologice aprobate spre utilizare ca parte a grilelor de chimioterapie au fost compuși de origine naturală (Newman și Cragg, 2016), dovedind impactul acestor constituenți vegetali în terapia convențională a cancerului. Cu toate acestea, din totalul de 250.000 de specii de plante existente, doar 10% au fost testate din perspectivă farmacologică până în acest moment (Iqbal și colab., 2017).

Interesul pentru integrarea compușilor de origine vegetală în terapia convențională a cancerului a apărut după anii 1950, când au fost descoperiți alcaloizii vinca și podofilotoxinele, două categorii de metaboliți secundari izolați din plante, caracterizate de o puternică activitate anti-tumorală (Cragg și Newman, 2005). Ulterior, numeroși alți compuși de origine vegetală cu potențial anti-tumoral au fost identificați, cele mai importante clase fiind taxanii și camptotecinele, compuși ce au fost incluși în grilele de chimioterapie convențională începând cu anii 1990 (Safarzadeh și colab., 2014). Astfel, o proporție covârșitoare de medicamente oncologice utilizate în ziua de astăzi sunt de proveniență naturală. Din totalul de 65 de astfel de medicamente aprobate în perioada 1981-2002 pentru tratarea cancerului, 48 sunt din surse naturale (Wang și colab., 2012). Din cele 121 de medicamente oncologice aprobate de Agenția de Administrare a Hranei și Medicamentului (FDA – *Food and Drug Administration*) utilizate în S.U.A în anul 2013, 90 au fost izolate inițial din rândul organismelor vegetale (Safarzadeh și colab., 2014). Dintre toate acestea, două clase de compuși de proveniență vegetală sunt utilizate la modul general în tratamentul cancerului de sân: alcaloizii vinca și taxanii (Iqbal și colab., 2017).

Corelând toate aceste date este demonstrat impactul major al compușilor de origine vegetală în tratamentul cancerului de sân, ca parte a terapiei



convenționale din practica clinică curentă. Totodată, este subliniat potențialul constituenților vegetali în dezvoltarea de noi terapii eficiente, având în vedere și faptul că doar 10% din toate speciile de plante au fost testate pentru proprietățile farmacologice până în acest moment (Iqbal și colab., 2017).

## **2. Compuși vegetali în medicina complementară și alternativă a cancerului de sân**

Medicina complementară și alternativă (CAM – *Complementary and Alternative Medicine*) cuprinde toate practicile legate de sănătatea umană care nu fac parte integrantă din sistemul de sănătate convențional, dar care sunt utilizate de către mulți pacienți cu scopul de a-și completa îngrijirea (Eisenberg și colab., 1998). Peste 49% dintre pacienții diagnosticați cu cancer după anul 2000 utilizează cel puțin un astfel de produs asociat CAM în timpul sau după finalizarea tratamentului convențional (Horneber și colab., 2012). Cea mai des utilizată formă de CAM în rândul pacienților cu cancer este utilizarea diferitelor extracte, formule sau suplimente de origine vegetală, reunite sub denumirea generică de preparate vegetale (Molassiotis și colab., 2006).

Preparatele vegetale au potențialul de a crește atât durata de viață, cât și calitatea vieții pacienților oncologici, studii multiple sugerând rolul adjuvant, respectiv paliativ pe care acestea ar putea să îl dețină (Efferth și colab., 2007; Seely și Oneschuk, 2008). Aceste metode de medicină complementară bazate pe compuși de origine vegetală ar ține sub control simptomele asociate tratamentului convențional, ar crește sensibilitatea celulelor tumorale la acțiunea chimioterapiei, ar scădea citotoxicitatea compușilor convenționali asupra celulelor normale și ar îmbunătăți răspunsurile imune ale organismului (Helyer și colab., 2006; Navo și colab., 2004). Totuși, marea majoritate a datelor ce susțin beneficiile preparatelor vegetale provin din studii preclinice, *in vitro* și *in vivo*, ce nu pot fi transpuse automat pe pacienți. În cazul subiecților umani, eficiența acestor terapii complementare este bazată de cele mai multe ori pe dovezi empirice și pe studii de caz particulare, studiile clinice la scară largă fiind extrem de puține (Liao și colab., 2013).

Atât efectele benefice cât și cele nocive ale preparatelor vegetale consumate concomitent cu tratamentul convențional al cancerului se datorează în mare măsură interacțiunilor farmacodinamice dintre compușii implicați (Cheng și colab., 2010). Astfel, chiar dacă compușii de origine

vegetală pot să potențeze efectele chimioterapiei clasice, aceștia pot și interfera cu activitatea anti-tumorală a medicamentelor oncologice (Aung și colab., 2017), prin alterarea căilor responsabile de metabolizarea chimioterapicelor, și astfel scăderea expunerii tumorii la acțiunea acestora (Enioutina și colab., 2017). Astfel, utilizarea preparatelor vegetale de către pacienții oncologici nu este întotdeauna eficientă (Saxe și colab., 2008) și/sau sigură (Hu și colab., 2005).

Având în vedere toate aceste date se constată că preparatele vegetale sunt tot mai des utilizate de către pacientele cu cancer mamar, chiar dacă eficiența și siguranța acestora nu este întotdeauna dovedită. Potențialul dual al preparatelor vegetale în terapia cancerului mamar, dublat de încrederea crescută în eficiența utilizării acestor preparate în rândul pacientelor demonstrează necesitatea studierii în profunzime a interacțiunilor farmacodinamice dintre acestea și compușii chimioterapici convenționali. Totodată, lipsa dovezilor științifice clare asupra eficienței și siguranței utilizării unui preparat vegetal, independent sau în asociere cu o grilă specifică de tratament convențional, face ca subiectul eficienței remediilor naturale alternative să rămână deocamdată fără un consens în comunitatea științifică.

### **3. Compuși vegetali în prevenția cancerului de sân: concepte de nutrigenomică**

Tot mai multe studii recente demonstrează rolul important jucat de compușii bioactivi de origine vegetală în prevenția cancerului, nutrienții din plante fiind capabili de modularea exprimării unor gene esențiale în tumorigeneză și în evoluția bolii (Braicu și colab., 2017; Kotecha și colab., 2016). Astfel, obiceiurile alimentare influențează riscul de apariție a cancerului, multe componente ale dietei modificând procese fiziologice celulare relevante în inițierea, promovarea și progresul tumorii în organismul uman (Nicastro și colab., 2012; Turati și colab., 2015). Cancerul de sân este unul dintre tipurile de cancer a căror incidență este influențată de factori de mediu, inclusiv de nutriție și dietă (Davis, 2007).

Studiul prevenției cancerului se rialiază în jurul identificării de compuși ce ar putea avea un impact pozitiv împotriva transformării celulare în fazele inițiale ale oncogenezei (Sapienza și Issa, 2016). O serie de compuși de origine vegetală au potențialul de a se opune inițierii și promovării cancerului,

atât la nivelul celulelor inițiate, cât și prin declanșarea altor răspunsuri fiziologice ale organismului. Astfel, diverși fitoconstituenți pot induce detoxifierea carcinogenilor prin activarea unor căi metabolice specifice (Royston și Tollefsbol, 2015), dar și îmbunătățirea supravegherii imune ce duce la eliminarea celulelor transformate (Luis Espinoza și colab., 2013). În celulele inițiate, compușii de origine vegetală pot crește stabilitatea ADN, atât prin prevenirea degradării, cât și prin inducerea reparării materialului genetic (Ferguson și colab., 2004). Totodată, numeroși constituenți vegetali sunt capabili să inducă modificări epigenetice substanțiale la nivelul celulelor transformate, prin care se vor opune inițierii și promovării tumorii (Kotecha și colab., 2016).

Totuși, efectele benefice ale nutrienților în prevenția cancerului nu depind doar de compușii bioactivi în sine, ci și de predispoziția genetică a fiecărui individ. Astfel, variația din perspectiva incidenței cancerului în populații umane cu obiceiuri alimentare similare poate fi explicată tocmai din prisma particularităților genetice și epigenetice a fiecărui individ, ce influențează susceptibilitatea la acțiunea benefică a dietei (Ardekani și Jabbari, 2009). În tot acest context s-a dezvoltat în ultimii ani nutrigenomica în cancer, știința ce studiază impactul nutrienților asupra genomului celular, subliniind modul în care modificările epigenetice induse de dietă influențează tumorigeneza prin modularea exprimării genelor relevante în inițierea și promovarea cancerului.

În acest context se evidențiază necesitatea de a testa nutrienții de origine vegetală din perspectiva efectelor epigenetice induse la nivelul celulelor inițiate și de a identifica acele componente ale dietei ce ar avea un potențial rol protector împotriva inițierii, promovării și progresului cancerului în organism. Totodată, barierele biologice ce se opun efectelor anti-tumorale, cum sunt biodisponibilitatea redusă a unor nutrienți, gradul scăzut de absorbție al acestora sau concentrațiile prea mici ale compușilor activi în alimente vor necesita atenție sporită în vederea depășirii acestora.

### **CAPITOLUL III - *Calendula officinalis*: plantă medicinală cu proprietăți anti-tumorale**

[Capitolul III, într-o formă adaptată, a fost publicat ca: Cruceriu D, Balacescu O, Rakosy-Tican E, 2018. *Calendula officinalis*: potential roles in cancer treatment and palliative care. *Integrative Cancer Therapy* 17(4):1068-1078]

*Calendula officinalis* (familia *Asteraceae*), denumită popular filimică sau gălbenele, este o specie des utilizată în medicina tradițională. Diverse preparate vegetale obținute din florile și frunzele acestei specii sunt folosite popular ca anti-spasmodic și anti-inflamator, în tratarea rănilor, arsurilor minore, iritațiilor și a altor erupții cutanate (Mehta și colab., 2012). Extractele de *C. officinalis* sunt caracterizate de activități farmacologice diverse, cele mai importante proprietăți medicinale raportate în literatură fiind activitățile antiinflamatoare, antioxidantă (Frankic și colab., 2009), antibacteriană (Goyal și Mathur, 2011), antifungică (Gazim și colab., 2008), și imunostimulatoare (Varlijen, 1989). Activitatea biologică a extractelor se datorează profilului biochimic, cu precădere metaboliților secundari.

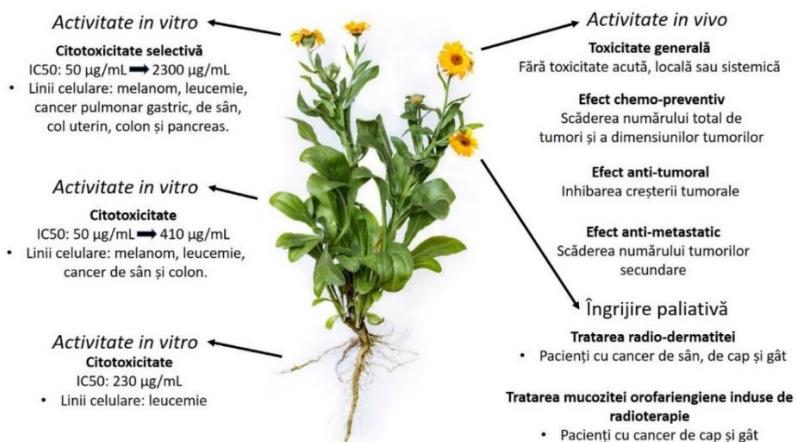
#### **1. Profilul fitochimic al speciei *C. officinalis***

Cele mai importante clase de compuși ce se găsesc în organele speciei *C. officinalis* sunt polifenolii, terpenele, cumarinele și chinonele (Ashwlayan și colab., 2018; Khalid și Da Silva, 2012). Compușii fenolici, incluzând în acest caz acizii fenolici și flavonoidele, se găsesc în cantități mari în toate organele supraterane ale acestei specii. Terpenoidele se găsesc atât în extractele obținute cu ajutorul solvenților mai puțin polari, cât și în fracția de compuși volatili ai preparatelor din *C. officinalis*, terpenele reprezentând o parte importantă a uleiurilor esențiale de origine vegetală.

Având în vedere diversitatea constituenților din preparatele vegetale obținute din *C. officinalis*, se conturează premisa conform căreia această specie ar putea avea potențial și în managementul cancerului. Polifenolii și terpenele volatile sunt clase de compuși cunoscute pentru activitatea anti-tumorală, fiind fitoconstituenți capabili să inhibe proliferarea celulară și să inducă apoptoza (Fantini și colab., 2015; Nichenametla și colab., 2006). Mai mult decât atât, trei compuși izolați direct din *C. officinalis*, luteina și două triterpene glicozilate, au fost testați pentru efectele anti-tumorale și s-au dovedit a fi citotoxici în diverse patologii tumorale.

## 2. *C. officinalis* în managementul cancerului

Efectele anti-tumorale ale extractelor de *C. officinalis* atât *in vitro*, cât și *in vivo* în modele animale au fost dovedite pentru prima dată acum mai mult de 25 de ani (Boucaud-Maitre și colab., 1988). Numeroase alte studii au reușit ulterior să completeze aceste date, diverse preparate vegetale obținute din frunzele, florile și rădăcinile acestei specii fiind caracterizate de acțiune anti-tumorală. Stadiul actual al cunoașterii din perspectiva efectelor anti-tumorale *in vitro* și *in vivo*, dar și al potențialului în îngrijirea paliativă a pacienților oncologici a preparatelor din *C. officinalis* fiind prezentate în figura 2.



**Fig. 2** Aspecte generale ale activității anti-tumorale a extractelor de *C. officinalis*. Extractele din flori: activitate *in vitro*, *in vivo* și în îngrijirea paliativă; extractele din frunze: activitate *in vitro*; extractele din rădăcini: activitate *in vitro* (tradus după Cruceriu și colab., 2018).

Extractele vegetale de *C. officinalis* s-au dovedit a fi caracterizate de activitate anti-tumorală în sisteme *in vitro*, asupra a numeroase linii celulare de cancer. Mai mult decât atât, în cazuri specifice, aceste preparate au fost și selective în acțiunea anti-tumorală. Marea majoritate a studiilor au fost efectuate pe extracte obținute din florile acestei specii, chiar dacă un studiu din 2012 sugerează că preparatul din rădăcini ar fi superior (Wegiera și colab., 2012). Preparatele obținute în apă distilată prin infuzie sau macerare sunt caracterizate de acțiune citotoxică mai redusă, chiar dacă Jimenez-Medina și colab. (2006) reușesc să crească performanțele acestui tip de

extract prin activare cu laser. Extractele obținute în metanol sunt superioare celor în apă din perspectiva acțiunii anti-tumorale exercitate asupra liniilor celulare (Miguel și colab., 2016). Din perspectiva mecanismelor de acțiune, extractele de *C. officinalis* par a avea efecte atât citotoxice cât și citostatice în cazul celulelor tumorale. Scăderea nivelurilor de exprimare a ciclinelor în urma tratamentului sugerează stoparea ciclului celular, iar activarea caspazelor ca răspuns la administrarea acestora subliniază probabilitatea inducerii apoptozei (Jimenez-Medina și colab., 2006).

Activitatea *in vivo* a extractelor obținute din florile de *C. officinalis* a fost investigată în ultimii 20 de ani din perspectiva toxicității generale, a efectelor anti-genotoxice/ chemo-preventive, a acțiunii anti-tumorale și a capacității anti-metastatice, în diferite animale model. Preparatele vegetale obținute din florile de *C. officinalis* nu induc toxicitate acută și subacută (Silva și colab., 2007) și nici sistemică sau locală (Jimenez-Medina și colab., 2006) la dozele necesare pentru tratarea patologiei tumorale. Atât extractul etanolic (Barajas-Farias și colab., 2006), cât și cel metanolic (Ali și colab., 2014) obținute din florile de *Calendula* au efecte chemo-preventive în carcinogeneza indusă chimic în animale model. Pe lângă capacitatea de prevenție a apariției cancerului, extractul de *C. officinalis* are și acțiune anti-tumorală (Jimenez-Medina și colab., 2006). Un alt extract etanolic din florile aceleiași specii a crescut durata de viață cu 43% și a inhibat metastazarea pulmonară a melanomului în șoarecii tratați (Preethi și colab., 2010).

Pe lângă acțiunea anti-tumorală a extractelor din *C. officinalis*, mai multe studii clinice recente sugerează că preparatele vegetale obținute din florile acestei specii ar putea deveni resurse relevante și în paliția pacienților oncologici cu cancer de sân, de cap sau de gât a căror grilă terapeutică include radioterapie (Pommier și colab., 2004; Sharp și colab., 2013).

Astfel, preparate vegetale obținute din organele speciei *Calendula officinalis*, au potențial în managementul cancerului, atât în prevenție și terapie, cât și în îngrijirea paliativă. Diversitatea metabolitelor secundari, cu precădere polifenoli și terpeni ce sunt caracterizați de acțiune citotoxică și citostatică asupra celulelor canceroase, fac ca extractele de *Calendula* să dețină activitate anti-tumorală, *in vitro*. Totodată, faptul că activitatea biologică se menține și în modele animale, atât ca acțiune anti-genotoxică, cât și anti-tumorală și anti-metastatică, crește potențialul utilizării acestei specii în prevenția și tratamentul cancerului.

## CAPITOLUL IV - *Solanum* spp.: specii sălbatice cu potențial nutrigenomic în cancer

Cartoful (*Solanum tuberosum*), ca specie cultivată, este una dintre cele mai importante surse vegetale de hrană pentru populația lumii, fiind situat pe locul 4 din perspectiva consumului, după grâu, orez și porumb (FAO - Organizația pentru Hrană și Agricultură a Organizației Națiunilor Unite, 2018). Astfel, *S. tuberosum* joacă un rol esențial în asigurarea accesului la hrană pentru populația lumii, cu precădere în țările subdezvoltate, având în vedere și creșterea rapidă a natalității globale (Centrul Internațional al Cartofului, 2018).

Cu toate acestea, specia *Solanum tuberosum* este susceptibilă la atacul diverșilor consumatori/ paraziți/ patogeni (insecte, nematode, fungi, bacterii, virusuri) și are rezistență scăzută la factorii abiotici de mediu, ce cauzează pierderi serioase în cultură (Haldar și colab., 2006). Cauza principală pentru care specia cultivată de cartof și-a pierdut caracterile de rezistență este intervenția umană, prin monocultură, selecția artificială cu scopul creșterii productivității și înmulțirea asexuată prin tuberculi. În acest context, comunitatea științifică și-a propus reintegrarea acelor trăsături importante, ce sunt implicate în răspunsul la diverși factori de mediu. Astfel, s-a apelat la speciile sălbatice de cartof, cum sunt *S. chacoense* și *S. bulbocastanum*, ce joacă rolul de resurse genetice în programele de ameliorare ale cartofului (De Haan și Rodriguez, 2016; Rakosy-Tican și colab., 2019).

*S. bulbocastanum* este utilizat în ameliorarea cartofului datorită rezistenței la *Phytophthora infestans* (Lokossou, 2010; Rakosy-Tican și colab., 2015), iar *S. chacoense* datorită rezistenței la gândacul de Colorado și la atacurile bacteriene (Chen și colab., 2013; Molnar și colab., 2017; Rakosy-Tican și colab., 2019). Rezistența acestor specii sălbatice de cartof la diverși patogeni se bazează în mare măsură pe constituenții fitochimici, metabolii secundari prezenți în diferite organe, cum sunt glicoalcaloizii, având efecte repelente și/ sau toxice asupra dăunătorilor (Mweetwa și colab., 2012). Fără a fi o coincidență, diverși astfel de compuși ce fac parte din profilul fitochimic al speciilor sălbatice de cartof, cum sunt solamargina (Liu și colab., 2004; Shiu și colab., 2007),  $\alpha$ -chaconina sau  $\alpha$ -solanina (Friedman, 2015), au și proprietăți anti-tumorale.

## 1. Profilul fitochimic al speciilor *S. chacoense* și *S. bulbocastanum*

Datele legate de profilul biochimic al speciilor sălbatice de *Solanum* sunt extrem de puțin prezente în literatură și sunt departe de a fi exhaustive. Cele două clase de metaboliți secundari ce caracterizează speciile de *Solanaceae* sunt polifenolii, cu precădere acizii fenolici și alcaloizii. Din perspectiva conținutului de glicocalcoizi, speciile *S. bulbocastanum* și *S. chacoense* prezintă nivele ridicare de  $\alpha$ -solanină și  $\alpha$ -chaconină la nivelul frunzelor, și cantități mari de solamargină și solasonină în tuberculi (Distl și Wink, 2009). Din perspectiva polifenolilor, acidul clorogenic reprezintă compusul ce se găsește în cea mai mare abundență în organele acestor două specii (Hale și colab., 2008; Navarre și colab., 2011).

## 2. Activitatea anti-tumorală a speciilor de *Solanum* spp.

Extracțele vegetale obținute din speciile sălbatice *S. chacoense* și *S. bulbocastanum* au fost extrem de puțin investigate din perspectiva proprietăților anti-tumorale. Doar două extracte vegetale obținute din *S. chacoense* (Mamone și colab., 2011; Mongelli și colab., 1999) au fost testate din perspectiva activității anti-tumorale, ambele preparate fiind caracterizate de activitate citotoxică. Nici un studiu nu a investigat proprietățile anti-tumorale ale unor extracte obținute din specia *S. bulbocastanum*. Chiar dacă extractele complete din aceste două specii de interes nu au fost intens studiate, alcaloizii specifici familiei *Solanaceae*,  $\alpha$ -solanina,  $\alpha$ -chaconina sau solamargina au fost analizați extensiv din prisma efectelor anti-tumorale. Toți acești compuși sau dovedit a fi citotoxici și/sau citostatici în diverse patologii tumorale, inclusiv în cancerul de sân (Friedman, 2015).

În acest context, extractele vegetale obținute din speciile sălbatice de *Solanum* ar putea fi surse relevante de constituenți bioactivi cu activitate anti-tumorală ce ar putea fi incluși în grilele terapeutice convenționale. Mai mult decât atât, datorită utilizării intense a acestor specii în programele de ameliorare, soiurile nou obținute de cartof ar putea fi caracterizate de conținuturi ridicate de astfel de nutrienți cu activitate anti-tumorală. Astfel, aceste noi plante cultivate ar putea juca un rol în prevenția apariției cancerelor prin nutriție și dietă. Totodată, având în vedere importanța cartofului ca sursă vegetală de hrană pentru populația umană, impactul noilor soiuri cu conținuturi ridicate de compuși cu proprietăți nutrigenomice în cancer ar fi unul semnificativ.



## Scopul și obiectivele lucrării

### Scopul lucrării

Evaluarea potențialul anti-tumoral a cinci extracte vegetale obținute din florile și frunzele de *C. officinalis*, frunzele de *S. bulbocastanum* și frunzele și tuberculii de *S. chacoense*, împotriva a trei linii celulare aparținând subtipurilor luminal și triplu negativ de cancer de sân.

### Obiectivele lucrării

**Obiectiv 1.** Caracterizarea biochimică a extractelor vegetale metanolice din *C. officinalis* și *S. chacoense* obținute prin tehnica asistată de ultrasunete (UAE), din prisma conținutului de polifenoli, compuși volatili și alcaloizi prin metode spectrofotometrice, HPLC și MS.

**Obiectiv 2.** Determinarea activității biologice a extractelor din *C. officinalis*, *S. chacoense* și *S. bulbocatanum* din perspectiva activității antioxidante prin metodele ABTS, FRAP și CUPRAC, și a activității anti-tumorale selective pe liniile celulare de cancer mamar MCF7, MDA-MB-231 și HS578T comparativ cu linia celulară sănătoasă HUVEC, prin metoda MTT.

**Obiectiv 3.** Identificarea unor mecanisme moleculare de acțiune a extractelor din *C. officinalis*, *S. chacoense* și *S. bulbocastanum* pe linia celulară MCF7, pe baza evaluării nivelelor de exprimare genică a 14 gene relevante în apoptoză și proliferare, prin tehnica RT-qPCR.

## CAPITOLUL V - Materiale și metode

### 1. Producerea extractelor vegetale

#### 2.1. Material vegetal și condiții de cultură

Plante de *C. officinalis* au fost obținute pornind de la semințe germinate în sol, și cultură ulterioară *ex vitro*, în condiții controlate de laborator. Autentificarea speciei a fost efectuată în ierbarul Universității “Babeș-Bolyai”, România (CL Herbarium; voucher de autentificare specimen 668431). Frunzele și florile plantelor au fost uscate la întuneric și au fost mojarate sub formă de pudră, în vederea obținerii extractelor vegetale.

Semințele de *Solanum chacoense* Bitt., accesiunea PI 458310 provin de la Sistemul Național de Germoplasmă Vegetală al Statelor Unite ale Americii (NPGS – *National Plant Germoplasm System*, Sturgeon Bay, WI, USA), iar plantele aparținând speciei *S. bulbocastanum*, accesiunea GLKS-31741 provin de la Institutul pentru Genetică Vegetală și Cercetare a Plantelor Cultivate, Germania [*Gross Lüsewitz Potato Collections* (GLKS) of the IPK Gene Bank, Leibniz—*Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research*, Germany]. Cele două specii au fost cultivate *in vitro*, în condiții de laborator optimizate pentru speciile de cartof. Ulterior, explantele au fost aclimatizate *ex vitro* în sol, fiind cultivate în condiții controlate de laborator. Materialul vegetal, constând în frunze provenite de la ambele specii și tuberculi recoltați de la specia *S. chacoense* a fost uscat la întuneric și mojarat sub formă de pudră, în vederea obținerii extractelor vegetale.

#### 2.2. Producerea extractelor vegetale prin tehnica ultrasonicării

Pe baza materialului vegetal recoltat de la cele trei specii incluse în studiu, au fost preparate cinci extracte vegetale: *C. officinalis* – flori; *C. officinalis* – frunze; *S. bulbocastanum* – frunze; *S. chacoense* – frunze; *S. chacoense* – tuberculi. Indiferent de materialul vegetal de la care s-a pornit, protocolul de obținere a extractelor a fost același, fiind bazat pe tehnica ultrasonicării, în metanol 70%. Materialul vegetal uscat (5 g) recoltat de la fiecare dintre cele trei specii a fost macerat în metanol 70% (50 mL) și ultrasonicat în trei cicluri succesive, cu un sonicator Sonics Vibra-cell (VC750, Sonics). Suspensia obținută a fost lăsată la macerat pentru alte 24 h, la temperatura camerei, la întuneric. Ulterior, omogenatul a fost centrifugat, iar supernatantul ce conținea compușii vegetali difuzați în solvent a fost colectat și filtrat. Solventul din acest extract metanolic crud a fost evaporat la presiune redusă,

la 40°C, într-un evaporator rotativ cu vid (Laborota 4000 Efficient, Heidolph Instruments GmbH), până la obținerea unei pudre. Jumătate din pudra obținută pentru fiecare extract a fost omogenizată în dimetil sulfoxid 100% (DMSO) pentru obținerea preparatelor de testat pe culturi celulare *in vitro*, iar cealaltă jumătate a fost redizolvată în metanol 70% în vederea determinării profilului biochimic al extractelor.

### **3. Analiza profilului fitochimic al extractelor**

#### *3.1. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici și a alcaloizilor prin HPLC-PDA/ESI-MS*

Analiza HPLC-PDA a celor patru extracte de interes a fost efectuată pe un aparat Agilent 1200, cu un detector PDA (DAD) de tip SPD-M20 UV-VIS. Faza mobilă a constat în: solvent A – apă bidistilată și 0,1% acid acetic/acetonitril (99/1) v/v; Solvent B – acetonitril și acid acetic 0,1%. Cromatogramele au fost monitorizate la 340 nm.

Pentru analiza spectrometrică de masă a fost utilizat un spectrometru de masă unic, cvadruplu de tip 6110 (Agilent Technologies), cuplat cu un ionizator de tip ESI. Datele experimentale au fost achiziționate în modul de scanare complet (full scan), în intervalul 280-1000 m/z. Identificarea compușilor și atribuirea vârfurilor (peaks) corespondente pe cromatograme s-a efectuat pe baza timpului de retenție (Rt), a spectrului de absorbție în UV-VIS și a spectrului de masă specifice fiecărui compus din extractele vegetale analizate, prin comparația cu o serie de standarde comerciale.

#### *3.2. Identificarea și cuantificarea relativă a compușilor volatili prin ITEX/GC-MS*

Compușii volatili au fost extrași din faza gazoasă (evaporată) a extractelor cu ajutorul unui autosampler de tip Combi PAL AOC-5000 (CTC Analytics) dotat cu o seringă ITEX-II (ITEX-2TrapTXTA, Tenax TA 80/100 mesh) și propulsați direct în GC. Analiza de GC-MS a fost efectuată pe un spectrometru de masă cuplat cu cromatografie de gaze de tip GCMS QP-2010 (Shimadzu Sci. Instruments). Gazul utilizat pentru crearea curentului de gaz cu rol în transportul compușilor volatili a fost heliul, cu un debit de 1 mL/min, într-un raport de 1:20. Detecția în MS a fost efectuată pe un spectrometru cvadruplu. Datele experimentale au fost achiziționate în modul de scanare complet (full scan), în intervalul 40-450 m/z.

Identificarea compușilor volatili a fost făcută prin compararea rezultatelor obținute pentru fiecare compus cu spectrele de masă conținute de librăriile disponibile on-line (NIST27 și NIST147), luând în considerare o similaritate de cel puțin 85%. Totodată, timpii de retenție obținuți pentru fiecare compus au fost comparați cu indicii de retenție din bazele de date [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com) și [www.flavornet.org](http://www.flavornet.org). Cuantificarea relativă a fiecărui compus volatil identificat a fost estimată ca fracția reprezentată de suprafața aferentă compusului în cauză din suprafața totală a cromatogramei (TIC – *Total Ion Chromatograms area* – 100%).

#### **4. Determinarea activității biologice a extractelor**

##### *4.1. Liniile celulare și condiții de cultură*

În cadrul acestui studiu au fost utilizate patru linii celulare umane: MCF7, MDA-MB-231, HS578T și HUVEC. Toate liniile celulare au fost obținute de la Colecția Europeană de Culturi Celulare Autentificate (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*). Celulele MCF7 au fost crescute în mediu MEM, linia celulară MDA-MB-231 în mediu RPMI-1640, linia HS578T în mediu DMEM, iar celulele HUVEC în mediu EGM. Toate liniile celulare au fost menținute la 37°C, într-o atmosferă umidificată (90%) ce conținea 5% CO<sub>2</sub>, în incubator.

##### *4.2. Determinarea activității anti-tumorale a extractelor prin testul MTT*

Activitatea anti-tumorală a celor cinci extracte a fost determinată prin testul MTT (Sigma-Aldrich) pe liniile celulare MCF7, MDA-MB-231 și HS578T de cancer de sân și pe linia HUVEC de celule endoteliale normale, conform protocolului producătorului. Pe scurt,  $2 \times 10^4$  celule/ godeu au fost însămânțate în plăci de 96 de godeuri. Tratamentul a fost adăugat după 24h, în nouă concentrații succesive (50-1000 μg/ml). După 48h de incubare a celulelor cu extractele vegetale în condiții de cultură celulară, supernatantul a fost eliminat și soluția de MTT a fost adăugată în cantitate de 100 μL/ godeu. După o incubare de 1h, la întuneric, la 37°C, soluția de MTT a fost înlocuită cu 150 μL DMSO 100% (Carl Roth GmbH) pentru solubilizarea formazanului, iar absorbanța probelor a fost măsurată la 570 nm (Synergy HTX, BioTek).

Viabilitatea celulară a fost calculată ca fracția de celule viabile în probele tratate comparativ cu celulele control netratate, pe baza absorbanțelor obținute. Valorile IC<sub>50</sub> pentru fiecare extract, pe fiecare linie celulară au fost

calculate în software-ul GraphPad Prism Versiunea 5 (GraphPad Software). Selectivitatea extractelor în activitatea anti-tumorală a fost determinată prin calcularea coeficienților de selectivitate specifici pentru fiecare linie celulară, prin raportarea valorilor  $IC_{50}$  a fiecărui extract pe linia HUVEC normală la valorile  $IC_{50}$  a fiecărui extract pe fiecare linie celulară de cancer de sân.

#### 4.3. Determinarea efectelor moleculare ale extractelor prin RT-qPCR

Efectele moleculare ale celor cinci extracte obținute din materialul vegetal recoltat de la *C. officinalis*, *S. chacoense* și *S. bulbocastanum* au fost determinate pe linia celulară MCF7 prin cuantificarea nivelelor de exprimare a 14 gene considerate de interes, prin RT-qPCR. Cele 14 gene evaluate (*BCL2*, *BAX*, *BID*, *BBC3*, *PMAIP*, *TP53*, *TP53INP1*, *CASP3*, *CASP7*, *CCND1*, *NFkB*, *STAT3*, *ZMAT3* și *DRAM1*) codifică proteine extrem de relevante în procesele de proliferare celulară sau apoptoză, fiind considerate în marea lor majoritate markeri moleculari specifici acestor procese în cancer.

Din perspectiva designului experimental, celule aparținând liniei celulare MCF7 au fost însămânțate în plăci cu 12 godeuri, la o densitate de  $2 \times 10^5$  celule/godeu. După 24h de la însămânțare, celulele au fost tratate cu fiecare dintre cele cinci extracte la concentrația corespondentă valorii  $IC_{50}$ , în duplicate tehnice. După 48h de la administrarea tratamentului, celulele au fost lizate cu soluția de liză TriReagent (Sigma-Aldrich), iar ARN-ul total a fost extras prin tehnica clasică cu fenol: cloroform. Cantitatea și calitatea ARN-ului a fost evaluată cu ajutorul nanodropului (NanoDrop 1000, ThermoScientific) și a bioanalizorului (Agilent Technologies). Sinteza de ADN complementar, pornind de la 500 ng de ARN total din fiecare probă, a fost efectuată cu ajutorul kitului de revers-transcriere RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (#1622, ThermoScientific). Evaluarea nivelelor de exprimare ale genelor de interes a fost efectuată cu ajutorul RT-qPCR în sistemul TaqMan, cu ajutorul kitului LightCycler TaqMan Master (Roche), pe un aparat de qPCR de tip LightCycler 480 (Roche). Nivelul relativ de exprimare al genelor de interes a fost calculat conform metodei  $\Delta\Delta Ct$  (Livak și Schmittgen, 2001).

## CAPITOLUL VI – Rezultate

[Părți din Capitolele V, VI și VII într-o formă adaptată, au fost publicate ca: 1. Cruceriu D, Diaconeasa Z, Socaci S, Socaciu C, Rakosy-Tican E, Balacescu O, 2020. Biochemical profile, selective cytotoxicity and molecular effects of *Calendula officinalis* extracts on breast cancer cell lines. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 48(1):24-39; 2. Cruceriu D, Diaconeasa Z, Socaci S, Socaciu C, Balacescu O, Rakosy-Tican E, 2020. Extracts of the wild potato species *Solanum chacoense* on breast cancer cells: biochemical characterization, in vitro selective cytotoxicity and molecular effects. *Nutrition and Cancer online first*: <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1761407>]

### 1. Profilul fitochimic al extractelor vegetale

Profilul fitochimic al extractelor de *C. officinalis* și *S. chacoense* a fost evaluat din perspectiva conținutului de polifenoli și compuși volatili, datele din literatura de specialitate sugerând atât prezența acestora în compoziția biochimică a acestor specii (Ashwlayan și colab., 2018; Caruso și colab., 2013), cât și potențialul anti-tumoral al unor astfel de constituenți (Dhifi și colab., 2016). Totodată, în extractele de *S. chacoense* a fost evaluată și prezența alcaloizilor, compuși cu activitate citotoxică recunoscută (Friedman, 2015).

#### 1.1. Profilul fitochimic al extractelor de *C. officinalis*

##### 1.1.1. Conținutul de compuși fenolici al extractelor de *C. officinalis*

Din rândul constituenților fenolici, 14 compuși au fost identificați individual în extractul obținut din florile de *C. officinalis*, pe când în extractul din frunze s-au găsit doar 12 astfel de compuși (Tabel 1). Ambele extracte au fost dominate de flavonoli, incluzând multipli derivați ai quercetinei și izoramnetinei. Pe lângă flavonoli, ambele extracte au fost caracterizate de prezența acizilor fenolici, incluzând acizii hidroxibenzoici și hidroxicinamici și cumarine (Tabel 1).

Constituenții majori identificați în extractul obținut din florile de *C. officinalis* au fost acidul clorogenic din rândul acizilor fenolici, și 3-O-glucozil-ramnozid-glucozid-quercetina, 3-O-galactozid-izoramnetina, 3-O-glucozil-ramnozid-izoramnetina și 7-O-ramnozid-izoramnetina din fracția flavonolilor. Cei mai importanți constituenți polifenolici identificați în

extractul obținut din frunzele acestei specii au fost acidul dihidroxibenzoic, izoquercetina și 3-O-glucozil-ramnozid-izoramnetina (Tabel 1).

Comparând profilul polifenolic al celor două extracte de *C. officinalis*, mai multe diferențe relevante trebuie subliniate. Extractul obținut din florile de *C. officinalis* este caracterizat de cantități mai mari de polifenoli comparativ cu cel din frunzele aceleiași specii. Singura clasă de compuși fenolici ce este prezentă în cantitate mai mare în extractul de frunze este clasa acizilor hidroxibenzoici, concentrația acestora fiind cu 57% mai mare în acest extract. În schimb, acizii hidroxicinamici au o concentrație de două ori mai mare în extractul din florile de *C. officinalis*. Și din perspectiva conținutului de flavonoli, extractul de flori s-a dovedit a fi superior, acesta conținând cu 188% mai mulți compuși din această subclasă. Mai mult decât atât, doi flavonoli, izoramnetina și 3-O-glucozid-izoramnetina au fost identificați doar în extractul obținut din florile de *C. officinalis*. Nu în ultimul rând, 7-O-glucozid-scopoletina, compus ce face parte din clasa cumarinelor, a avut o concentrație de peste trei ori mai mare în extractul din flori comparativ cu cel din frunzele de *C. officinalis* (diferență de 244%).

#### 1.1.2. Conținutul de compuși volatili al extractelor de *C. officinalis*

Un număr de 24 de compuși volatili au fost identificați în extractul obținut din florile de *C. officinalis*, în timp ce extractul din frunzele aceleiași specii a conținut doar 16 astfel de compuși (Tabel 2). Constituenții volatili identificați în extracte fac parte din mai multe clase importante de metaboliți secundari, cum ar fi monoterpenele, sesquiterpenele, cetonele sau aldehidele volatile.

Comparând profilul biochimic volatil al celor două extracte de *C. officinalis*, o serie de diferențe relevante ies în evidență. Abundența relativă a sesquiterpenelor în extractul de flori (38,07%) este mult mai mare decât în extractul de frunze (4,65%). Mai mulți compuși aparținând clasei aldehydilor volatili au fost identificați doar în extractul de flori (Tabel 2). Coroborând aceste date, extractul din florile de *C. officinalis* poate fi considerat superior din perspectiva diversității compușilor volatili prezenți, în comparație cu cel obținut din frunze.

**Tabel 1** Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici din extractele obținute din florile și frunzele de *C. officinalis*.  $R_t$  – timpul de retenție;  $[M+H]^+$ - ioni moleculari protonați; UV  $\lambda_{max}$  – lungimea de undă cu absorbantă maximă

Clasă de compuși	Nr. vârf	$R_t$ (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	UV $\lambda_{max}$ (nm)	Compus identificat predicționat	Concentrație ( $\mu\text{g/mL}$ extract)	
						<i>C. officinalis</i> flori	<i>C. officinalis</i> frunze
Acizi hidroxi-benzoici (AB)	1	3,05	<b>156, 139</b>	240	Acid dihidroxibenzoic	366,89	576,00
<b>TOTAL AB<sup>1</sup></b>						<b>366,89</b>	<b>576,00</b>
Acizi hidroxicinamici (AHB)	2	9,87	<b>355</b>	320	Acid 3-cafeilchinic (Acid neoclorogenic)	458,61	321,11
	3	11,85	<b>355</b>	320	Acid 5-Cafeilchinic (Acid clorogenic)	1261,26	386,57
	11	17,00	<b>517</b>	330	Acid 3,5-Dicafeilchinic (Acid izoclorogenic A)	842,42	365,29
<b>TOTAL AHB<sup>2</sup></b>						<b>2562,29</b>	<b>1072,97</b>
Flavonoli (FL)	4	13,93	<b>757,303</b>	360, 260	3-O-ramnozid-ramnozid-glucozid-Q	401,66	103,05
	5	14,68	<b>773, 303</b>	355, 255	3-O-glucozil-ramnozid-glucozid-Q	1165,46	423,18
	6	15,34	<b>611, 303</b>	360, 250	3-O-rutinozid-Q (Rutină)	374,52	402,98
	7	15,77	<b>478, 317</b>	350, 250	3-O-galactozid-I	1273,79	106,05
	8	16,00	<b>465, 303</b>	361, 251	3-O-glucozid-Q (Izoquercetină)	243,65	591,78
	9	16,15	<b>478, 317</b>	350, 250	3-O-glucozid-I	634,70	nd
	10	16,53	<b>624, 317</b>	350, 260	3-O-glucozil-ramnozid-I	1866,82	767,72
	12	17,31	<b>479, 317</b>	362, 352	7-O-ramnozid-I	1727,26	375,56
	14	22,92	<b>317</b>		Izoramnetină	300,53	Nd
	<b>TOTAL FL<sup>3</sup></b>						<b>8728,98</b>
Cumarine (CM)	13	18,07	<b>355, 193</b>	358, 261	7-O-glucozid-S	740,59	215,22
<b>TOTAL CM<sup>3</sup></b>						<b>740,59</b>	<b>215,22</b>



**Table 2.** Identificarea și cuantificarea relativă a compușilor volatili din extractele obținute din frunzele și florile de *C. officinalis*. Rt – timpul de retenție; Abundența relativă – procentul relativ (%) din aria totală a vârfurilor cromatografice.

Clasă de compuși	Nr. vârf	R <sub>t</sub> (min)	Compus identificat predicționat	Abundență relativă (%)	
				<i>C. officinalis</i> flori	<i>C. officinalis</i> frunze
<b>(Mono-) Terpene (MT)</b>	8	14,30	p-Cimen	0,35	0,96
	9	14,45	Limonen	0,32	0,38
	15	17,80	Cosmen	nd	0,64
	16	18,20	Alloocimen	0,80	2,60
<b>TOTAL MT</b>				<b>1,47</b>	<b>4,58</b>
<b>(Sesqui-) Terpene (ST)</b>	23	24,60	Alfa-Cubeben	0,59	nd
	24	25,60	Copaen	1,01	nd
	25	29,50	Gamma-Muurolen	3,15	0,73
	26	30,40	Alfa-Muurolen	8,81	3,92
	27	31,10	Delta-Cadinen	24,51	nd
<b>TOTAL ST</b>				<b>38,07</b>	<b>4,65</b>
<b>Aldehyde</b>	5	12,15	Benzaldehidă	3,37	1,60
	10	15,00	Benzenacetaldehidă	0,62	0,26
	7	13,60	Octanal	0,28	nd
	14	17,10	Nonanal	0,42	nd
	20	20,30	Decanal	0,22	nd
<b>TOTAL</b>				<b>4,91</b>	<b>1,86</b>
<b>Cetone</b>	11	15,70	Acetofenonă	8,89	7,08
	18	19,00	Propiofenonă	nd	0,20
	21	22,70	2-Cloroacetofenonă	0,87	nd
<b>TOTAL KT</b>				<b>9,76</b>	<b>7,28</b>
<b>Esteri</b>	2	5,90	Metil izovalerat	0,33	nd
	3	7,05	Butil acetat	30,45	69,91
	4	10,80	Metil hexanoat	0,10	nd
	13	16,70	Metil benzoat	4,64	3,60
	19	19,90	Metil salicilat	0,31	nd
	22	23,00	Acid .alpha.-oxo-, metil ester benzenacetic	1,12	nd
<b>TOTAL</b>				<b>36,95</b>	<b>73,51</b>
<b>Altele</b>	1	4,80	Dimetil acetal izobutilaldehidă	0,37	0,67
	6	12,70	1,1-Dimetoxihexan	7,24	6,08
	12	16,50	2-Metil-1-fenilpropen	nd	0,56
	17	18,70	Acid benzoic	1,22	0,83
<b>TOTAL</b>				<b>8,83</b>	<b>8,14</b>

nd – nedetectat

## 2.1. Profilul fitochimic al extractelor de *S. chacoense*

### 2.1.1. Conținutul de compuși fenolici al extractelor de *S. chacoense*

Din perspectiva claselor de polifenoli identificate în extractele de *S. chacoense*, acizii fenolici s-au dovedit a fi constituenții majoritari. Acizii fenolici individuali, identificați în cele două extracte de *S. chacoense* fac parte din clasele de acizi hidroxibenzoici și hidroxicinamici. Patru acizi fenolici au fost identificați în extractul de frunze, la care s-au adăugat alți doi acizi fenolici (acidul cafeic și ferulic) în extractul obținut din tuberculi (Tabel 3).

Cantitățile de acizi fenolici au fost mai mari în extractul din tuberculi decât în cel din frunzele de *S. chacoense*, cu 67% în cazul acizilor hidroxibenzoici și cu 77% în cel al acizilor hidroxicinamici (Tabel 3). Astfel, extractul obținut din tuberculii de *S. chacoense* poate fi considerat superior celui din frunzele aceleiași specii, atât din perspectiva diversității compușilor fenolici, cât și a concentrației acestora.

### 2.1.2. Conținutul de alcaloizi al extractelor de *S. chacoense*

Patru alcaloizi specifici familiei *Solanaceae* au fost identificați în concentrații mari în extractul obținut din frunzele de *S. chacoense* (Tabel 4). Acești compuși nu au fost prezenți în cantități semnificative în extractul din tuberculii aceleiași specii. Din perspectiva claselor de compuși din care aceștia fac parte, alcaloizii identificați sunt atât solasodine (derivați ai solasodinei) cât și solanidane (derivați ai solanidinei).

### 2.1.3. Conținutul de compuși volatili al extractelor de *S. chacoense*

Un număr de 18 compuși volatili au fost identificați în extractul de frunze, în timp ce extractul din tuberculii de *S. chacoense* a conținut 21 de astfel de compuși. Acești constituenți fac parte, în marea lor majoritate din clasele de terpeni, aldehide, alcooli grași, esteri și cetone (Tabel 5).

Terpenele, aldehidele și cetonele identificate au avut abundențe relative mai mari în extractul de tuberculi (5,15%, 20,79% și 21,47%), în comparație cu cel din frunzele speciei *S. chacoense* (2,01%, 6,06% și 12,35%). Compuși ca limonenul, octanalul, nonanalul și mai multe acetofenone au avut abundențe relative mult mai mari în extractul din tuberculi, iar constituenții eucaliptol\*\*, decanal, dodecanal și alcooli grași au fost prezenți doar în acest extract. Singura clasă de compuși a cărei abundență relativă a fost mai mare în extractul din frunze a fost clasa esterilor, butil acetatul reprezentând 53,7% din totalul compușilor volatili identificați în acest extract.

**Table 3** Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici din extractele obținute din frunzele și tuberculii de *S. chacoense*.  $R_t$  – timpul de retenție;  $[M+H]^+$ - ioni moleculari protonați; UV  $\lambda_{max}$  – lungimea de undă cu absorbanta maximă.

Clasă de compuși	Nr. vârf	$R_t$ (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	UV $\lambda_{max}$ (nm)	Compus identificat predicționat	Concentrație ( $\mu\text{g/mL}$ extract)	
						<i>S. chacoense</i> frunze	<i>S. chacoense</i> tuberculi
Acizi hidroxi-benzoici (AB)	1	3,05	<b>156</b> , 139	240	Acid dihidroxibenzoic	91,20	152,48
<b>TOTAL BA<sup>1</sup></b>						<b>91,20</b>	<b>152,48</b>
	2	10,66	<b>355</b>	320	Acid 3-cafeilchinic (Acid neoclorogenic)	183,74	69,06
Acizi hidroxicinamici (AHB)	3	11,35	<b>355</b>	320	Acid 4-cafeilchinic (Acid criptoclorogenic)	214,60	77,56
	4	11,85	<b>355</b>	320	Acid 5-Cafeilchinic (Acid clorogenic)	271,10	242,32
	5	13,57	<b>181</b>	320	Acid cafeic	nd	431,25
	8	16,88	<b>195</b>	322	Acid ferulic	nd	364,92
<b>TOTAL HBA<sup>1</sup></b>						<b>669,43</b>	<b>1185,11</b>

<sup>1</sup> exprimat ca  $\mu\text{g}$  acid clorogenic /mL          nd-nedetecat

**Table 4** Identificarea și cuantificarea alcaloizilor din extractele obținute din frunzele și tuberculii de *S. chacoense*.  $R_t$  – timpul de retenție;  $[M+H]^+$ - ioni moleculari protonați; UV  $\lambda_{max}$  – lungimea de undă cu absorbanta maximă.

Clasă de compuși	Nr. vârf	$R_t$ (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	UV $\lambda_{max}$ (nm)	Compus identificat predicționat	Concentrație ( $\mu\text{g/mL}$ extract)	
						<i>S. chacoense</i> frunze	<i>S. chacoense</i> tuberculi
Solasodine	6	14,77	<b>414</b>	350, 290	Solasodină	331,40	nd
	7	16,02	<b>868</b>	370,320,230	Solamargină	451,39	nd
Solanidane	9	17,29	<b>868</b>	370,320,230	$\alpha$ -Solanină	573,33	nd
	10	19,56	<b>852</b>	420,310,240	$\alpha$ -Chaconină	657,23	nd
<b>TOTAL Alcaloizi<sup>1</sup></b>						<b>2013,37</b>	-

<sup>1</sup> exprimat ca  $\mu\text{g}$  acid clorogenic /mL          nd-nedetecat

**Tabel 5** Identificarea și cuantificarea relativă a compușilor volatili din extractele obținute din frunzele și tuberculii de *S. chacoense*. R<sub>t</sub> – timpul de retenție; Abundență relativă – procentul relativ (%) din aria totală a vârfurilor cromatografice.

Clasă de compuși	Nr. vârf	R <sub>t</sub> (min)	Compus identificat predicționat	Abundență relativă (%)	
				<i>S. chacoense</i> frunze	<i>S. chacoense</i> tuberculii
Terpene	11	14,486	Limonen	1,13	4,09
	12	14,591	Eucaliptol**	nd	1,06
	25	31,087	delta-cadinen	0,88	nd
<b>TOTAL</b>				<b>2,01</b>	<b>5,15</b>
Aldehide	4	11,997	2-Heptenal, (E)-	nd	2,26
	5	12,150	Benzaldehidă	4,67	9,39
	10	13,639	Octanal	0,35	1,52
	13	15,029	Benzeneacetaldehidă	0,58	1,19
Aldehide	14	15,510	2-Octenal, (E)-	nd	1,73
	18	17,082	Nonanal	0,46	1,50
	20	20,336	Decanal	nd	1,10
	23	26,713	Dodecanal	nd	2,10
<b>TOTAL</b>				<b>6,06</b>	<b>20,79</b>
Alcooli grași	16	15,940	1-Octanol	nd	2,28
	24	29,460	1-Dodecanol	nd	1,73
<b>TOTAL</b>				<b>nd</b>	<b>4,01</b>
Esteri	2	7,048	Butil acetat	53,7	8,04
	3	10,830	Metil hexanoat	0,25	nd
	17	16,727	Metil benzoat	6,89	9,08
	22	23,002	Acid .alpha.-oxo-, metil ester benzenacetic,	1,06	3,59
	26	31,216	Metil laurat**	0,49	nd
<b>TOTAL</b>				<b>62,39</b>	<b>20,71</b>
Cetone	15	15,743	Acetofenonă	10,91	17,01
	21	22,692	2-Chloroacetofenonă	1,44	4,46
<b>TOTAL</b>				<b>12,35</b>	<b>21,47</b>
Altele	1	4,796	Dimetil acetal izobutilaldehidă	1,45	nd
	6	12,291	N-Metilanilină	0,71	nd
	7	12,700	Dimetil acetal hexanal	9,55	4,12
	8	12,754	Fenol	nd	5,38
	9	13,120	2-Pentilfuran	nd	6,49
	19	18,864	Acid benzoic	3,24	11,90
	27	31,394	Anhidridă fenilmaleică	2,23	nd
<b>TOTAL</b>				<b>17,18</b>	<b>27,89</b>

\*\* - similaritate mai mică de 85% cu spectrele de masă din bazele de date NIST27 și NIST147

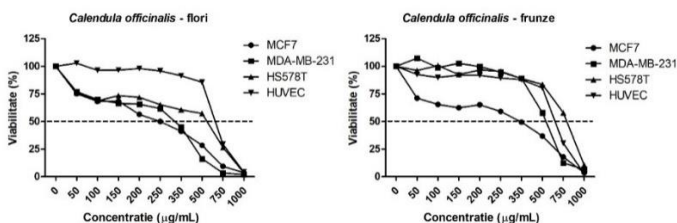
nd –  
Nedetectat

### 3. Activitatea anti-tumorală a extractelor vegetale în cancerul de sân

#### 3.1. Activitatea anti-tumorală a extractelor de *C. officinalis*

Ambele extracte obținute din florile și frunzele de *C. officinalis* au fost caracterizate de activitate anti-tumorală în dependență de doză (Fig. 3). Prin compararea valorilor IC<sub>50</sub> obținute pentru liniile celulare de cancer de sân cu cele caracteristice liniei celulare sănătoase HUVEC, ambele extracte s-au dovedit a fi selective în activitatea anti-tumorală (Tabel 6).

Ambele extracte au avut cel mai puternic efect anti-tumoral pe linia celulară de cancer de sân luminal MCF7. Totuși, extractele pot fi considerate la nivel general selective în activitatea anti-tumorală, chiar dacă coeficientul de selectivitate al extractului de frunze pe linia HS578T este sub 1. Comparând rezultatele pentru cele două extracte obținute din *C. officinalis*, cel din flori a fost caracterizat de activitate anti-tumorală mai puternică pe toate cele trei linii celulare de cancer de sân, comparativ cu cel din frunze.



**Fig. 3** Activitatea anti-tumorală a extractelor obținute din florile și frunzele de *C. officinalis*, la 48h de la administrare.

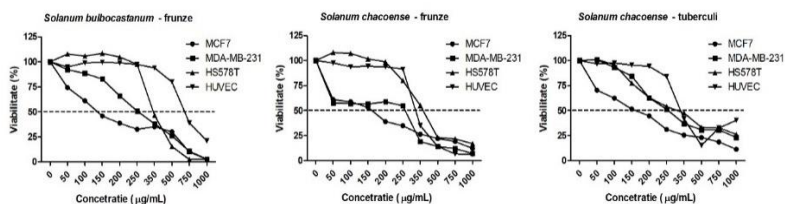
**Tabel 6** Concentrațiile IC<sub>50</sub> și coeficienții de selectivitate în acțiunea anti-tumorală a extractelor obținute din florile și frunzele de *C. officinalis* la 48h de la administrarea tratamentului.

Extract vegetal		Linie celulară			
		MCF7	MDA-MB-231	HS578T	HUVEC
<i>C. officinalis</i> flori	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	213,4***	386,9***	520,5***	651,4***
	Coeficient de selectivitate	3,1	1,7	1,3	-
<i>C. officinalis</i> frunze	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	252,4***	519,7*	749,4***	631,0***
	Coeficient de selectivitate	2,4	1,2	0,9	-

### 3.2. Activitatea anti-tumorală a extractelor din speciile de *Solanum spp.*

Extracte obținute din speciile *S. bulbocastanum* și *S. chacoense* au fost caracterizate de activitate anti-tumorală în dependență de doză (Fig. 4).

Linia celulară de cancer de sân luminal MCF7 s-a dovedit a fi cea mai sensibilă la acțiunea anti-tumorală a celor trei extracte (Tabel 7). Astfel, această linie celulară a avut o sensibilitate de peste două ori mai mare la extractele obținute din specia *S. chacoense* și de cinci ori mai mare la extractul din frunzele de *S. bulbocastanum*, în comparație cu linia celulară HUVEC. Liniiile aparținând subtipului molecular triplu negativ au fost mai rezistente la acțiunea extractelor obținute din speciile de *Solanum*.



**Fig. 4** Activitatea anti-tumorală a extractelor obținute din frunzele de *S. bulbocastanum* și din frunzele și tuberculi de *S. chacoense*, la 48h de la administrare.

**Tabel 7** Concentrațiile IC<sub>50</sub> și coeficienții de selectivitate în acțiunea anti-tumorală a extractelor obținute din frunzele de *S. bulbocastanum* și frunzele și tuberculi de *S. chacoense*, la 48h de la administrarea tratamentului.

		Linie celulară			
Extract vegetal		MCF7	MDA-MB-231	HS578T	HUVEC
<i>S. bulbocastanum</i> frunze	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	139,1***	273,2***	351,6***	689,9***
	Coeficient de selectivitate	5,0	2,5	2,0	-
<i>S. chacoense</i> frunze	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	132,9***	310,4**	390,7***	328,8***
	Coeficient de selectivitate	2,5	1,1	0,9	-
<i>S. chacoense</i> tuberculi	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	143,2**	203,1***	350,0***	335,9***
	Coeficient de selectivitate	2,4	1,7	1,0	-

Dintre cele trei extracte testate, cel produs din frunzele de *S. bulbocastanum* a fost cel mai eficient din perspectiva acțiunii anti-tumorale. Chiar dacă, empiric, concentrațiile IC<sub>50</sub> a celor trei extracte pentru fiecare dintre cele trei linii celulare canceroase în parte sunt relativ egale, extractul din specia *S. bulbocastanum* se diferențiază prin toxicitatea mult mai scăzută asupra liniei celulare sănătoase de celule endoteliale HUVEC (Tabel 7). Între extractele de *S. chacoense*, extractul obținut din tuberculii a fost superior celui obținut din frunze, cu coeficienți de selectivitate peste 1.5 în cazul a două linii celulare (MCF7 și MDA-MB-231).

#### **4. Efectele moleculare ale extractelor vegetale în cancerul de sân**

##### *4.1. Efectele moleculare induse de extractele de *C. officinalis**

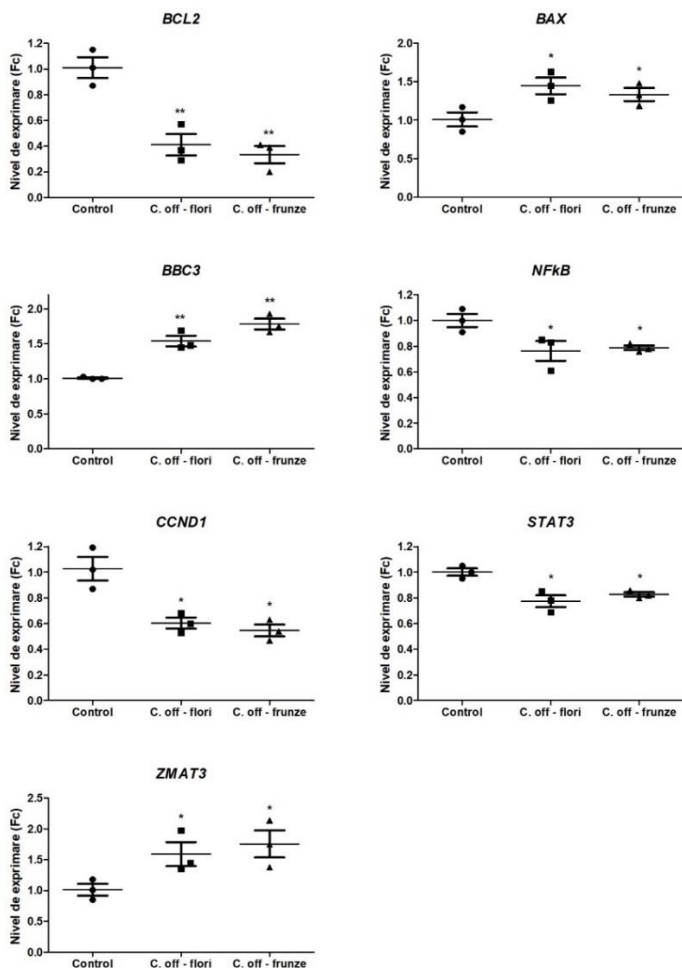
Cele două extracte obținute din frunzele și florile de *C. officinalis* au indus efecte moleculare similare (Fig. 5). Astfel, genele *CCND1*, *NFκB* și *STAT3*, ce codifică proteine ce stimulează progresul ciclului celular și proliferarea, au fost subexprimate semnificativ în celulele tratate cu ambele extracte din *C. officinalis*. De asemenea, nivelele de exprimare genică a *BCL2*, una dintre cele mai relevante gene anti-apoptotice implicată în mecanismul intrinsec de inducere a apoptozei, au fost scăzute în probele tratate cu ambele extracte. Pe de cealaltă parte, *BAX* și *BBC3*, gene pro-apoptotice implicate în același mecanism intrinsec de inducere a apoptozei ca și *BCL2*, au fost supraexprimate ca răspuns la administrarea celor două extracte. Totodată, nivelele de exprimare a genei *ZMAT3* implicată în mai multe mecanisme ce promovează moartea celulară programată, au fost crescute în celulele MCF7 tratate cu extractele de *C. officinalis*.

##### *4.2. Efectele moleculare induse de extractele din speciile de *Solanum spp**

Extractul obținut din frunzele speciei *S. bulbocastanum* a indus modularea a șase gene dintre cele 14 considerate de interes. Astfel atât gena anti-apoptotică *BCL2*, cât și genele *STAT3* și *CCND1* implicate în proliferarea celulară au fost subexprimate în celulele tratate cu acest extract. Pe de cealaltă parte, genele pro-apoptotice *BAX* și *BBC3*, dar și gena *ZMAT3* au avut nivele de exprimare crescute ca răspuns la administrarea extractului din frunzele de *S. bulbocastanum* (Fig. 6).

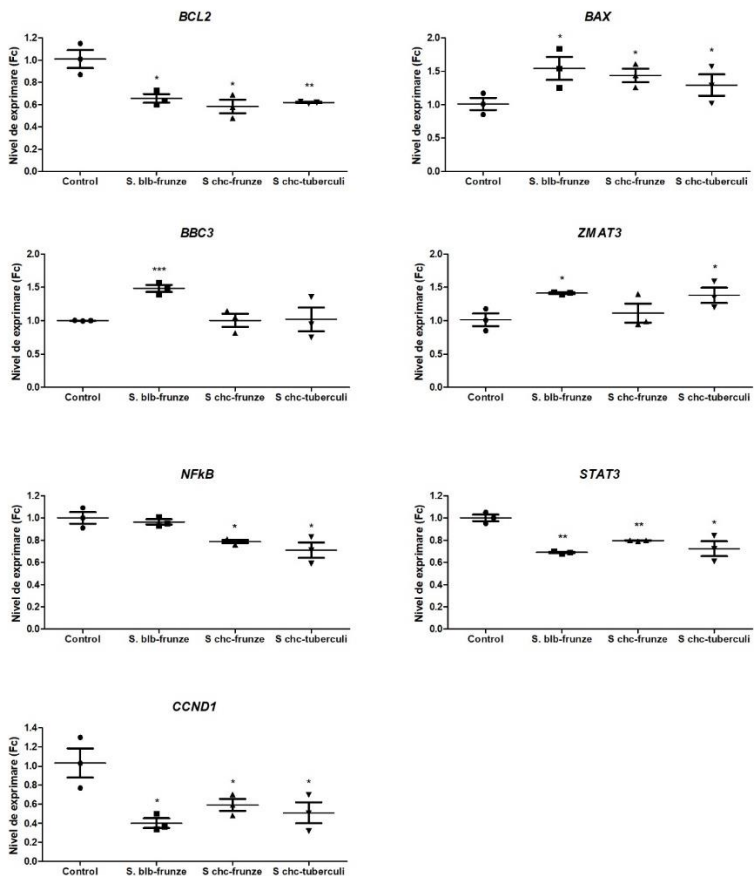
În cazul administrării extractelor obținute din frunzele și tuberculii de *S. chacoense*, genele *BCL2*, *BAX*, *ZMAT3*, *STAT3* și *CCND1* sunt modulate în

aceiași sens ca și în cazul tratamentului cu extractul din frunzele de *S. bulbocastanum*. În plus față de aceste modificări de exprimare genică, ambele extracte obținute din specia *S. chacoense* induc subexprimarea factorului de transcriere NFkB (Fig. 6)



**Fig. 5** Exprimarea genelor implicate în proliferare și apoptoză în linia celulară MCF7 tratată cu extractele obținute din florile și frunzele de *C. officinalis* la concentrații egale cu valorile  $IC_{50}$ , la 48h de la administrare.





**Fig. 6** Expimarea genelor implicate în proliferare și apoptoză în linia celulară MCF7 tratată cu extractele obținute din frunzele de *S. bulbocastanum* și din frunzele și tuberculii de *S. chacoense* la concentrații egale cu valorile IC<sub>50</sub>, la 48h de la administrare

## CAPITOLUL VII - Discuții

### 1. *C. officinalis*: potențialul în managementul cancerului de sân

#### 1.1. Profilul fitochimic al extractelor din *C. officinalis*

În extractul obținut din florile de *C. officinalis* au fost identificați 14 compuși fenolici, pe când diversitatea acestei clase de compuși în preparatul vegetal din frunzele aceleiași specii a fost mai redusă, fiind cuantificați doar 12 compuși fenolici. Dintre toți acești constituenți biochimici, 10 au fost raportați și în prealabil în diferite preparate obținute din organele acestei specii (Mehta și colab., 2012; Miguel și colab., 2016; Olennikov și colab., 2017; Rigane și colab., 2013). Totuși, patru dintre aceștia, acidul dihidroxibenzoic, 3-O-glucozil-ramnozid-glucozid-quercetina, 3-O-galactozid-izoramnetina și 7-O-ramnozid-izoramnetina, au fost identificați pentru prima dată ca parte a profilului biochimic al speciei *C. officinalis*.

Compușii fenolici sunt printre cele mai importante clase de metaboliți secundari ce sunt caracterizați de activitatea anti-tumorală, fiind capabili să inhibe proliferarea celulară și să inducă apoptoza (Fantini și colab., 2015; Nichenametla și colab., 2006). Numeroși compuși fenolici dintre cei identificați în extractele de *C. officinalis* utilizate în acest studiu, cum sunt acidul clorogenic (Yamagata și colab., 2018), derivații de quercetină (Kashyap și colab., 2016), derivații de izoramnetină (Wu și colab., 2018) și derivații de scopoletină (Li și colab., 2015) sunt recunoscuți pentru proprietățile anti-tumorale în literatura de specialitate.

Un număr de 28 de compuși volatili au fost identificați în extractele de *C. officinalis*, 24 dintre aceștia fiind prezenți în preparatul vegetal din flori și doar 16 în cel obținut din frunze. Rezultatele obținute din prisma profilului biochimic volatil sunt în concordanță cu datele din literatură, diferite studii raportând prezența cimenului, limonenului, cubebenului, copaenului, muurolenului, cadinenului și nonanalului în diverse preparate vegetale obținute din *C. officinalis* (Gazim și colab., 2008; Kaškonienė și colab., 2011; Okoh și colab., 2007; Petrović și colab., 2010). Totuși, acest studiu identifică pentru prima dată compușii octanal, cosmen, alocimen, propiofenonă și cloroacetofenonă ca parte a profilului biochimic al acestei specii.

Compușii volatili, cum sunt monoterpenele și sesquiterpenele, sunt recunoscuți pentru activitatea anti-tumorală, atât individual, cât și ca amestecuri de constituenți vegetali (Dhifi și colab., 2016; Greay și Hammer,

2015). Activitate anti-tumorală a fost raportată anterior pentru mai mulți compuși volatili individuali ce au fost identificați în extractele de *C. officinalis* utilizate în cadrul acestui studiu. Astfel de compuși sunt cadinenul (Hui și colab., 2015), copaenul (Turkez și colab., 2014), metil benzoatul și multiple acetofenone (Nakamura și colab., 2002).

### 1.2. Selectivitatea în activitatea anti-tumorală a extractelor de *C. officinalis*

Extractele metanolice din florile și frunzele de *C. officinalis* obținute prin UAE au dat rezultate mai bune din prisma activității anti-tumorale în comparație cu extractele din aceeași specie preparate prin metode clasice (Wegiera și colab., 2013; Matic și colab., 2013; Miguel și colab., 2016).

Cele mai puternice efecte anti-tumorale în cazul ambelor extracte au fost înregistrate pe linia celulară MCF7. Această linie celulară aparține subtipului molecular luminal A de cancer mamar, fiind astfel mai puțin agresivă și cu răspuns mai bun la chimioterapie. În schimb, liniile celulare MDA-MB-231 și HS578T sunt triplu negative de tip claudin-low, cu un fenotip caracterizat de răspuns scăzut la tratamentul adjuvant convențional (Holliday și Speirs, 2011). În acest context, diferențele observate din perspectiva concentrațiilor  $IC_{50}$  a celor două extracte în dependență de linia celulară sunt explicabile.

Activitatea anti-tumorală selectivă a extractelor din florile de *C. officinalis* a fost raportată anterior în literatură, prin compararea citotoxicității asupra liniilor celulare canceroase cu cea asupra celulelor mononucleare imunocompetente (PBMC – Matic și colab., 2013), a celulelor hepatice porcine (PLP2 – Miguel și colab., 2016) și a unei linii celulare sănătoase de colon (CCD18 – Mouhid și colab., 2018). Totuși, extractul metanolic obținut din florile acestei specii nu a avut citotoxicitate selectivă asupra cancerului de sân (linie celulară T47D) în comparație cu o linie celulară de fibroblaști umani (HSF – Matysik și colab., 2013). Astfel, în cadrul acestui studiu a fost evaluată pentru prima dată toxicitatea extractelor de *C. officinalis* asupra unei linii celulare sănătoase de celule endoteliale (HUVEC), demonstrând citotoxicitatea selectivă a extractului din florile de *C. officinalis*. Mai mult decât atât, în lucrarea de față este dovedită pentru prima dată selectivitatea extractului din frunzele de *C. officinalis* din perspectiva activității anti-tumorale.

Comparând cele două preparate vegetale utilizate obținute, extractul de flori a avut rezultate superioare în ceea ce privește activitatea anti-tumorală

în cazul tuturor celor trei linii celulare de cancer de sân. Aceste rezultate sunt în concordanță cu singurul studiu ce a mai determinat comparativ citotoxicitatea extractelor din florile și frunzele de *C. officinalis* asupra unor linii celulare tumorale, Wegiera și colaboratorii (2012) demonstrând activitatea anti-tumorală mai scăzută a extractului de frunze, cu valori ale IC<sub>50</sub> în același interval ca și în studiul de față. Diferențele observate din prisma activității anti-tumorale exercitate asupra liniilor celulare, pot fi explicate, cel puțin parțial, de profilul biochimic distinct al celor două extracte de interes. Extractul de flori a fost superior din prisma cantității totale de polifenoli, acești compuși fiind cunoscuți pentru activitatea anti-tumorală (Fantini și colab., 2015). Diversitatea compușilor fenolici din extractul obținut din florile de *C. officinalis* a fost de asemenea mai bogată. Mai mult decât atât, mai mulți compuși volatili recunoscuți pentru activitatea anti-tumorală, cum sunt delta-cadinenul (Hui și colab., 2015) și copaenul (Turkez și colab., 2014), au fost identificați doar în preparatul din florile acestei specii.

### 1.3. Mecanismele de acțiune ale extractelor de *C. officinalis*

Activitatea anti-tumorală a extractelor de *C. officinalis* se bazează pe capacitatea de a induce apoptoza (Jimenez-Medina și colab., 2006; Mouhid și colab., 2018; Wegiera și colab., 2012) și de a stopa ciclul celular în faza G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> (Jimenez-Medina și colab., 2006). Atât caspaza 3 cât și caspaza 7 sunt activate prin clivaj la nivel proteic ca răspuns la administrarea extractelor din florile de *C. officinalis* și astfel este indusă apoptoza prin caspaze (Jimenez-Medina și colab., 2006; Mouhid și colab., 2018). Pe de cealaltă parte, efectele citostatice ale extractelor din florile acestei specii au la bază subexprimarea ciclinelor D1, D3, A, E și a unor kinaze ciclin-dependente (CDK - *Cyclin Dependent Kinases*) (Jimenez-Medina și colab., 2006). În acest context, în lucrarea de față au fost identificate șapte gene implicate în progresul ciclului celular și în apoptoză ce sunt modulate de tratamentul cu cele două extracte din *C. officinalis*, în linia celulară MCF7, subliniind noi efecte moleculare ce stau la baza activității anti-tumorale a acestor preparate vegetale.

Genele *BCL2*, *BAX* și *BBC3* codifică proteine din familia BCL2 capabile de homo- și heterodimerizare, ce funcționează ca reglatori ai apoptozei (Cory și Adams, 2002). Conform datelor obținute, *BCL2*, una dintre cele mai importante gene anti-apoptotice din această familie, a fost subexprimată în celulele de cancer mamar tratate cu extractele de *C. officinalis*. Pe de cealaltă

parte, genele pro-apoptotice *BAX* și *BBC3* au fost supraexprimate în celulele MCF7 ca răspuns la administrarea extractelor la concentrații egale cu valorile  $IC_{50}$ . Astfel, eliberarea citocromului c din mitocondrie ar putea fi stimulată de ambele extracte analizate, și astfel apoptoza a fost cel mai probabil implementată prin activarea caspazelor, după cum au demonstrat studiile anterioare (Jimenez-Medina și colab., 2006; Mouhid și colab., 2018). Nivelele de exprimare ale *ZMAT3*, genă implicată atât în creșterea celulară cât și în semnalizarea apoptozei (Bersani și colab., 2014) au fost de asemenea crescute în celulele tratate cu ambele extracte vegetale. Toate aceste atestă sugerează inducerea apoptozei de către extracetele din *C. officinalis*.

Proliferarea celulară este controlată de multiple căi de semnalizare la nivelul cărora numeroase proteine reglatoare cum sunt ciclina sau factorii de transcriere NFkB și STAT3 joacă un rol decisiv. Gena *CCND1* codifică ciclina D1, componenta reglatoare a complexelor ciclina D – CDK4/6 ce sunt responsabile de inducerea tranziției din faza G1 în faza S a ciclului celular, prin trecerea prin punctul R (Musgrove, 2006). În cadrul acestui studiu, ciclina D1 a fost subexprimată în celulele MCF7 în urma administrării ambelor extracte obținute din *C. officinalis*. Aceste date sunt în concordanță cu rezultatele obținute de Jimenez-Medina și colaboratorii (2006), care au demonstrat subexprimarea acestor proteine la nivel proteic în urma tratamentului cu un extract apos activat prin laser obținut din florile acestei specii. NFkB este un factor de transcriere ce este activat de un panel vast de stimuli extra- și intracelulari, a cărui activare este asociată cu proliferarea celulară (Serasanambati și Chilakapati, 2016). STAT3 este un factor de transcriere care mediază răspunsurile celulare la citokine și factori de creștere, fiind implicat în tranziția G<sub>1</sub>-S a ciclului celular (Levy și Lee, 2002). Activarea acestuia induce exprimarea unor gene cheie în proliferare, cum este și *CCND1*. Rezultatele obținute demonstrează subexprimarea factorilor de transcriere NFkB și STAT3. Aceste date subliniază o serie de modificări moleculare importante în celulele tumorale mamare induse de extractele de *C. officinalis*, ce ar putea sta la baza efectelor citostatice ale acestor preparate vegetale.

## 2. *S. chacoense* și *S. bulbocastanum*: potențialul în prevenția cancerului de sân

### 2.1. Profilul fitochimic al extractelor din *S. chacoense*

Acizii hidroxicinamici, inclusiv derivați ai acizilor cafeici și clorogenic, sunt cunoscuți a fi principalii compuși fenolici prezenți în organele speciei *S. chacoense* (Hale și colab., 2008; Navarre și colab., 2011). În schimb, acidul ferulic și acidul hidroxibenzoic au fost identificați pentru prima dată în compoziția biochimică a acestei specii, în acest studiu. Acizii fenolici sunt caracterizați de activitate anti-tumorală substanțială, cu potențial atât în prevenția cancerului, cât și în tratarea acestuia (Saibabu și colab., 2015). Acizi fenolici individuali identificați în preparatele metanolice din *S. chacoense*, cum sunt acidul clorogenic (Yamagata și colab., 2018), acidul cafeic (Rosendahl și colab., 2015) sau acidul ferulic (Gao și colab., 2018), au fost identificați în studii anterioare ca agenți anti-cancer. În acest context, profilul fenolic al extractelor din *S. chacoense* a contribuit substanțial la activitatea anti-tumorală observată pe linia celulară de cancer de sân.

Studiile anterioare au cuantificat cantități mari de  $\alpha$ -solanină și  $\alpha$ -chacolină în tuberculii și frunzele a diferite specii sălbatice de cartof (Distl și Wink, 2009), inclusiv a speciei *S. chacoense* (Mweetwa și colab., 2012). Cu toate acestea, în extractul din tuberculii recoltați de la plante de *S. chacoense*, accesiuinea PI 458310 crescute pentru 12 săptămâni în laborator în cadrul acestui studiu, compușii  $\alpha$ -solanină și  $\alpha$ -chacolină nu au fost prezenți în cantități detectabile. Pe lângă aceste două solanidane, în extractul de frunze au fost identificați și alcaloizii solasodină și derivatul acesteia, solamargină. Acești compuși au fost identificați în prealabil în organele supraterane ale unor specii sălbatice de *Solanum* (Distl și Wink, 2009), dar niciodată în frunzele de *S. chacoense*. Toți acești alcaloizi sunt recunoscuți în literatură pentru activitatea anti-tumorală, fiind capabili să inducă atât moartea celulară cât și stoparea ciclului celular (Milner, și colab., 2011; Friedman, 2015), contribuind astfel la activitatea anti-tumorală a extractului din frunze.

Studiul de față prezintă pentru prima dată caracterizarea profilului biochimic volatil al extractelor obținute din tuberculii și frunzele de *S. chacoense*. Profilul biochimic volatil al speciei *S. chacoense* se suprapune parțial, după cum era de așteptat, cu compoziția volatilă a speciei cultivate *S. tuberosum* (Morris și colab., 2010; Mosneaguta și colab., 2012), cu compuși

din clasele aldehydelor, esterilor, alcoolilor grași și cetonele fiind prezenți în ambele specii. Totuși, constituenți cum sunt cadinenul, 2-cloroacetofenona, dimetil acetal izobutilaldehida sau anhidrida fenilmaleică par a fi specifici acestei specii sălbatice. Compușii volatili individuali identificați în extractele de *S. chacoense*, cum sunt cadinenul (Hui și colab., 2015), metil benzoatul sau acetofenonele (Nakamura și colab., 2002) sunt cunoscuți în literatură pentru activitatea anti-tumorală.

## 2.2. Selectivitatea în activitatea anti-tumorală a extractelor din *Solanum* spp.

Cele mai mici valori ale  $IC_{50}$  corespundente celor trei extracte din speciile de *Solanum* au fost obținute pe linia MCF7. În mod similar cu datele obținute pentru extractele din *C. officinalis*, rezultatele mai bune obținute pe această linie celulară de cancer mamar luminal au fost de așteptat, având în vedere că aceasta este mai puțin agresivă (Holliday și Speirs, 2011).

Ambele extracte obținute din *S. chacoense* au fost selective în acțiunea anti-tumorală față de linia celulară MCF7 cu coeficienți mari de selectivitate, dar doar preparatul din tuberculi a menținut selectivitatea și împotriva liniei MDA-MB-231. Acest studiu este primul care evaluează acțiunea anti-tumorală selectivă a extractelor obținute din această specie. Extractul obținut din frunzele de *S. bulbocastanum* a produs cele mai bune rezultate din prisma selectivității în activitatea anti-tumorală, cu coeficienți de selectivitate de până la 5,0 (linie celulară MCF7). Acest studiu este primul care evaluează activitatea anti-tumorală în general, și selectivitatea în acțiunea anti-cancer în particular a fitoconstituenților din *S. bulbocastanum*.

Comparând cele două preparate vegetale obținute din specia *S. chacoense*, extractul din tuberculi a fost superior din perspectiva efectelor citotoxice/ citostatice observate în cazul tuturor celor trei linii celulare de cancer mamar. Acest lucru a fost observat în ciuda faptului că acesta nu a conținut glicocalcoizi, compuși cărora le-a fost atribuită activitatea anti-tumorală a extractelor din diferite specii de *Solanum* (Freidman, 2015). Cu toate acestea, extractul din tuberculi a conținut mai mulți compuși fenolici. Totodată, acizii cafeic și ferulic, cunoscuți pentru activitatea anti-tumorală (Rosendhl și colab., 2015, Gao și colab., 2018), au fost identificați doar în acest preparat. Mai mult decât atât, diversitatea crescută a compușilor volatili cunoscuți pentru activitatea anti-tumorală (cetone și aldehide), dublată de

abundențe relative mai mari a acestora, au fost elemente remarcate în profilul biochimic al extractului din tuberculi, comparativ cu cel din frunzele de *S. chacoense*.

### 2.3. Mecanismele de acțiune ale extractelor de *Solanum* spp.

Din familia de proteine reglatoare a apoptozei *BCL2*, trei gene au fost modulate de extractele obținute din speciile de *Solanum* incluse în studiu. Astfel, gena *BCL2*, una dintre cele mai importante proteine anti-apoptotice din această familie a fost subexprimată, iar *BAX*, genă pro-apoptotică cu mai multe domenii BH, a fost supraexprimată în urma administrării tuturor celor trei extracte. Gena pro-apoptotică *BBC3* a fost de asemenea supraexprimată în celulele MCF7 tratate cu extractul obținut din frunzele de *S. bulbocastanum*. Toate aceste date sugerează inducerea apoptozei prin eliberarea citocromului c cu formarea apoptosomului în urma tratamentului cu extractele de *S. chacoense* și *S. bulbocastanum*. Întru susținerea ipotezei inducerii apoptozei de către extractele din aceste specii vine și supraexprimarea semnificativă statistic a genei *ZMAT3*.

Ciclina D1, implicată în progresul ciclului celular prin punctul R din faza G<sub>1</sub> în faza S, a fost subexprimată substanțial în urma tratamentului cu toate cele trei extracte obținute din speciile de *Solanum*. Similar, și factorul de transcriere STAT3, relevant în transcrierea a multiple gene implicate în proliferare, a avut nivele scăzute de exprimare în urma administrării celor trei extracte de interes. Exprimarea NFκB a fost modulată semnificativ în sensul inhibării proliferării celulare doar de către extractele din specia *S. chacoense*. Astfel, se evidențiază premisa conform căreia extractele obținute din speciile de *Solanum* ar putea stopa procesul ciclului celular și proliferarea celulară, subliniind potențialul citostatic al acestora.

Având în vedere toate aceste date, sunt evidențiate pentru prima dată bazele moleculare ale efectelor citotoxice și citostatice ale compușilor bioactivi din speciile *S. chacoense* și *S. bulbocastanum*.



## Concluzii

Extractele metanolice obținute din florile și frunzele de *C. officinalis* prin tehnica UAE au fost bogate în polifenoli și compuși volatili, constituenți cunoscuți pentru activitatea anti-tumorală. Atât extractul din frunze, cât și cel din florile de *C. officinalis* au fost caracterizate de activitate anti-tumorală *in vitro* împotriva tuturor celor trei linii de cancer mamar. Mai mult decât atât, acestea au fost și selective din perspectiva citotoxicității împotriva liniilor celulare tumorale în comparație cu celulele endoteliale sănătoase. Ambele extracte au modulată exprimarea mai multor gene relevante în proliferare și apoptoză, sugerând capacitatea extractelor de a induce moartea celulară și stoparea ciclului celular în celulele tumorale. Aceste date demonstrează, cel puțin parțial, bazele moleculare ale efectelor celulare observate anterior, conform cărora extractele din *C. officinalis* ar avea atât efecte citotoxice, cât și citostatice. Astfel, *C. officinalis* poate fi considerată o sursă relevantă de compuși bioactivi cu proprietăți anti-cancer, iar preparatele vegetale din această specie ar putea fi incluse ca produse asociate medicinei complementare în tratarea și îngrijirea paliativă a pacienților cu cancer mamar.

Extractele obținute din frunzele și tuberculii de *S. chacoense* au fost bogate în acizi fenolici și compuși volatili. Adițional, extractul din frunze a conținut patru alcaloizi specifici familiei *Solanaceae*. Cele două extracte obținute din *S. chacoense* au fost caracterizate de activitate anti-tumorală pe toate cele trei linii celulare de cancer mamar și au fost selective împotriva liniei celulare de cancer de sân MCF7. În schimb, extractul obținut din frunzele recoltate de la *S. bulbocastanum* a avut toxicitate semnificativ mai redusă asupra liniei celulare sănătoase HUVEC și astfel selectivitate mult crescută în activitatea anti-tumorală. Toate cele trei extracte obținute din speciile sălbatice de *Solanum* au modulată expresia unor gene implicate în apoptoză și proliferare celulară, sugerând activitatea citotoxică, dar și citostatică ce ar caracteriza aceste preparate vegetale. Astfel, speciile sălbatice de *Solanum*, fiind intens utilizate în programele de ameliorare a cartofului, ar putea îmbunătăți semnificativ profilul biochimic responsabil de activitatea anti-tumorală a noilor soiuri cultivate de cartof, participând astfel la prevenția cancerului mamar prin nutriție, la nivel mondial.

## Bibliografie selectivă

1. Ali F, Khan R, Khan AQ, Lateef MA, Maqbool T, Sultana S, 2014. Assessment of Augmented Immune Surveillance and Tumor Cell Death by Cytoplasmic Stabilization of p53 as a Chemopreventive Strategy of 3 Promising Medicinal Herbs in Murine 2-Stage Skin Carcinogenesis. *Integrative cancer therapies* **13**(4):351-367.
2. Ardekani AM, Jabbari S, 2009. Nutrigenomics and cancer. *Avicenna journal of medical biotechnology* **1**(1):9-17.
3. Ashwlayan V, Kumar A, Verma M, Garg V, Gupta S, 2018. Therapeutic Potential of *Calendula officinalis*. *Pharmacy & Pharmacology International Journal* **6**(2):149-155.
4. Aung TN, Qu Z, Kortschak RD, Adelson DL, 2017. Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action. *International journal of molecular sciences* **18**(3):45-53.
5. Barajas-Farias LM, Perez-Carreón JI, Arce-Popoca E, Fattel-Fazenda S, Aleman-Lazarini L, Hernandez-Garcia S, Salcido-Neyoy M, Cruz-Jimenez FG, Camacho J, Villa-Trevino S, 2006. A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. *Planta medica* **72**(3):217-221.
6. Bersani C, Xu LD, Vilborg A, Lui WO, Wiman KG, 2014. Wig-1 regulates cell cycle arrest and cell death through the p53 targets FAS and 14-3-3sigma. *Oncogene* **33**(35):4407-4417.
7. Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J, 1988. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. *Die Pharmazie* **43**(3):220-221.
8. Braicu C, Mehterov N, Vladimirov B, Sarafian V, Nabavi SM, Atanasov AG, Berindan-Neagoe I, 2017. Nutrigenomics in cancer: Revisiting the effects of natural compounds. *Seminars in cancer biology* **46**:84-106.
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A, 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **68**(6):394-424.
10. Caruso I, Dal Piaz F, Malafrente N, De Tommasi N, Aversano R, Zottele CW, Scarano MT, Carputo D, 2013. Impact of ploidy change on secondary metabolites and photochemical efficiency in *Solanum bulbocastanum*. *Natural product communications* **8**(10):1387-1392.
11. Cheng CW, Fan W, Ko SG, Song L, Bian ZX, 2010. Evidence-based management of herb-drug interaction in cancer chemotherapy. *Explore* **6**(5):324-329.
12. Chun KH, Park JH, Fan S, 2017. Predicting and Overcoming Chemotherapeutic Resistance in Breast Cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **1026**:59-104.
13. Cory S, Adams JM, 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer* **2**(9):647-656.
14. Cragg GM, Newman DJ, 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology* **100**(1-2):72-79.
15. Dalle JR, Leow WK, Racoceanu D, Tutac AE, Putti TC, 2008. Automatic breast cancer grading of histopathological images. *Conference proceedings : ... Annual International*

- Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* **2008**:3052-3055.
16. Davis CD, 2007. Nutritional interactions: credentialing of molecular targets for cancer prevention. *Experimental biology and medicine* **232**(2):176-183.
  17. De Haan S, Rodriguez F, 2016. Potato origin and production, in: Singh, J, Kaur, L (Eds.), *Advances in potato chemistry and technology*. Elsevier Inc, London, GB, pp. 1-32.
  18. Dhankhar R, Vyas SP, Jain AK, Arora S, Rath G, Goyal AK, 2010. Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology* **38**(5):230-249.
  19. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W, 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* **3**(4):123-141.
  20. Distl M, Wink M, 2009. Identification and Quantification of Steroidal Alkaloids from Wild Tuber-Bearing Solanum Species by HPLC and LC-ESI-MS. *Potato Research* **52**(1):79-104.
  21. Efferth T, Li PC, Konkimalla VS, Kaina B, 2007. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. *Trends in molecular medicine* **13**(8):353-361.
  22. Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC, 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *Jama* **280**(18):1569-1575.
  23. Enioutina EY, Salis ER, Job KM, Gubarev MI, Krepkova LV, Sherwin CM, 2017. Herbal Medicines: challenges in the modern world. Part 5. status and current directions of complementary and alternative herbal medicine worldwide. *Expert review of clinical pharmacology* **10**(3):327-338.
  24. Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi I, Modesti A, Bei R, 2015. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. *International journal of molecular sciences* **16**(5):9236-9282.
  25. Ferguson LR, Philpott M, Karunasinghe N, 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* **198**(1-3):147-159.
  26. Frankic T, Salobir K, Salobir J, 2009. The comparison of in vivo antigenotoxic and antioxidative capacity of two propylene glycol extracts of *Calendula officinalis* (marigold) and vitamin E in young growing pigs. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **93**(6):688-694.
  27. Friedman M, 2015. Chemistry and anticarcinogenic mechanisms of glycoalkaloids produced by eggplants, potatoes, and tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry* **63**(13):3323-3337.
  28. Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, Tohme R, Darwiche N, 2015. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **20**(12):1531-1562.
  29. Gao J, Yu H, Guo W, Kong Y, Gu L, Li Q, Yang S, Zhang Y, Wang Y, 2018. The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells. *Cancer cell international* **18**:102-109.
  30. Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TI, Cortez DA, 2008. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil.

- Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology] **39**(1):61-63.
31. Goyal M, Mathur R, 2011. Antimicrobial effects of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. *J Herbal Med Tox*, **5**(1):97-101.
  32. Greay SJ, Hammer KA, 2015. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews* **14**(1):6.
  33. Haldar K, Kamoun S, Hiller NL, Bhattacharje S, van Ooij C, 2006. Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nature reviews. Microbiology* **4**(12):922-931.
  34. Hale AL, Reddivari L, Nzaramba MN, J. B, J.C. MJ, 2008. Interspecific variability for antioxidant activity and phenolic content among *Solanum* species. *American Journal of Potato Research* **85**:332-341.
  35. Helyer LK, Chin S, Chui BK, Fitzgerald B, Verma S, Rakovitch E, Dranitsaris G, Clemons M, 2006. The use of complementary and alternative medicines among patients with locally advanced breast cancer--a descriptive study. *BMC cancer* **6**:39-48.
  36. Horneber M, Bueschel G, Dennert G, Less D, Ritter E, Zwahlen M, 2012. How many cancer patients use complementary and alternative medicine: a systematic review and metaanalysis. *Integrative cancer therapies* **11**(3):187-203.
  37. Hu Z, Yang X, Ho PC, Chan SY, Heng PW, Chan E, Duan W, Koh HL, Zhou S, 2005. Herb-drug interactions: a literature review. *Drugs* **65**(9):1239-1282.
  38. Hui LM, Zhao GD, Zhao JJ, 2015. delta-Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. *International journal of clinical and experimental pathology* **8**(6):6046-6056.
  39. Iqbal J, Abbasi B, Mahmood T, Kanwal S, Ali B, Shah SA, Khalil AT, 2017. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **7**(12):21.
  40. Ismail-Khan R, Bui MM, 2010. A review of triple-negative breast cancer. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* **17**(3):173-176.
  41. Jimenez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F, 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC cancer* **6**:119-132.
  42. Kashyap D, Mittal S, Sak K, Singhal P, Tuli HS, 2016. Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**(10):12927-12939.
  43. Kaškonienė V, Kaškonas P, Jalinskaitė M, Maruška A, 2011. Chemical Composition and Chemometric Analysis of Variation in Essential Oils of *Calendula officinalis* L. during Vegetation Stages. *Chromatographia* **73**:9.
  44. Khalid K, Da Silva J, 2012. Biology of *Calendula officinalis* Linn: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* **6**(1):12-27.
  45. Koh J, Kim MJ, 2019. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean journal of radiology* **20**(1):69-82.
  46. Kotecha R, Takami A, Espinoza JL, 2016. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget* **7**(32):52517-52529.

47. Levy DE, Lee CK, 2002. What does Stat3 do? *The Journal of clinical investigation* **109**(9):1143-1148.
48. Li L, Zhao P, Hu J, Liu J, Liu Y, Wang Z, Xia Y, Dai Y, Chen L, 2015. Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity of scopoletin-cinnamic acid hybrids. *European journal of medicinal chemistry* **93**:300-307.
49. Liao GS, Apaya MK, Shyur LF, 2013. Herbal medicine and acupuncture for breast cancer palliative care and adjuvant therapy. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2013**:437948.
50. Liu LF, Liang CH, Shiu LY, Lin WL, Lin CC, Kuo KW, 2004. Action of solamargine on human lung cancer cells--enhancement of the susceptibility of cancer cells to TNFs. *FEBS letters* **577**(1-2):67-74.
51. Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4):402-408.
52. Luis Espinoza J, Takami A, Trung LQ, Nakao S, 2013. Ataxia-telangiectasia mutated kinase-mediated upregulation of NKG2D ligands on leukemia cells by resveratrol results in enhanced natural killer cell susceptibility. *Cancer science* **104**(6):657-662.
53. Mamone L, Di Venosa G, Valla JJ, Rodriguez L, Gandara L, Battle A, Heinrich M, Juarranz A, Sanz-Rodriguez F, Casas A, 2011. Cytotoxic effects of Argentinean plant extracts on tumour and normal cell lines. *Cellular and molecular biology* **57**:1487-1499.
54. Mastropasqua MG, Viale G, 2017. Clinical and pathological assessment of high-risk ductal and lobular breast lesions: What surgeons must know. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* **43**(2):278-284.
55. Matsen CB, Neumayer LA, 2013. Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA surgery* **148**(10):971-979.
56. Mehta D, Rastogi P, Kumar A, K. CA, 2012. Review on Pharmacological Update: *Calendula officinalis* Linn. *Inventi Impact - Planta Activa* **2012**(4):195-204.
57. Miguel M, Barros L, Pereira C, Calhelha RC, Garcia PA, Castro M, Santos-Buelga C, Ferreira IC, 2016. Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves). *Food & function* **7**(5):2223-2232.
58. Molassiotis A, Scott JA, Kearney N, Pud D, Magri M, Selvekerova S, Bruyns I, Fernandez-Ortega P, Panteli V, Margulies A, Gudmundsdottir G, Milovics L, Ozden G, Platin N, Patiraki E, 2006. Complementary and alternative medicine use in breast cancer patients in Europe. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* **14**(3):260-267.
59. Mongelli E, Coussio J, Ciccia G, Maestri D, Zygadlo J, 1999. Medicinal species of the *Solanaceae* family: primary screening of cytotoxicity. *Acta Horticulturae* **501**:177-180.
60. Morris WL, Shepherd T, Verrall SR, McNicol JW, Taylor MA, 2010. Relationships between volatile and non-volatile metabolites and attributes of processed potato flavour. *Phytochemistry* **71**(14-15):1765-1773.
61. Mosneaguta R, Alvarez V, Barringer SA, 2012. The effect of antibrowning agents on inhibition of potato browning, volatile organic compound profile, and microbial inhibition. *Journal of food science* **77**(11):1234-1240.

62. Musgrove EA, 2006. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth factors* **24**(1):13-19.
63. Mweetwa AM, Hunter D, Poe R, Harich KC, Ginzberg I, Veilleux RE, Tokuhisa JG, 2012. Steroidal glycoalkaloids in *Solanum chacoense*. *Phytochemistry* **75**:32-40.
64. Nakamura ES, Kurosaki F, Arisawa M, Mukainaka T, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, Pastore F, 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer letters* **177**(2):119-124.
65. Navarre D, Pillai S, Shakya R, Holden M, 2011. HPLC Profiling of phenolics in diverse potato genotypes. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **127**:34-41.
66. Navo MA, Phan J, Vaughan C, Palmer JL, Michaud L, Jones KL, Bodurka DC, Basen-Engquist K, Hortobagyi GN, Kavanagh JJ, Smith JA, 2004. An assessment of the utilization of complementary and alternative medication in women with gynecologic or breast malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**(4):671-677.
67. Newman DJ, Cragg GM, 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products* **79**(3):629-661.
68. Nicastro HL, Trujillo EB, Milner JA, 2012. Nutrigenomics and Cancer Prevention. *Current nutrition reports* **1**(1):37-43.
69. Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH, 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical reviews in food science and nutrition* **46**(2):161-183.
70. Nounou MI, ElAmrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H, 2015. Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast cancer : basic and clinical research* **9**(Suppl 2):17-34.
71. Okoh OO, Sadimenko AA, Afolayan AJ, 2007. The effects of age on the yield and composition of the essential oils of *Calendula officinalis*. *Journal of Applied Sciences* **7**(23):3806-3811.
72. Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK, Akobirshoeva A, Zilfikarov IN, Vennos C, 2017. Isorhamnetin and Quercetin Derivatives as Anti-Acetylcholinesterase Principles of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers and Preparations. *International journal of molecular sciences* **18**(8):225-264.
73. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN, 2009. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clinical medicine & research* **7**(1-2):4-13.
74. Petrović L, Lepojević Z, Sovilj V, Adamović D, V. T, 2010. Composition of Essential Oil Obtained From Tubular, Head and Ligulate Flowers of *Calendula officinalis* L. by Steam Distillation of Plant Material and CO<sub>2</sub> Extracts. *Journal of Essential Oil Research* **22**(2):4.
75. Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D'Hombres A, Carrie C, Montbarbon X, 2004. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**(8):1447-1453.

76. Rakosy-Tican E, Lorincz-Besenyei E, Molnar I, Thieme R, Hartung F, Sprink T, Antonova O, Famelaer I, Angenon G, Aurori A, 2019. New Phenotypes of Potato Co-induced by Mismatch Repair Deficiency and Somatic Hybridization. *Frontiers in plant science* **10**:3.
77. Rigane G, Younes SB, Ghazghazi H, Salem R, 2013. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal* **20**(6):3001-3008.
78. Rosendahl AH, Perks CM, Zeng L, Markkula A, Simonsson M, Rose C, Ingvar C, Holly JM, Jernstrom H, 2015. Caffeine and Caffeic Acid Inhibit Growth and Modify Estrogen Receptor and Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels in Human Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**(8):1877-1887.
79. Royston KJ, Tollefsbol TO, 2015. The Epigenetic Impact of Cruciferous Vegetables on Cancer Prevention. *Current pharmacology reports* **1**(1):46-51.
80. Safarzadeh E, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B, 2014. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced pharmaceutical bulletin* **4**(Suppl 1):421-427.
81. Saibabu V, Fatima Z, Khan LA, Hameed S, 2015. Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Advances in pharmacological sciences* **2015**:823539.
82. Sapienza C, Issa JP, 2016. Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annual review of nutrition* **36**:665-681.
83. Saxe GA, Madlensky L, Kealey S, Wu DP, Freeman KL, Pierce JP, 2008. Disclosure to physicians of CAM use by breast cancer patients: findings from the Women's Healthy Eating and Living Study. *Integrative cancer therapies* **7**(3):122-129.
84. Seely D, Oneschuk D, 2008. Interactions of natural health products with biomedical cancer treatments. *Current oncology* **15**(2):109-117.
85. Serasanambati M, Chilakapati SR, 2016. Function of nuclear factor kappa B (NF-kB) in human diseases-a review. *South Ind. J. Biol. Sci.* **2**:368-387.
86. Sharp L, Finnila K, Johansson H, Abrahamsson M, Hatschek T, Bergenmar M, 2013. No differences between *Calendula* cream and aqueous cream in the prevention of acute radiation skin reactions--results from a randomised blinded trial. *European journal of oncology nursing : the official journal of European Oncology Nursing Society* **17**(4):429-435.
87. Shiu LY, Chang LC, Liang CH, Huang YS, Sheu HM, Kuo KW, 2007. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **45**(11):2155-2164.
88. Silva EJ, Goncalves ES, Aguiar F, Evencio LB, Lyra MM, Coelho MC, Fraga Mdo C, Wanderley AG, 2007. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. *Phytotherapy research : PTR* **21**(4):332-336.
89. Tariq A, Sadia S, Pan K, Ullah I, Mussarat S, Sun F, Abiodun OO, Batbaatar A, Li Z, Song D, Xiong Q, Ullah R, Khan S, Basnet BB, Kumar B, Islam R, Adnan M, 2017. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. *Phytotherapy research : PTR* **31**(2):202-264.
90. Tevaarwerk AJ, Gray RJ, Schneider BP, Smith ML, Wagner LI, Fetting JH, Davidson N, Goldstein LJ, Miller KD, Sparano JA, 2013. Survival in patients with metastatic

- recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy: little evidence of improvement over the past 30 years. *Cancer* **119**(6):1140-1148.
91. Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C, 2015. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *The British journal of nutrition* **113**(2):102-110.
  92. Turkez H, Togar B, Tatar A, Geyikoglu F, Hacimuftuoglu A, 2014. Cytotoxic and cytogenetic effects of  $\alpha$ -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia* **69**(7):936-943.
  93. Varlijen J, 1989. Structural analysis of rhamnoarabinogalactans and arabinogalactans with immunostimulating activity from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry* **28**:2379-2384.
  94. Wang H, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Lee JH, Kong AN, 2012. Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **12**(10):1281-1305.
  95. Wegiera M, Smolarz HD, Jedruch M, Korczak M, Kopron K, 2012. Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line--pilot study. *Acta poloniae pharmaceutica* **69**(2):263-268.
  96. Wu Q, Kroon PA, Shao H, Needs PW, Yang X, 2018. Differential Effects of Quercetin and Two of Its Derivatives, Isorhamnetin and Isorhamnetin-3-glucuronide, in Inhibiting the Proliferation of Human Breast-Cancer MCF-7 Cells. *Journal of agricultural and food chemistry* **66**(27):7181-7189.
  97. Yamagata K, Izawa Y, Onodera D, Tagami M, 2018. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* **441**(1-2):9-19.