
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Model experimental de evaluare *in vitro* și *in vivo* a eficacității și toxicității extractelor vegetale

Doctorand **Victoria Buza**

Conducător de doctorat **Prof.univ. dr. Laura Cristina Ștefănuț**



INTRODUCERE

De secole, atât oamenii, cât și animalele au utilizat instinctiv plantele medicinale pentru prevenirea și tratamentul diferitelor boli. În ultimele decenii, datorită extinderii rapide a chimiorezistenței, interesul pentru plantele medicinale și medicina tradițională a crescut considerabil, conducând la apariția fenomenului global cunoscut sub denumirea de „Întoarcerea la natură” (KHAN și AHMAD, 2019). În prezent literatura științifică se bazează pe un număr mic de cărți de medicină complementară și fitoterapie veterinară, iar studiile clinice, *in vivo*, privind utilizarea remediilor fitofarmaceutice la animale sunt puține. Studiile *in vitro* și *in vivo* privind efectele biologice, compoziția chimică, farmacocinetica metaboliților secundari și potențialul toxic al plantelor sunt premise importante pentru integrarea fitoterapiei tradiționale, bazată pe intuiția și practicile populare, în medicina modernă. În prezent este cert faptul că studierea potențialului bioactiv al plantelor și a extractelor de plante este încă la început de drum, una dintre problemele cu care se confruntă cercetătorii în domeniul fitoterapiei fiind slaba replicabilitate a studiilor. O cauză importantă o constituie lipsa informațiilor cu privire la compoziția chimică a extractelor de plante utilizate, metoda de extracție și doza administrată. De asemenea, profilul biochimic al plantei variază semnificativ în cadrul aceleiași specii în funcție de particularitățile mediului înconjurător. În același timp, la nivel global există diferențe majore între țări a protocoalelor de testare a toxicității, acest fapt se datorează dezvoltării rapide a cercetării și apariția metodelor noi de testare. Din acest motiv, la momentul actual este necesară stabilirea unor protocoale complexe, *in vitro* și *in vivo*, de determinare ale efectelor biologice, mecanismelor de acțiune și potențialului toxic acut și cronic al extractelor de plante.

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

În prezent, aproximativ 25% din medicamentele moderne sunt derivate din plante și compușii lor bioactivi, fiind considerate alternative mai sigure și sănătoase ale medicamentelor sintetice, în special în cazul administrării acestora pe termen lung (KHAN și AHMAD, 2019). Cu toate acestea, s-a estimat că doar 15% dintre speciile de plante cunoscute au fost studiate pentru compoziția lor chimică, iar aproximativ 6% pentru efectele lor terapeutice (ATANASOV și colab., 2015). **Scopul** cercetării a fost demonstrarea efectelor terapeutice cunoscute în medicina tradițională românească și a potențialului de toxicitate redus al unor specii de plante medicinale existente în flora spontană a României, prin evaluarea complexă *in vitro* și *in vivo* a acestora.

Obiectivul general al tezei a fost selectarea, prin eliminări etapizate efectuate în fiecare fază a cercetării, a unei plante utilizate în etnomedicină și determinarea compoziției chimice, evaluarea efectului terapeutic și potențialului toxic *in vitro* și *in vivo* al acesteia.

Pentru atingerea obiectivului principal formulat, am conturat **3 obiective specifice** după cum urmează:

- Evaluarea *in vitro* a efectului antihelmintic a șase plante medicinale utilizate pe larg în medicina tradițională a României pentru tratamentul infecțiilor parazitare atât la om cât și la animalele domestice: *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium*, *Centaureum erythraea*, *Gentiana asclepiadea*, *Inula helenium*, și *Tanacetum vulgare*;
- Determinarea compoziției chimice, potențialului antioxidant, antibacterian și citotoxic *in vitro* a două specii de plante medicinale selectate în baza rezultatelor obținute în prima fază a cercetării;
- Investigarea *in vivo* a siguranței și potențialelor efecte toxice dependente de doză ale extractului obținut din planta medicinală selectată în a doua fază a cercetării, utilizând modelul experimental murin.

Pentru realizarea obiectivelor propuse, prezenta cercetare a fost împărțită în **4 studii** distincte:

S1 Evaluarea *in vitro* a efectului antihelmintic a șase plante medicinale din flora spontană a României prin intermediul testului de eclozionare a ouălor (EHA) și testului de dezvoltare larvară (LDA):

- ✓ Determinarea potențialului ovicid *in vitro* al extractelor apoase utilizând testul de eclozionare a ouălor (EHA);
- ✓ Determinarea potențialului larvicid *in vitro* al extractelor testate, prin testul de dezvoltare larvară (LDA);
- ✓ Analiza statistică a rezultatelor obținute și determinarea concentrației letale medii (CL₅₀).

S2 Caracterizarea chimică prin cromatografie lichidă cu spectrometrie de masă (LC/MS) și evaluarea *in vitro* a efectului antioxidant și antibacterian al *I. helenium* și *G. asclepiadea*:

- ✓ Determinarea cantitativă a polifenolilor, flavonoidelor și acizilor fenolici totali prin metode spectrofotometrice;
- ✓ Identificarea și cuantificarea compușilor chimici din plante utilizând metoda LC/MS (Cromatografie lichidă / spectrometrie de masă);
- ✓ Determinarea potențialului efect antioxidant al extractelor testate prin metodele FRAP și DPPH;
- ✓ Evaluarea efectului antimicrobian al extractelor testate asupra a șase tulpini de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29219, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 și *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

S3 Evaluarea *in vitro* a potențialului citotoxic al plantelor medicinale incluse în studiul 2, asupra celulelor epiteliale intestinale de șobolan:

- ✓ Prepararea culturii de celule epiteliale intestinale de șobolan;

- ✓ Evaluarea viabilității celulare prin testul MTT;
- ✓ Determinarea prin metode statistice a corelației dintre principalele clase de compuși chimici analizați (polifenolii, flavonoidele și acizii fenolici totali) și efectul citotoxic al extractelor etanoliche incluse în studiu.

S4 Investigarea *in vivo* a siguranței și potențialelor efecte toxice dependente de doză ale extractului obținut din *I. helenium*, selectată în urma analizei rezultatelor obținute în cadrul studiilor 2 și 3, utilizând modelul experimental murin:

- ✓ Efectuarea testului de toxicitate acută prin metoda Up and Down și determinarea prin metode statistice a dozei letale medii (DL₅₀);
- ✓ Adaptarea unui protocol complex de testare *in vivo* a toxicității subacute (28 de zile) și subcronice (56 de zile);
- ✓ Evaluarea impactului asupra sistemului digestiv prin determinarea parametrilor de creștere și a structurii populației bacteriene intestinale;
- ✓ Evaluarea potențialului toxic sistemic al extractului apos de *I. helenium*, prin intermediul examenelor: histologice, imunohistochimice, hematologice și biochimice.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată „*Model experimental de evaluare in vitro și in vivo a eficacității și toxicității extractelor vegetale*” este structurată în două părți: Partea I - Stadiul actual al cunoașterii și Partea II - Contribuții personale, cuprinzând un număr total de 162 de pagini, 43 figuri, 28 tabele și 274 de referințe.

PARTEA I - Stadiul actual al cunoașterii

Prima parte a tezei de doctorat este structurată în 2 capitole și cuprinde 30 de pagini. **Capitolul I** este intitulat „Coexistența și interacțiunea dintre „parazitom”, microbiomul intestinal și gazdă” și cuprinde 3 subcapitole, care sintetizează informații privind mecanismele de interacțiune directe și indirecte dintre microbiomul și „parazitomul” intestinal, dar și importanța acestora pentru organismul animal. **Capitolul II** este intitulat „Plante utilizate în terapia antihelmintică veterinară: de la etnomedicină la terapia științifică modernă” și include 1 subcapitol, în care sunt prezentate noțiunile legate de fitoterapie și compuși bioactivi din plante, dar și mecanismele de acțiune a principalelor clase de compuși chimici cu activitate antihelmintică. De asemenea, capitolul conține o sinteză a datelor existente privind utilizările în etnomedicină, activitățile biologice și compoziția chimică a șapte specii de plante medicinale cu potențial antihelmintic existente în flora spontană a României: *Cichorium intybus* L., *Inula helenium* L., *Gentiana asclepiadea* L., *Achillea millefolium* L. s.l., *Artemisia absinthium* L., *Tanacetum vulgare* L. și *Centaureum erythraea* Rafn.

PARTEA II - Contribuția personală

Partea a II-a este structurată în 8 capitole și are un număr de 84 de pagini. În această parte sunt prezentate ipoteza de lucru și obiectivele generale ale cercetării, materialele și metodele utilizate, rezultatele studiilor efectuate, concluziile generale, recomandările formulate pe baza rezultatelor obținute, originalitatea și contribuțiile inovative a tezei.

Capitolul III este intitulat "Ipoteza de lucru și obiectivele cercetării" și constă în expunerea ipotezei de lucru, scopului, obiectivului general și obiectivelor specifice a tezei.

Capitolul IV este denumit "Materiale și metode – aspecte generale" și prezintă pe scurt modul de organizare al investigațiilor, materialul vegetal, biologic și compuși chimici utilizați în cercetare, dar și metodele de analiză statistică aplicate.

Capitolul V prezintă **Studiul I** intitulat "Evaluarea *in vitro* a efectului antihelmintic al unor extracte vegetale asupra strongililor intestinali de la *Equus asinus*". În acest studiu s-a evaluat efectul ovicid și larvicid a 6 extracte apoase de *I. helenium*, *G. asclepiadea*, *A. millefolium*, *A. absinthium*, *T. vulgare* și *C. erythraea*, pe nematode intestinale izolate de la specia *Equus asinus*. Cele 6 specii de plante incluse în studiu se regăsesc în compoziția antihelminticelor din plante (ceaiuri, capsule, comprimate), comercializate în România. De asemenea, au fost identificate morfologic 200 de larve infestante L3 de strongili și clasificate în cele două subfamii: Cyathostominae și Strongylinae.

Capitolul VI prezintă **Studiul II** intitulat "Caracterizarea fitochimică a extractelor de *Inula helenium* și *Gentiana asclepiadea*", a cărui scop a fost determinarea compoziției chimice și potențialul efect antioxidant și antibacterian al extractelor etanolice. Speciile *I. helenium* și *G. asclepiadea* au fost selectate pentru acest studiu în baza rezultatelor obținute în Studiul I. Cantitatea totală de polifenoli, flavonoide și acizi fenolici a fost determinată prin metode spectrofotometrice, iar prin metoda LC/MS au fost identificați și cuantificați compuși chimici din plante. Pentru determinarea efectului antioxidant al extractelor etanolice au fost utilizate metodele FRAP și DPPH. Evaluarea acțiunii antimicrobiene s-a realizat prin metoda microdiluției în bulion și difuzimetrică în agar, cu godeuri, fiind calculate ulterior CMI, CMB și indicele CMI. Prin analiza statistică a datelor obținute a fost determinată corelația dintre principalele clase de compuși chimici analizați (polifenoli, flavonoide și acizi fenolici totali) și efectul antioxidant și antibacterian al extractelor.

Capitolul VII prezintă **Studiul III** intitulat "Efectul *in vitro* al extractelor etanolice de *Inula helenium* și *Gentiana asclepiadea* asupra viabilității enterocitelor". Scopul acestui studiu a fost determinarea potențialului efect toxic al extractelor etanolice de *I. helenium* și *G. asclepiadea* asupra enterocitelor, care vin în contact direct cu extractul, lumenul intestinal fiind locul unde extractele acționează asupra paraziților. Metoda MTT a fost utilizată pentru determinarea viabilității celulare, iar

prin intermediul prelucrării statistice a datelor a fost calculată valoarea concentrației inhibitorii 50% (CI₅₀) și stabilită corelația dintre clasele de compuși chimici analizați în Studiul II și efectul citotoxic al extractelor.

Capitolul VIII prezintă **Studiul IV** intitulat "Studiu de toxicitate acută, subacută și subcronică – Model experimental". Scopul acestui studiu a fost elaborarea unui protocol complex de evaluare ante- și postmortem a potențialului toxic *in vivo* al extractelor vegetale asupra organismului. Specia *I. helenium* a fost selectată în urma eliminărilor etapizate, efectuate la fiecare etapă a cercetării, dar și în baza cercetărilor bibliografice. Rădăcina de *I. helenium* prezintă efect antihelmintic, antibacterian selectiv, antioxidant și prebiotic, respectiv posedă capacitatea de a modula biomul intestinal. În acest capitol se regăsesc informații referitoare la impactul administrării orale a extractului, în doză unică (toxicitate acută) sau doze repetate (toxicitate subacută și subcronică), asupra comportamentului animalului, hemoleucogramei, parametrilor de creștere, populației bacteriene intestinale, sistemului digestiv și excretor.

Capitolul IX se intitulează "Concluzii generale și recomandări" și include principalele concluzii și recomandări desprinse din cele 4 studii realizate în prezenta cercetare. **Capitolul X** se intitulează "Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei", reprezentând sinteza principalelor elemente de originalitate a tezei și aportul în vederea elaborării unui protocol complex *in vitro* și *in vivo* de testare a plantelor medicinale.

REZULTATELE CERCETĂRII

Capitolul V (Studiul I).

Testul de eclozionare a ouălor (EHA). Extractul apos din rădăcină de *I. helenium* a manifestat un efect puternic ovicid ($p < 0.01$) la concentrații cuprinse între 125 și 0.976 mg/mL, CL₅₀ având o valoare relativ mică de 0.041 mg/mL (95% CI 0.01 - 0.16). *A. absinthium* a prezentat un efect puternic ovicid ($p < 0.01$) la concentrații cuprinse între 125 și 3.9 mg/mL, valoarea CL₅₀ fiind de 0.486 mg/mL (95% CI 0.21 - 1.09). Urmate în ordine descrescătoare de extractele de *A. millefolium*, *T. vulgare* și *G. asclepiadea*. Extractul de *C. erythraea* nu a manifestat un efect dependent de concentrație, având un efect ovicid slab.

Testul de dezvoltare larvară (LDA). Extractele apoase de *G. asclepiadea* și *I. helenium* au prezentat efect puternic inhibitor asupra dezvoltării larvare la concentrații de 125 - 0.976 mg/mL, având valoarea CL₅₀ de 0.36 (95% CI 0.19 - 0.72) și respectiv 0.41 (95% CI 0.27 - 0.62) mg/mL. Urmate în ordine descrescătoare de extractele de *A. millefolium*, *T. vulgare* și *A. absinthium*. Cel mai slab efect antihelmintic împotriva larvelor de stadiul L3 a fost observat în cazul *C. erythraea*.

Identificarea larvelor. Din numărul total de larve L3 identificate, nematodele din subfamilia Cyathostominae au reprezentat 74%. *Cyathostomum sensu latum* de tipul A (27%), tipul C (20%) și *Trichostrongylus axei* (10%) au avut frecvența cea mai

mare. Cinci specii (26% din totalul de specii identificate) au aparținut subfamiliei Strongylineae.

Capitolul VI (Studiul II).

Cantitatea totală de polifenoli (TPC), flavonoide (TFC) și acizi fenolici (TPA). Valorile TPC, TFC și TPA ale extractului etanolic de *I. helenium* sunt semnificativ statistic ($p < 0.05$) mai mari comparativ cu cele ale extractului de *G. asclepiadea* (Tabel 1). Diferența TPC dintre *I. helenium* și *G. asclepiadea*, a fost confirmată ulterior de diferențele de concentrație a acizilor cafeic și clorogenic identificați și cuantificați prin intermediul analizei LC/MS, în ambele plante.

Tabel 1

Conținutul total de polifenoli (TPC), flavonoizi (TFC) și acizi fenolici (TPA) din extractele de *Gentiana asclepiadea* și *Inula helenium*

Proba	TPC (g GAE/100 g material vegetal uscat)	TFC (g RE/100 g material vegetal uscat)	TPA (g CAE/100 g material vegetal uscat)
<i>G. asclepiadea</i>	2.144 * $\pm$ 0.088	0.280 * $\pm$ 0.014	0.224 * $\pm$ 0.030
<i>I. helenium</i>	3.066 * $\pm$ 0.041	0.602 * $\pm$ 0.016	1.182 * $\pm$ 0.017

Fiecare valoare reprezintă media $\pm$ deviația standard a trei măsurători independente. GAE: acid galic echivalent; RE: rutin echivalent; CAE: acid cafeic echivalent; * $p < 0.05$ *G. asclepiadea* vs. *I. helenium*.

Compușii chimici identificați prin metoda LC/MS. Compușii majori identificați în rădăcina de *I. helenium* în cadrul analizei LC/MS a extractului au fost acidul cafeic (234.0 ± 2.1 μ g/g material vegetal uscat), acidul clorogenic (2284.1 ± 11 μ g/g m.v. uscat), crisina, luteolina și hesperetina. De asemenea, extractul de *I. helenium* conține luteolin-7-O-glucozidă și naringenină. Compușii majori identificați în rădăcina de *G. asclepiadea* au fost: amarogentina (27.8 ± 0.3 μ g/g m.v. uscat), apigenina, luteolină-7-O-glucozida, naringenina și rutozida. În plus față de compușii menționați anterior, în extractul din rădăcină de *G. asclepiadea* au mai fost identificați: acidul *trans-p*-cumaric (192.8 ± 1.0 μ g/g m.v. uscat), acidul cafeic (169 ± 1.2 μ g/g m.v. uscat), acidul clorogenic, luteolina și cantități necuantificabile de acid salicilic, crisină și quercetină. Prezența amarogentinei în rădăcinile de *G. asclepiadea* a fost raportată de Szucs și colab. (2002), dar în cantități necuantificabile. Identificarea amarogentinei în cantități cuantificabile în rădăcina de *G. asclepiadea* din flora spontană a României este de importanță științifică majoră datorită scăderii semnificative a populațiilor altor specii de *Gentiana* de interes medical (*G. lutea*, *G. punctata*, *G. dinarica*).

Capacitatea antioxidantă. În urma analizei rezultatelor obținute, putem afirma că ambele extracte posedă capacități antioxidante semnificative (Tabel 2), iar potențialul antioxidant al *I. helenium* a fost semnificativ mai mare ($p < 0.05$) decât cel al *G. asclepiadea*. Coeficientul Pearson stabilit între rezultatele testului FRAP și concentrației de TPC, TFC și TPA ($r^2 = 0.999$, $r^2 = 0.996$, și $r^2 = 0.999$, respectiv, $p < 0.05$) și corelația negativă dintre valorile DPPH și compușii menționați anterior ($r^2 = -0.999$, $r^2 = -0.997$, și $r^2 = -0.999$, respectiv, $p < 0.05$), confirmă faptul că activitatea antioxidantă a extractelor vegetale depinde de conținutul TPC, TFC și TPA.

Tabel 2

Capacitatea antioxidantă a extractelor etanolicе din rădăcină de *I. helenium* și *G. asclepiadea*

Proba	FRAP ($\mu\text{mol TE} / 100 \text{ mL de Extract}$)	DPPH, IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>I. helenium</i>	629.04 $\pm$ 2.07	173.2 $\pm$ 3.40
<i>G. asclepiadea</i>	145.23 $\pm$ 3.60	363.7 $\pm$ 0.89

Valorile reprezintă media $\pm$ deviația standard a trei măsurători independente, * $p < 0.05$ *G. asclepiadea* vs. *I. helenium*. FRAP – ferric reducing antioxidant power; DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Activitatea antibacteriană. Eficacitatea antimicrobiană a extractelor testate a variat în funcție de tipul de bacterie, ambele plante având efect inhibitor crescut împotriva speciilor Gram-pozitive (*Bacillus cereus* > *Staphylococcus aureus* > *Enterococcus faecalis*), comparativ cu cele Gram-negative. Valorile diametrului zonelor de inhibiție a extractelor testate au fost semnificativ scăzute ($p < 0.05$) în comparație cu cele a gentamicinei. *S. aureus* și *B. cereus* au manifestat o susceptibilitate crescută la combinația dintre cele două extracte, valorile obținute fiind similare celor induse de acțiunea gentamicinei ($p > 0.05$). Valorile indicelui CMI au evidențiat în mod clar activitatea bactericidă a ambelor extracte testate (CMB/CMI ≤ 4).

Capitolul VII (Studiul III).

Rădăcină de *G. asclepiadea* (Fig. 1a) nu a manifestat efect citotoxic asupra culturii celulare intestinale de șobolan la nici una dintre concentrațiile testate (0.0079–0.4726 $\mu\text{mol GAE/mL}$), viabilitatea celulară fiind cuprinsă între 94.83 ± 3.58 și $74.89 \pm 0.97\%$, iar valoarea CI_{50} a fost de $1.1097 \pm 0.028 \mu\text{mol GAE/mL}$. A fost observată o corelație liniară puternică între viabilitatea celulară și conținutul TPC ai extractului.

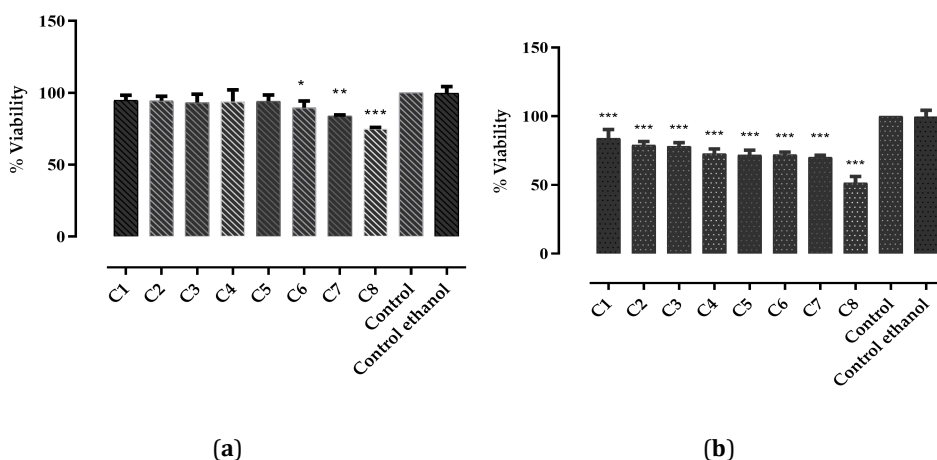


Fig. 1 Efectele inhibitorii a extractelor etanolicе din rădăcină de (a) *G. asclepiadea* și (b) *I. helenium* asupra celulelor epiteliale intestinale de șobolan, la opt concentrații diferite C1-C8 calculate în funcție de conținutul TPC ($\mu\text{mol GAE/mL}$ extract): cu valori cuprinse între 0.0079 și 0.4786 pentru *G. asclepiadea*, și de la 0.0135 la 0.8068 pentru extractul de *I. helenium*. Control – celule netratate, Control etanol – celule tratate cu etanol. Valorile sunt reprezentate ca medie $\pm$ DS. Diferențele semnificativ statistice dintre celulele tratate și netratate (control): * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

La concentrații cuprinse între 0.0135 și 0.5379 $\mu\text{mol GAE/mL}$, extractul etanolic din rădăcină de *I. helenium* nu a manifestat efect citotoxic, viabilitatea celulară variind între 83.92 ± 6.37 și $70.11 \pm 1.55\%$ (Fig. 1b). La concentrația de 0.8068 $\mu\text{mol GAE/mL}$, a fost observat un efect citotoxic puternic, viabilitatea celulară fiind de $51.54 \pm 4.68\%$. Valoarea CI_{50} a fost de $0.9093 \pm 0.016 \mu\text{mol GAE/mL}$. Ca și în cazul extractului de *G. asclepiadea*, a fost observată o corelație liniară puternică între efectul citotoxic al extractului de *I. helenium* și concentrația de TPC ($r^2 = 0.9485$).

Capitolul VIII (Studiul IV).

Toxicitate acută – RGS. În cadrul studiului de toxicitate acută prin metoda Up and Down, nu au fost observate simptome de toxicitate la nici una dintre dozele administrate (175 – 5000 mg/kg). Doza letală medie 50% pentru extractul apos de *I. helenium* a fost considerată mai mare de 5000 mg/kg, extractul fiind clasificat drept substanță practic netoxică.

Toxicitate subacută și subcronică. Animalele ($n = 24$, 12 femele și 12 masculi) au fost împărțite în 3 loturi: Lotul 1 - martor, Lotul 2 - doza de 300 mg/kg de extract, Lotul 3 - 600 mg/kg. Extractul apos de *I. helenium* a fost administrat zilnic, prin gavaj, pe parcursul a 28 de zile (toxicitate subacută), în ziua 29 a fost realizată sacrificarea de control, fiind sacrificați câte 4 șobolani (2 femele și 2 masculi) din fiecare lot. Animalele rămase în studiu au continuat să primească zilnic extractul pentru încă 28 de zile, în ziua 57 fiind efectuată sacrificarea finală (toxicitate subcronică).

Sporul în greutate și rata de conversie a hranei. Deși valorile sporului în greutate (Fig. 2) și a ratei de conversie a hranei au fluctuat pe parcursul celor 8 săptămâni de studiu, acestea s-au încadrat în limitele fiziologice ale speciei și nu pot fi atribuite administrării de extract.

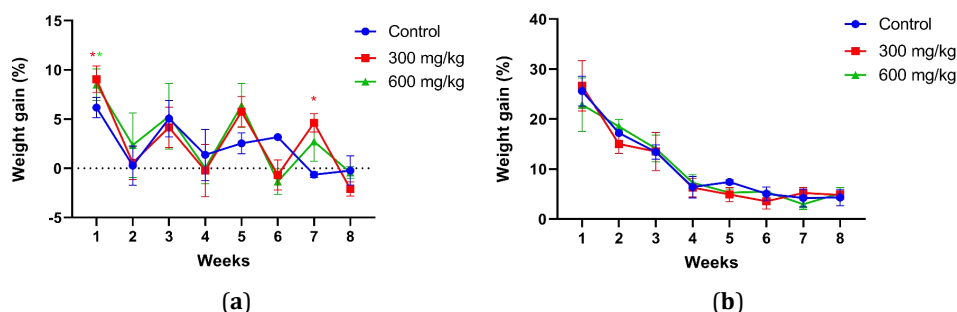


Fig. 2 Sporul în greutate săptămânal al a) femelelor și b) masculilor tratați cu concentrații diferite de extract de *I. helenium*. Diferențele marcate cu asterisc au fost semnificative statistic în comparație cu lotul 1 ($p \leq 0.05$)

Populația bacteriană intestinală. Au fost identificate cu ajutorul analizatorului Vitek®2 – Compact 15 system tulpini de: *Escherichia coli*, *Staphylococcus lentus*, *Enterococcus faecium* și *Proteus mirabilis*. Bacteriile identificate fac parte din populația normală a microflorei intestinale de la șobolan (AL-NAJJAR și colab., 2021).

Examenul necropsic și greutatea relativă a organelor (GRO). Rezultatele examenului necropsic au relevat absența modificărilor macroscopice la nivelul sistemului digestiv, excretor, respirator, cardiocirculator, limfatic și reproducător. Nici în cazul GRO nu au fost observate diferențe semnificativ statistice între loturi, la nici una dintre dozele testate.

Examenul histopatologic al probelor colorate prin Tricrom Goldner (TG), a relevat absența leziunilor microscopice la nivelul mucoasei gastrice, intestinului subțire, colonului (Fig. 3). În consecință, putem spune că extractul de *I. helenium* străbate întreg tubul digestiv fără a provoca modificări structurale la nivelul organelor cavitare ale sistemului digestiv, cel puțin nu modificări structurale decelabile prin microscopie optică, la doze de 300 mg/kg și 600 mg/kg. Investigațiile histochemice (colorație PAS - albastru alcian) ale mucoasei gastrice, intestinului subțire și colonului au relevat lipsa acțiunii iritative sau toxice a extractului asupra organelor examinate, producția de mucine ne fiind influențată de doza sau durata de administrare a extractului (Fig. 4).



Fig. 3 Aspectul histologic (colorație TG) al: A) mucoasei gastrice (lot 3, toxicitate subacută) - lipsa leziunilor glandelor fundice (G, săgeată) și criptelor (C); B) mucoasei intestinului subțire (lot 2, toxicitate subacută) - aspectul normal al enterocitelor (vârf săgeată neagră) și glandelor intestinale (vârf săgeată galben), lipsa modificărilor cantitative și calitative a infiltratului celular din lamina propria (săgeată); C) mucoasei colonului (lot 3, toxicitate subcronică) - lipsa leziunilor microscopice la nivelul epiteliului de suprafață (vârf de săgeată neagră), epiteliului glandular (vârf de săgeată galben) și nivel obișnuit al infiltratului din lamina propria (săgeată)

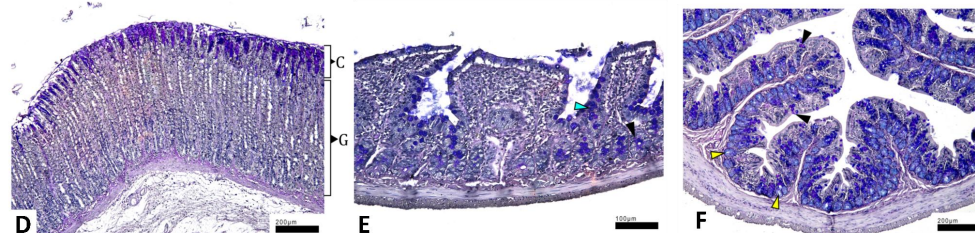


Fig. 4 Aspectul histochemic (colorație PAS - albastru alcian) al: D) mucoasei gastrice (lot 3, toxicitate subacută) - cripte (C) și glandele fundice (G) lipsite de modificări structurale, funcționarea normală a celulelor secretoare de mucine neutre de la epiteliul de suprafață al mucoasei; E) mucoasei intestinului subțire (lot 2, toxicitate subacută) - funcționarea normală a celulelor caliciforme secretoare de mucine neutre (vârf de săgeată albastru) și acide (vârf săgeată neagră); F) mucoasei colonului (lot 3, toxicitate subcronică) - celule PAS pozitive (vârf de săgeată neagră) și celule DCS (vârf de săgeată galben)

Nici examenul histologic al secțiunilor din ficat (colorație TG) nu a evidențiat modificări morfologice decelabile prin microscopie optică, demonstrând că substanțele din extract nu posedă acțiune hepatotoxică. În cadrul analizei imunohistochimice a țesutului hepatic (Fig. 5), expresia biomarkerului anti-caspază-3 la nivel hepatic a variat în funcție de lotul analizat, procentul de celule în apoptoză fiind de 0.64% la lotul 1, 4.32% la lotul 2 și 6.55% la lotul 3, toxicitate subacută. În cadrul studiului de toxicitate subcronică, procentul de hepatocite în apoptoză a fost de 6.55% la lotul 1, 0.66% la lotul 2 și de 1.10% la lotul 3. În urma analizei rezultatelor obținute nu a fost observată o corelație directă între doza de extract administrată și procentul de hepatocite în apoptoză.

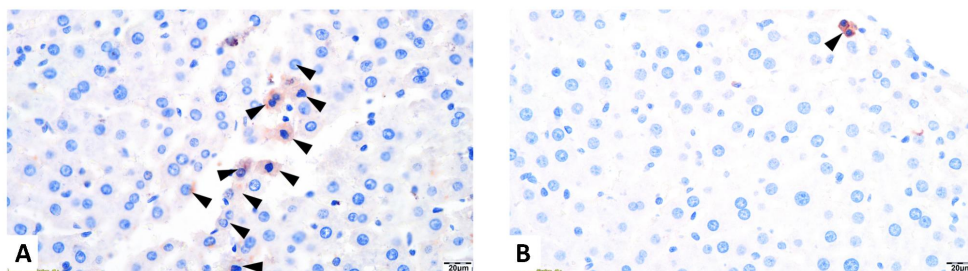


Fig. 5 Expresia biomarkerului anti-caspază-3 la nivel hepatic (șobolani Wistar; contracolorare cu Hematoxilină Mayer). A, B - lot 2 toxicitate subacută și subcronică: exprimarea intracitoplasmatică a markerului anti-caspază-3 la nivelul hepatocitelor (vârf săgeți)

În cadrul examenului histologic al țesutului renal (colorație TG) am urmărit aspectul morfologic al corpusculilor renali și a tubilor proximali, elementele structurale sensibile la modificările sistemice și toxinele din organism. Epiteliul foiței parietale al capsulei glomerulare și ghemul vascular glomerular nu au prezentat modificări patologice, spațiul capsular apare transparent, iar la nivelul tubilor proximali nu există semne de descumare celulară a epitelului simplu cilindric sau acumulări de detritusuri celulare în lumen.

Analiza hematologică și biochimică a sângelui. Oscilațiile ne semnificative ale parametrilor investigați ne indică absența unor modificări structurale și funcționale sau încadrarea acestora în limite fiziologice, care nu depășesc capacitatea de adaptare a organismului animal.

RECOMANDĂRI

Având în vedere lipsa datelor privind mecanismele de acțiune ovicidă și larvicidă, potențialul toxic și valoarea terapeutică a extractelor apoase de *I. helenium*, *A. absinthium*, *G. asclepiadea*, *T. vulgare* și *A. millefolium*, recomandăm efectuarea de studii suplimentare, *in vitro* și *in vivo*, pentru a determina metabolii bioactivi responsabili de activitatea antihelmintică a acestora.

Considerăm că protocolul complex de evaluare *in vitro* și *in vivo* a compoziției chimice, potențialului terapeutic și toxic al extractelor vegetale, elaborat și aplicat de X

noi, reprezintă un model de testare corespunzător. Datorită acestui lucru subliniem importanța:

- Stabilirii corelației dintre compoziția chimică și acțiunea biologică *in vitro* a extractelor vegetale, în vederea identificării compușilor bioactivi sau claselor de metaboliți secundari responsabili de efectul terapeutic al acestora;
- Efectuarea studiilor de citotoxicitate *in vitro* preliminar testării toxicității *in vivo* pentru a determina efectul extractelor asupra celulelor/țesutului țintă și anticipa apariția efectelor adverse *in vivo*;
- Utilizarea modelelor complexe de studiu a toxicității acute, subacute și subcronice, care să includă investigații complexe ante- și postmortem în vederea stabilirii cât mai exacte a concentrațiilor utilizabile în terapia cu extracte vegetale.

BIBLIOGRAFIE

1. AL-NAJJAR, M.A.A., T. ATHAMNEH, R. ABUTAYEH, I. BASHETI, C. LEOPOLD, P. GURIKOV, I. SMIRNOVA, 2021, Evaluation of the orally administered calcium alginate aerogel on the changes of gut microbiota and hepatic and renal function of Wistar rats, *PLoS One*, vol. 16(4): e0247633.
2. ATANASOV, A.G., B. WALTENBERGER, E.M. PFERSCHY-WENZIG, T. LINDER, C. WAWROSCHE, P. UHRIN, V. TEMML, L. WANG, S. SCHWAIGER, E.H. HEISS, J.M. ROLLINGER, D. SCHUSTER, J.M. BREUSS, V. BOCHKOV, M.D. MIHOVILOVIC, B. KOPP, R. BAUER, V.M. DIRSCH, H. STUPPNER, 2015, Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review, *Biotechnology advances*, vol. 33(8), 1582–1614.
3. KHAN, M.S.A., I. AHMAD, 2019, Chapter 1—Herbal Medicine: Current trends and future prospects. in new look to phytomedicine, *Ed. Academic Press: London, UK*, pp. 3–13.
4. SZUCS, Z., B. DÁNOS, S.Z. NYIREDY, 2002, Comparative analysis of the underground parts of *Gentiana* species by HPLC with diode-array and mass spectrometric detection, *Chromatographia*, vol. 56, S19–S23.