

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT FARMACIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA ELENA

Student-doctorand:

COSTEA LILIANA

2022

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT FARMACIE**

**CERCETĂRI PRELIMINARE PRIVIND
FORMULAREA UNUI FITOPREPARAT
ASOCIAT ÎN TRATAMENTUL
HEPATOPATIILOR
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA ELENA

Student-doctorand:

COSTEA LILIANA

2022

Cuprins

Lista cu lucrările științifice publicate	5
INTRODUCERE	9
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	12
1. Date teoretice privind afecțiunile hepatice	12
1.1. Cauzele afecțiunilor hepatice	13
1.2. Categori de pacienți	14
1.3. Simptomatologia patologiilor ficatului	15
1.4. Consecințele clinice ale afecțiunilor hepatice	16
1.5. Tratamentul	17
1.6. Regimul alimentar	18
1.7. Steatoza hepatică	19
1.7.1. Cauzele steatozei hepatice	19
1.7.2. Mecanisme etiologice	20
1.7.3. Simptome și diagnostic	21
1.7.4. Prognostic și tratament	22
2. Acțiunea hepatoregeneratoare, hepatoprotectoare și antihepatotoxică a unor produse / extracte vegetale - Studiu de literatură	24
2.1. Cynarae folium	24
2.2. Rosmarini folium	28
2.3. Agrimoniae herba	31
2.4. Taraxaci herba	34
2.5. Cichorii herba	38
CERCETĂRI PERSONALE	41
3. Stabilirea normei de calitate a produselor vegetale selectate	41
3.1. Determinarea conținutului în principii active	42
3.1.1. Metoda de obținere a soluțiilor extractive hidroalcoolice/apoase	42
3.1.2. Dozarea AFC-urilor din soluțiile extractive	42
3.1.3. Dozarea flavonelor din soluțiile extractive	46
3.1.4. Dozarea polifenolilor totali din soluțiile extractive	49
3.2. Prelucrarea statistică a datelor	53
3.3. Concluzii	57
4. Obținerea extractelor uscate și stabilirea metodologiei de control	58

4.1.	Obținerea extractelor uscate prin liofilizare.....	58
4.2.	Metodologia de control a extractelor vegetale uscate.....	60
4.2.1.	Particularitățile organoleptice ale extractelor uscate.....	60
4.2.2.	Dozarea AFC-urilor din extracte uscate.....	61
4.2.3.	Dozarea flavonelor din extracte uscate	62
4.2.4.	Dozarea polifenolilor totali din extracte uscate.....	63
4.3.	Studiul stabilității extractelor vegetale uscate.....	65
4.4.	Prelucrarea statistică a datelor	68
4.5.	Concluzii.....	70
5.	Analiza cromatografică a compușilor polifenolici din extractele uscate, analiza cluster comparativă a extractelor vegetale și studii de andocare moleculară.....	71
5.1.	Analiza UHPLC-HRMS/MS	71
5.1.1.	Rezultatele obținute prin analiza UHPLC-HRMS/MS.....	74
5.1.2.	Concluzii.....	83
5.2.	Analiza Cluster	83
5.2.1.	Rezultatele analizei Cluster	84
5.2.2.	Concluzii.....	89
5.3.	Simulări de andocare moleculară pentru predicția <i>in silico</i> a interacțiunilor cu ținte biologice.....	90
5.3.1.	Metodologia de modelare <i>in silico</i>	90
5.3.2.	Rezultatele modelării moleculare prin andocare	91
5.3.3.	Concluzii.....	94
6.	Acțiunea antioxidantă a extractelor vegetale în sistem acelular	95
6.1.	Metoda DPPH de determinare a capacității de scavenger a extractelor	95
6.2.	Metoda ABTS de determinare a acțiunii antioxidante.....	98
6.3.	Metoda FRAP de determinare a acțiunii antioxidante.....	100
6.4.	Rezultate și discuții.....	103
6.5.	Prelucrarea statistică a datelor	104
6.6.	Concluzii.....	110
7.	Evaluarea citotoxicității extractelor și amestecului de extracte prin metode alternative	111
7.1.	Formularea și caracterizarea profilului fitochimic al amestecului.....	111
7.2.	Testarea citotoxicității <i>in vivo</i> pe modelul <i>Artemia salina</i> L.....	114
7.2.1.	Materiale și metodă	117
7.2.2.	Rezultate și discuții.....	119

7.2.3.	Concluzii.....	128
7.3.	Studii de citotoxicitate <i>in vivo</i> a extractelor pe modelul <i>Daphnia magna</i>	129
7.3.1.	Materiale și metodă	130
7.3.2.	Rezultate și discuții.....	131
7.3.3.	Concluzii.....	133
7.4.	Determinarea citotoxicității <i>in vitro</i> asupra unor linii celulare de cancer hepatic ...	133
7.4.1.	Materiale și metodă	134
7.4.2.	Rezultate și discuții.....	136
7.4.3.	Concluzii.....	141
8.	Cercetări biochimice și histologice	142
8.1.	Evaluarea influenței extractelor asupra parametrilor biochimici sanguini	142
8.1.1.	Materiale și metodă	143
8.1.1.1.	Protocolul experimental	143
8.1.1.2.	Determinarea glicemiei serice	148
8.1.1.3.	Determinarea proteinelor serice totale	148
8.1.1.4.	Determinarea colesterolului, a HDL-colesterolului și a trigliceridelor.....	148
8.1.1.5.	Determinarea transaminazelor serice	149
8.1.1.6.	Determinarea colinesterazei serice.....	149
8.1.2.	Rezultate și discuții.....	150
8.1.2.1.	Analiza constantelor biochimice în intoxicația acută și cronică	150
8.1.2.2.	Examenul anatomo-patologic macroscopic	155
8.1.3.	Concluzii.....	160
8.2.	Analiza histopatologică și examinarea acțiunii extractelor asupra histologiei hepatice la șobolan	161
8.2.1.	Tehnica histologică.....	161
8.2.1.1.	Tehnica de includere în parafină	162
8.2.1.2.	Tehnica de colorare standard a secțiunilor cu hematoxină-eozină	164
8.2.2.	Rezultate și discuții.....	164
8.2.3.	Concluzii.....	172
8.3.	Influența extractelor asupra statusului redox în omogenate tisulare și suspensii mitocondriale de șobolan	172
8.3.1.	Materiale și metodă	173
8.3.1.1.	Prepararea omogenatelor tisulare	173
8.3.1.2.	Evaluarea capacității antioxidante a țesutului hepatic.....	175

8.3.1.3.	Afectarea sistemelor redox de la nivel tisular	176
8.3.1.4.	Activitatea catalazei la nivel hepatic	176
8.3.1.5.	Evaluarea activității NOS hepatice	177
8.3.1.6.	Evaluarea tiolilor totali.....	177
8.3.1.7.	Conținutul de proteine din omogenate și preparate mitocondriale	178
8.3.2.	Rezultate și discuții.....	178
8.3.3.	Concluzii.....	182
9.	Formularea, obținerea și controlul farmacotehnic al comprimatelor masticabile cu extracte vegetale	183
9.1.	Formularea comprimatelor masticabile cu extracte vegetale.....	183
9.1.1.	Prepararea amestecului pentru comprimare	184
9.1.2.	Evaluarea caracteristicilor fizice ale pulberii pentru comprimare.....	186
9.1.3.	Comprimarea și condiționarea comprimatelor masticabile	192
9.2.	Controlul calității comprimatelor masticabile cu extracte vegetale.....	192
9.2.1.	Controlul organoleptic	192
9.2.2.	Determinarea mărimii comprimatelor	193
9.2.3.	Determinarea uniformității masei	194
9.2.4.	Determinarea timpului de dezagregare al comprimatelor neacoperite	197
9.2.5.	Determinarea pH-ului	198
9.2.6.	Rezistența mecanică la rupere	198
9.2.7.	Friabilitatea comprimatelor	200
9.3.	Concluziile procesului de formulare și control.....	201
	Concluzii finale și contribuții personale	202
	BIBLIOGRAFIE	208
	ANEXE.....	230

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Liliana Costea**, Manuela Ghica, Teodora Costea, Cerasela Elena Gîrd. Spectrophotometric evaluation of flavonoids, phenolcarboxylic acids and total phenolic contents of several indigenous herbal products with potential hepatoprotective effect (2021). *Farmacia*, 69(6), 1176-1181, revistă indexată ISI, cu factor de impact **1.433**, ISSN: 2065-0019 (for the Online Edition) and 0014-8237 (for the Printed Edition), link: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.6.23>
2. **Liliana Costea**, Carmen Lidia Chițescu, Rica Boscencu, Manuela Ghica, Dumitru Lupuliasa, Dragoș Paul Mihai, Teodora Deculescu-Ioniță, Ligia Elena Duțu, Maria Lidia Popescu, Emanuela-Alice Luță, George Mihai Nițulescu, Octavian Tudorel Olaru, Cerasela Elena Gîrd. The polyphenolic profile and antioxidant activity of five vegetal extracts with hepatoprotective potential (2022). *Plants*, 11(13), 1680, revistă indexată ISI, cu factor de impact **4.658**, ISSN: 2223-7747 (for the Online Edition), link: <https://doi.org/10.3390/plants11131680>

Participări la sesiuni de postere din cadrul simpozioanelor sau congreselor naționale sau internaționale cu publicarea rezumatelor

1. **Liliana Costea**, Cerasela Elena Gîrd. Preliminary research on formulation of a phytopreparation with antioxidant and hepatoprotective effects (2018). International Symposium - Priorities of chemistry for a sustainable development - PRIOCHEM XIV (ICECHIM), 14th edition, București, 10-12 octombrie, rezumat publicat în *Volume of summaries (Section 2: Bio-resources, biotechnologies and biorefining)*, ISSN: 2601-4203 (for the Online Edition) and ISSN: 2601-4181 (for the Printed Edition)
2. **Liliana Costea**, Cerasela Elena Gîrd. Research on the formulation of a phytomedicine associated in the treatment of liver diseases. Obtaining and establishing the extraction procedure for vegetal extracts (2021). Congresul Național de Farmacie Ediția a XVIII-a, Oradea, 15-17 septembrie, rezumat publicat în *Broșura Congresului: Farmacia. De la inovare la buna practică farmaceutică*, ISBN: 978-606-10-2144-4
3. **Liliana Costea**, Cerasela Elena Gîrd. Preliminary research on the chemical composition of a phytopreparation with antioxidant and hepatoprotective effects (2021). Symposium with international participation: Alternative and complementary therapies (Homeopathy/Phytotherapy), 4th edition, Constanța, 26-27 martie, rezumat publicat în *Book of abstracts*, ISSN: 2601-1476

Lucrări științifice comunicate la manifestări naționale

- o **Liliana Costea**, Elena Moroșan, Ana Corina Ioniță, Cerasela Elena Gîrd. Biochemical research on a mixture of vegetal extracts with potential use in the treatment of liver disease (2021). Congress of the University of Medicine and Pharmacy „Carol Davila”, IXth edition, București, 25-27 noiembrie, lucrare științifică susținută în cadrul *Sesiunii Tânarul Cercetător - Domeniul Farmacie* (certificată cu *Diplomă de excelență*).

INTRODUCERE

Ficatul, glandă anexă a tubului digestiv, este considerat unul dintre cele mai mari și mai importante organe din corpul uman. Prin localizarea sa, ficatul reprezintă o adevărată „ecluză hemodinamică și metabolică” funcțională prin intermediul căreia se realizează permanent un echilibru între ceea ce metabolizează sau elimină organismul și ceea ce primește organismul din exterior prin aport alimentar, medicamentos sau prin substanțe exogene. Este unicul organ din corp care posedă capacitatea remarcabilă de autoregenerare, dar și al doilea organ, după creier, care poate fi atacat de radicalii liberi, fiind considerat din multe puncte de vedere „laboratorul central” al organismului datorită importanței primordiale pe care o are în desfășurarea normală a proceselor vitale esențiale. Patogenia afecțiunilor hepatice este foarte complexă și studiată, iar cei mai importanți factorii implicați sunt produșii de metabolism rezultați (lipidic, acido-bazic) și dereglările energo-dinamice, endocrino-metabolice sau neurovegetative, care generează modificări severe la nivelul principalelor funcții și organe. Cu toate acestea, identificarea unor compuși hepatoprotectori care să prevină aceste alterări sau care să regenereze complet funcțiile și structurile afectate se află încă într-un plin proces de extindere continuă prin testarea diferiților constituenți și căutarea surselor care să ofere produși cu efect hepatoregenerator evident, dar lipsiți de efecte secundare sau de reacții adverse.

Justificarea temei de cercetare constă în existența pe piața farmaceutică a numeroaselor preparate vegetale insuficient testate, care nu sunt standardizate corespunzător astfel încât pacientului să îi fie garantate condițiile de calitate ale fitopreparatului și să îi sporească acestuia încrederea în rezultatele terapeutice evidente care vor apărea pe parcursul tratamentului adjuvant ales. De asemenea, identificarea și cercetarea unor compuși cu rol antihepatotoxic este de un real folos în terapia adjuvantă a afecțiunilor hepatice și nu numai, iar extractele fitoterapeutice reprezintă o sursă bogată în asemenea compuși, deoarece solventul folosit pentru extracția principiilor active poate determina o solubilizare mult mai bună a acestora și implicit o absorbție mult îmbunătățită în organism cu apariția efectului terapeutic dorit, criteriul esențial fiind standardizarea lor, precum și cuantificarea acțiunilor terapeutice la diferite categorii de pacienți. În contextul clinic actual, în care pacientul, care prezintă deja polipatologii asociate și trăiește într-un mediu poluat la cote mult crescute (aer, apă, alimentație), este supus polipragmaziei, polimedației adiacente și ulterior adăugării la schema de posologie și a suplimentelor alimentare nstandardizate și insuficient testate și caracterizate chimic, celula hepatică este expusă unui stres oxidativ permanent, este nevoită să își îndeplinească funcțiile în condiții ostile și alterate biologic și enzimatic, iar capacitățile sale de detoxifiere a produșilor endogeni sau exogeni pot fi cu mult depășite, ceea ce conturează un tablou structural, celular și bioumoral modificat cu multiple

suferințe clinice și dereglări metabolice grave. Astfel, necesitatea cercetării și standardizării unui fitomedicament, care să poată interveni optim la nivel hepatocitar, îndeplinind efecte terapeutice adjuvante benefice pentru prevenirea apariției afecțiunilor hepatice, pentru scăderea frecvenței în populație a acestora, pentru ameliorarea sau vindecarea lor, creează premisele acestui drum științific în care tematica abordată este pe deplin justificată și la capătul căruia se află binele și sănătatea pacientului. Pornind de la toate aceste aspecte, scopul prezentei lucrări este realizarea unei analize farmacognostice și fitofarmacologice a unei noi propuneri de fitopreparat pe bază de extracte vegetale cu acțiune hepatoprotectoare, antihepatotoxică, hepatoregeneratoare și antioxidantă.

Obiectivele cercetării sunt: selectarea unor materii prime vegetale ca potențială sursă de compuși cu rol hepatoprotector, antihepatotoxic, hepatoregenerator și antioxidant; stabilirea profilului fitochimic al materiilor vegetale selectate, prin analize de profil; întocmirea metodologiei de obținere a extractelor vegetale, în contextul determinării tipului de solvent și a procedurii de extracție care permite cuantificarea unei cantități mari de principii bioactive; determinarea stabilității extractelor vegetale, la intervale diferite de timp; conturarea profilului fitochimic prin analize specifice fitochimiei (dozări spectrofotometrice și HPLC); determinarea citotoxicității extractelor prin metode alternative; testarea acțiunii antioxidante în sistem acelular, ca marker important în evaluarea efectului hepatoprotector și antiradicalar *in vitro* al extractelor; stabilirea profilului biochimic al extractelor prin analize specifice domeniului pentru evaluarea influenței asupra parametrilor biochimici caracteristici, în urma administrării la animalele de experiență; evaluarea capacității antioxidante și afectarea redox la nivelul țesutului hepatic prin analiza omogenatelor tisulare hepatice; evaluarea efectelor benefice la nivelul hepatocitului prin analiza histologică a probelor de ficat prelevate de la animalele de laborator supuse testărilor; evidențierea efectelor induse de către extracte asupra liniilor celulare HepG2 de carcinom hepatocelular; stabilirea parametrilor farmacotehnici de proiectare a unor forme farmaceutice pe baza extractelor vegetale analizate; diseminarea rezultatelor cercetării în reviste de specialitate din fluxul științific internațional.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Date teoretice privind afecțiunile hepatice

Acest capitol conține informații despre: cauzele afecțiunilor hepatice, categoriile de pacienți cu risc, simptomatologia specifică, consecințele clinice, tratamentul, regimul alimentar și steatoza hepatică (cauze, mecanisme etiologice, simptome, diagnostic, prognostic, tratament).

2. Acțiunea hepatoregeneratoare, hepatoprotectoare și antihepatotoxice a unor produse / extracte vegetale - Studiu de literatură

Acest capitol conține informații despre compozițiile chimice precum și efectele benefice la nivelul celulei hepatice induse de diferite surse vegetale/extracte.

CERCETĂRI PERSONALE

3. Stabilirea normei de calitate a produselor vegetale selectate

Pe baza datelor din literatura de specialitate au fost selectate cinci produse vegetale (*Cynarae folium*, *Rosmarini folium*, *Agrimoniae herba*, *Taraxaci herba* și *Cichorii herba*), iar ca metodă de lucru, s-a folosit analiza farmacognostică. S-au dozat prin metode spectrofotometrice flavonele, AFC-urile și polifenolii totali (tabelul III.1).

Tabel III.1. Rezultatele dozărilor spectrofotometrice exprimate ca medie ± SD [1]

Flavone (FL) (g rutozidă/100 g produs vegetal uscat)			
SA70	SA50	SA20	SAA
1.1745 ± 0.0293	1.0332 ± 0.0836	0.9447 ± 0.1638	0.6453 ± 0.0496
SCH70	SCH50	SCH20	SCHA
0.4771 ± 0.0348	0.5596 ± 0.0482	0.4350 ± 0.0116	0.3814 ± 0.0312
SCY70	SCY50	SCY20	SCYA
0.7382 ± 0.0590	0.7497 ± 0.0244	0.4361 ± 0.0476	0.4121 ± 0.0277
SR70	SR50	SR20	SRA
1.0271 ± 0.1130	1.2771 ± 0.0684	0.7991 ± 0.1469	0.1156 ± 0.0099
ST70	ST50	ST20	STA
0.6737 ± 0.0192	0.6497 ± 0.1479	0.9154 ± 0.1138	0.7808 ± 0.1655
AFC (g acid clorogenic/100 g produs vegetal uscat)			
SA70	SA50	SA20	SAA
4.1655 ± 0.2108	4.7469 ± 0.1683	6.5580 ± 0.4671	3.1846 ± 0.1978
SCH70	SCH50	SCH20	SCHA
1.8201 ± 0.0503	1.4614 ± 0.0766	1.4840 ± 0.0273	1.4974 ± 0.1054
SCY70	SCY50	SCY20	SCYA
0.6572 ± 0.1201	0.5643 ± 0.0401	0.6170 ± 0.0697	0.3802 ± 0.0428
SR70	SR50	SR20	SRA
5.6123 ± 0.2365	5.6733 ± 0.7740	4.9732 ± 0.4402	0.8151 ± 0.0582
ST70	ST50	ST20	STA
2.0383 ± 0.1333	2.1674 ± 0.1824	2.6529 ± 0.0438	2.8350 ± 0.0867
Polifenoli totali (PT) (g acid tanic/100 g produs vegetal uscat)			
SA70	SA50	SA20	SAA
8.0232 ± 1.9744	8.5634 ± 0.2243	8.2553 ± 1.1594	4.5732 ± 0.5401
SCH70	SCH50	SCH20	SCHA
2.0884 ± 0.3213	2.1534 ± 0.0303	1.9186 ± 0.0769	1.6393 ± 0.0746
SCY70	SCY50	SCY20	SCYA
1.4222 ± 0.1590	1.1984 ± 0.2579	1.1228 ± 0.1149	0.8756 ± 0.0125
SR70	SR50	SR20	SRA
8.8233 ± 1.1743	8.1027 ± 0.6782	5.1887 ± 0.1836	0.8604 ± 0.0592
ST70	ST50	ST20	STA
2.8415 ± 0.2213	2.9509 ± 0.0486	3.3647 ± 0.3786	3.34 .1058

Luând în considerare rezultatele obținute, etanolul 50° a asigurat extracția optimă a compușilor fenolici pentru toate produsele vegetale studiate, cu excepția păpădiei, pentru care etanolul 20° a fost cel mai bun solvent de extracție.

4. Obținerea extractelor uscate și stabilirea metodologiei de control

În vederea formulării unui fitopreparat care să se adreseze tratamentului hepatopatiilor, s-a urmărit obținerea unor extracte înobilate în constituenți chimici de interes terapeutic. S-a selectat ca metodă liofilizarea, deoarece permite păstrarea integrativă a constituenților activi din punct de vedere terapeutic. În vederea stabilirii metodologiei de control a extractelor uscate obținute s-au analizat particularitățile organoleptice ale acestora, dar s-a urmărit și cuantificarea în constituenții chimici de interes terapeutic prin efectuarea dozărilor de principii active pentru fiecare extract uscat în parte. Determinările efectuate imediat după obținerea extractelor au evidențiat că cele mai bogate în flavone, AFC-uri și polifenoli totali sunt extractele de rozmarin și turiță mare, iar pentru cicoare, păpădie și anghinare valorile concentrațiilor sunt mult mai mici, însă au creșteri uniforme și constante și prezintă relevanță pentru acțiunea terapeutică cercetată. Pentru a putea cuantifica asigurarea eficacității terapeutice a extractelor vegetale uscate în timp și stabilitatea formelor farmaceutice care vor conține aceste extracte uscate trebuie ca principiile active de interes terapeutic din extracte să prezinte o concentrație stabilă în timp care să se păstreze în aceleași limite de variație constante. Astfel, se poate evalua dacă există factori care să determine micșorarea conținutului de principii active al extractelor uscate de la nivelul optim la un nivel mult inferior, fără eficiență clinică. În acest scop, s-au realizat dozări de principii active (AFC-uri, flavone și polifenoli totali) din extractele vegetale uscate pe o perioadă de monitorizare a stabilității concentrațiilor de un an, efectuând determinări cantitative la 3 luni, 6 luni și la 12 luni de la obținere (rezultatele sunt prezentate în fig. 4.1. - 4.3.). Având în vedere interdependența dintre produsul vegetal și principiile active conținute, extractele uscate analizate au prezentat concentrații optime de AFC-uri, flavone și polifenoli totali, constituenți cu importanță terapeutică esențială, care s-au dovedit stabili din punct de vedere fitochimic pe perioada monitorizării. Studiul de stabilitate a extractelor uscate a subliniat activitatea constituenților chimici din extracte chiar și pe parcursul conservării, observându-se fluctuații ale concentrațiilor de la un interval de timp la altul, întrucât principiile active de proveniență vegetală au un comportament atipic și total distinct de cel al substanțelor active de sinteză. Cu toate acestea, în urma interpretării statistice, unica diferență semnificativă statistic s-a obținut pentru conținutul de AFC-uri din extractul de rozmarin, care s-a redus considerabil aproape la jumătate după 12 luni, însă acest comportament era de așteptat ținând cont că acizii fenolcarboxilici sunt principiile active cele mai instabile în timp și cele mai labile, putând fi influențate de numeroși factori. Ceea ce a surprins în această etapă a cercetării a fost, de fapt, evoluția AFC-urilor în celelalte extracte vegetale uscate, înregistrându-se variații mici și

nesemnificative, în pofida profilului cameleonice al acestora. Flavonele și polifenolii totali din extractele uscate s-au dovedit stabili din punct de vedere farmacognostic și fitochimic, păstrându-se nivelul terapeutic optim de-a lungul celor 12 luni pentru toate extractele studiate.

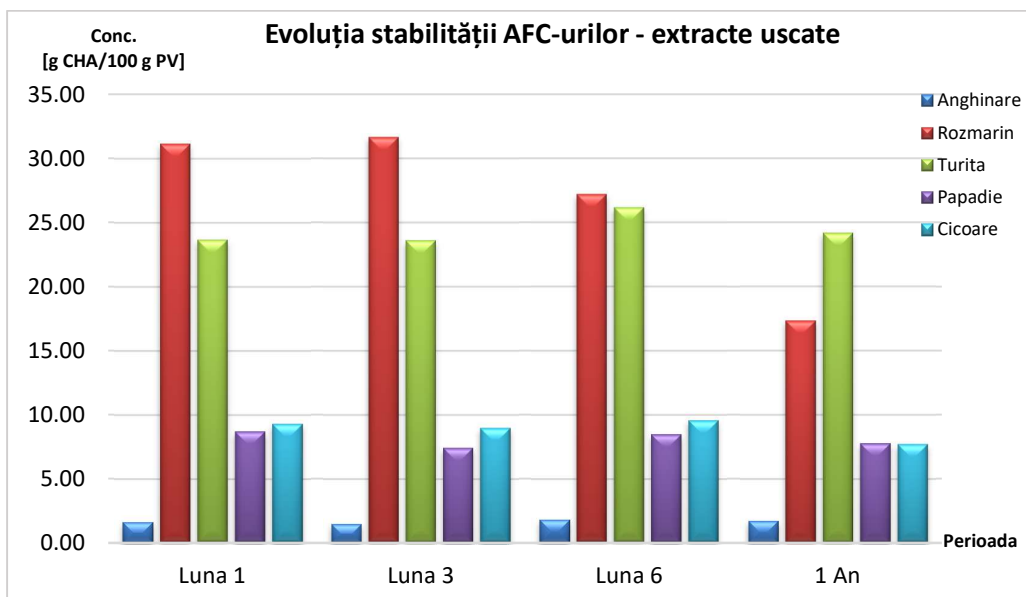


Fig. 4.1. Evoluția concentrației de AFC-uri din extracte uscate

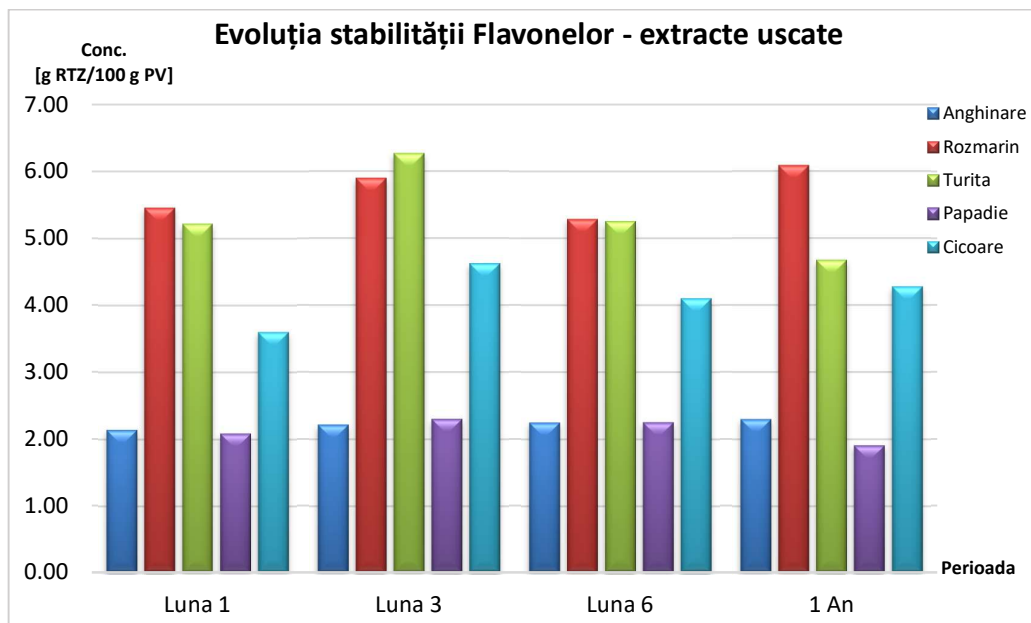


Fig. 4.2. Evoluția concentrației de flavone din extracte uscate

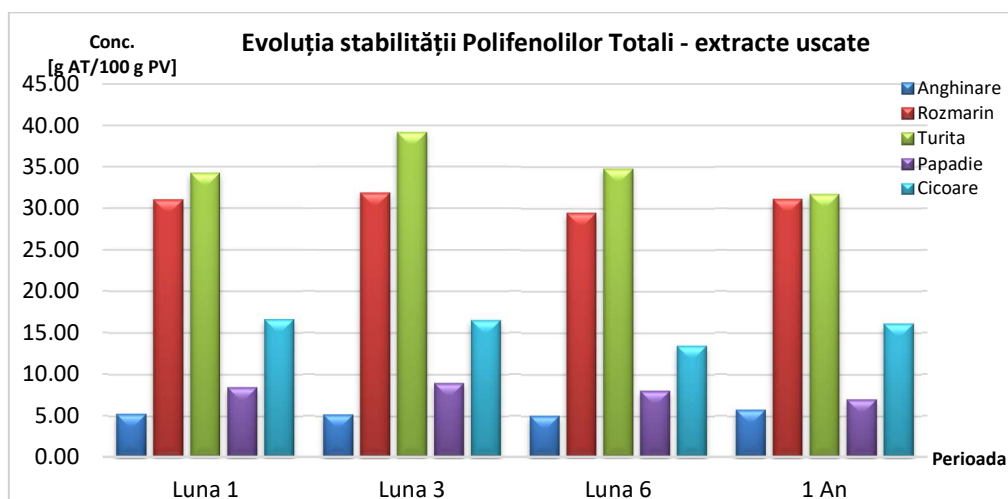


Fig. 4.3. Evoluția concentrației de polifenoli totali din extracte uscate

5. Analiza cromatografică a compușilor polifenolici din extractele uscate, analiza cluster comparativă a extractelor vegetale și studii de andocare moleculară

Spectrul compușilor identificați și cuantificați din punct de vedere cantitativ prin UHPLC-HRMS/MS este dependent de tipul extractului vegetal folosit, compușii identificați făcând parte din clasa flavonoidelor, acizilor fenolcarboxilici și derivaților sesquiterpenici. Astfel, în *Cynarae extractum* (CE) au fost identificați 28 de compuși, în *Rosmarini extractum* (RE) – 48 de compuși, în *Taraxaci extractum* (TE) – 39 de compuși, în *Cichorii extractum* (CHE) – 43 de compuși, iar în *Agrimoniae extractum* (AE) – 31 de compuși. Din analiza rezultatelor obținute, rutozida a fost identificată în toate extractele cu excepția AE, apigenina și kaempferolul în toate tipurile de extracte, acidul clorogenic și acidul cafeic în toate extractele, cu excepția CHE (unde s-a identificat doar acidul clorogenic alături de un izomer al acestuia), vitexina s-a identificat în CE, TE, CHE și AE, cinarina, scolimozida și cinaropicrina s-au identificat în CE, ciorina în CE, RE și CHE, cinarozida și cinarotriozida în TE, CHE și AE, catechina și epicatechina s-au identificat în CHE și AE, acidul azelaic a fost identificat în toate extractele, biochanina A a fost identificată în RE, CHE și AE, genistina și daidzina în CHE, genistina în TE și AE, iar procianidinele condensate (proantocianidine) în TE, CHE și AE. Compușii identificați și cuantificați în extractele vegetale analizate se înscriu în profilul polifenolilor citați de literatura de specialitate. Identificarea pinocembrinului în cantitate mare (43.1 $\mu\text{g/g}$) în *Rosmarini extractum* este în concordanță cu datele de literatură, acest compus fiind identificat inclusiv în mierea de rozmarin, iar profilul chimic al compușilor identificați în TE este, de asemenea, în concordanță cu studiile raportate în literatura de specialitate [2,3].

Din dendrograma extractului de anghinare s-a observat, de exemplu, o dispoziție a compușilor identificați în 4 clustere: primul cluster conține grupați 9 compuși din clasa flavonelor, în cea de-a doua subdiviziune se regăsesc 14 compuși reprezentați de agliconi flavonici, în acest

grup regăsindu-se și doi derivați diterpenici (carnosol și rosmanol) și un compus sesquiterpenic (cinaropicrina), în clusterul 3 se regăsesc grupați compușii fenolici de tipul acidului clorogenic și doi derivați cumarinici, iar în ultima subdiviziune sunt clasați cei doi acizi fenolici, acidul cafeic și acidul azelaic.

Analiza Cluster realizată pentru cele cinci extracte vegetale a arătat o distribuție generală eterogenă într-un număr variabil de clustere pentru toate extractele, rezultatele obținute fiind în corelație directă cu compușii identificați prin metoda UHPLC-HRMS/MS. Astfel, în CE, cei 28 de compuși identificați au fost repartizați în patru grupuri; în RE, TE și AE, deși a fost identificat un număr variabil de compuși, aceștia au fost distribuiți în cinci grupuri fiecare; iar în CHE, unde au fost identificați 43 de compuși, aceștia au fost clasificați în șase grupuri. Analiza de grupare ierarhică de tip Clustering s-a dovedit a fi deosebit de utilă pentru a grupa constituenții chimici din extractele vegetale analizate, transformând practic algoritmi de clasificare complicați care au la bază programe statistice într-o "oglină" transparentă a profilului polifenolic al extractelor, în care compușii prezintă o aranjare organizată și mult simplificată, ținând cont de variația similitudinii dintre aceștia.

Compușii polifenolici determinați au fost evaluați prin andocare moleculară ca potențiali inhibitori ai izoformei 2E1 a citocromului P450 (CYP2E1) și ai factorului alfa de necroză tumorală (TNF- α), dar și ca activatori alosterici ai glutatation-peroxidazei 4 (GPx4). CYP2E1 este o izoformă responsabilă pentru transformarea acizilor grași polinesaturați și a compușilor exogeni în metaboliți toxici, iar inhibarea acesteia poate atenua sau preveni hepatotoxicitatea la nivel celular și tisular. TNF- α este o citokină proinflamatorie care generează inflamație, stres oxidativ și apoptoză hepatocitară, în timp ce GPx4 este o enzimă antioxidantă care previne distrucția hepatocelulară prin suprimarea peroxidării lipidice și a inflamației. Așadar, fitocompușii polifenolici din extractele vegetale pot avea un rol deosebit de important în reglarea alosterică a multor enzime sau structuri biologice esențiale pentru buna funcționare a arborelui hepato-biliar. Aproximativ 23 de compuși polifenolici identificați în probele analizate au fost supuși simulărilor de andocare moleculară pentru a prezice afinitățile lor de legare și interacțiunile moleculare cu potențiale ținte implicate în mecanismul hepatoprotector. Protocolul de andocare a fost validat cu succes prin reandocarea martorilor pozitivi în situs-urile active, cu liganzii reandocați care au prezentat variații mici în configurațiile de poziție. Inhibitorul CYP2E1 a prezentat o energie de legare de -7.776 kcal/mol și 0.1704 Å RMSD după suprapunere pe configurația inițială. Inhibitorul TNF- α a prezentat un scor de andocare de -8.867 kcal/mol și 0.1325 Å RMSD, în timp ce reandocarea activatorului alosteric GPx4 a produs o energie de legare de -6.978 kcal/mol și 0.2691 Å RMSD. Din cei 23 de compuși andocați, 2 liganzi nu s-au potrivit în situs-ul activ al CYP2E1, iar afinitatea de legare nu a putut fi determinată din cauza volumului lor molecular mare (naringina

și rutina/rutozida). Energiile de legare după andocare pe CYP2E1 au variat de la -8.942 kcal/mol la -0.884 kcal/mol, cu o valoare medie de -7.128 ± 1.855 kcal/mol. Pinocembrinul a prezentat cea mai mare afinitate de legare, pe când hiperozida a manifestat cea mai scăzută afinitate pentru CYP2E1. Cea mai mare eficiență a ligandului a fost observată pentru acidul cinamic (0.7417; -8.159 kcal/mol). Zece compuși polifenolici au prezentat afinități mai mari decât martorul pozitiv (pinocembrinul, crisina, apigenina, formononetina, epicatechina, naringenina, catechina, acidul cinamic, acidul *p*-cumaric și acidul abscisic). Energiile de legare pentru TNF- α au variat între -8.998 și -5.673 kcal/mol, cu o valoare medie de -7.382 ± 0.998 kcal/mol. Cea mai scăzută energie de legare a fost observată pentru rutozidă, iar cea mai înaltă energie, pentru acidul siringic. Mai mult, acidul cinamic a arătat cea mai mare eficacitate a ligandului și pentru TNF- α (0.5436; -5.980 kcal/mol). Doar un compus analizat a prezentat afinități de legare mai mari decât martorul pozitiv (rutozida), în timp ce trei compuși polifenolici au prezentat afinități ușor mai mici, dar comparabile (genistina, hiperozida și naringina). Andocarea moleculară care a vizat site-ul de legare alosterică GPx4, a produs energii de legare cuprinse între -7.023 și -4.637 kcal/mol (-6.198 ± 0.789 kcal/mol). Naringina a arătat cea mai mare afinitate pentru situs-ul alosteric GPx4, în timp ce acidul siringic a prezentat afinitatea cea mai mică. Doar doi liganzi au avut energii de legare mai mici decât martorul pozitiv (naringina și genistina), în timp ce alți șase compuși au avut valori similare (apigenina, rutozida, acidul clorogenic, hiperozida, epicatechina și kaempferolul). Interacțiunile dintre CYP2E1 și acidul cinamic sunt deosebit de importante, deoarece acest compus special a arătat o eficiență a ligandului izbitor de mare. Acidul cinamic este implicat în legăturile de hidrogen cu Asn206 prin fragmentul său carboxilic. Complexul proteină-ligand a fost stabilizat în continuare printr-o legătură carbon-hidrogen cu Val239, interacțiuni pi-pi cu Phe298 și interacțiuni van der Waals cu alte nouă resturi din site-ul activ (Fig. 5.1. A, B). Rutozida a arătat cea mai mare afinitate de legare estimată pentru situs-ul de legare al TNF- α . De asemenea, a acționat ca un donor de legături de hidrogen pentru patru resturi (Ser60, Gln61, Tyr119) prin mai multe grupări hidroxil și a format o legătură carbon-hidrogen cu Leu120 (Fig. 5.12. C, D). Mai mult, interacțiunile nepolare, cum ar fi interacțiunile pi-alchil (Tyr59) și interacțiunile van der Waals, au fost, de asemenea, responsabile pentru legarea la situs-ul activ. Apigenina a avut a treia cea mai mare afinitate de legare pentru GPx4 dintre substanțele fitochimice analizate, prezentând, de asemenea, și o valoare bună a eficienței ligandului. Potențialul de legare al apigeninei pe site-ul de legare alosterică GPx4 este susținut de o legătură de hidrogen cu Met102, 2 interacțiuni pi-anion cu Asp21 și Asp23, 2 interacțiuni pi-alchil cu Val27 și Lys90 și 11 interacțiuni de tip van der Waals (Fig. 5.1. E, F). Studiile de andocare moleculară în domeniul fitochimiei se utilizează pentru a prezice orientările preferate ale compușilor analizați, dar și puterea lor de asociere sau afinitatea de legare față de diferite ținte biologice relevante în vederea formării unui complex stabil

cu rol în transmiterea semnalului celular implicat în dinamica efectelor biochimice sau terapeutice (antagonism sau synergism). Astfel, se poate genera *in silico* o analogie a comportamentului în organism a fitoconstituenților din sursele vegetale și se pot prezice modificări conformaționale, acțiuni sau interacțiuni la nivel celular și tisular. Efectul hepatoprotector al compușilor polifenolici a fost ilustrat în urma evaluărilor *in silico* prin interacțiunea acestora cu CYP2E1, TNF- α și GPx4. Reducerea stresului oxidativ, anihilarea toxicității hepatocelulare, atenuarea fibrogenezei, precum și reglarea enzimelor cheie cu rol antioxidant și antiinflamator fiind posibile acțiuni terapeutice benefice ale extractelor luate în lucru, întrucât aceste efecte au fost conturate și confirmate cu ajutorul tehnicilor de modelare moleculară computațională cu rol esențial în proiectarea rațională a fitomedicamentelor [4].

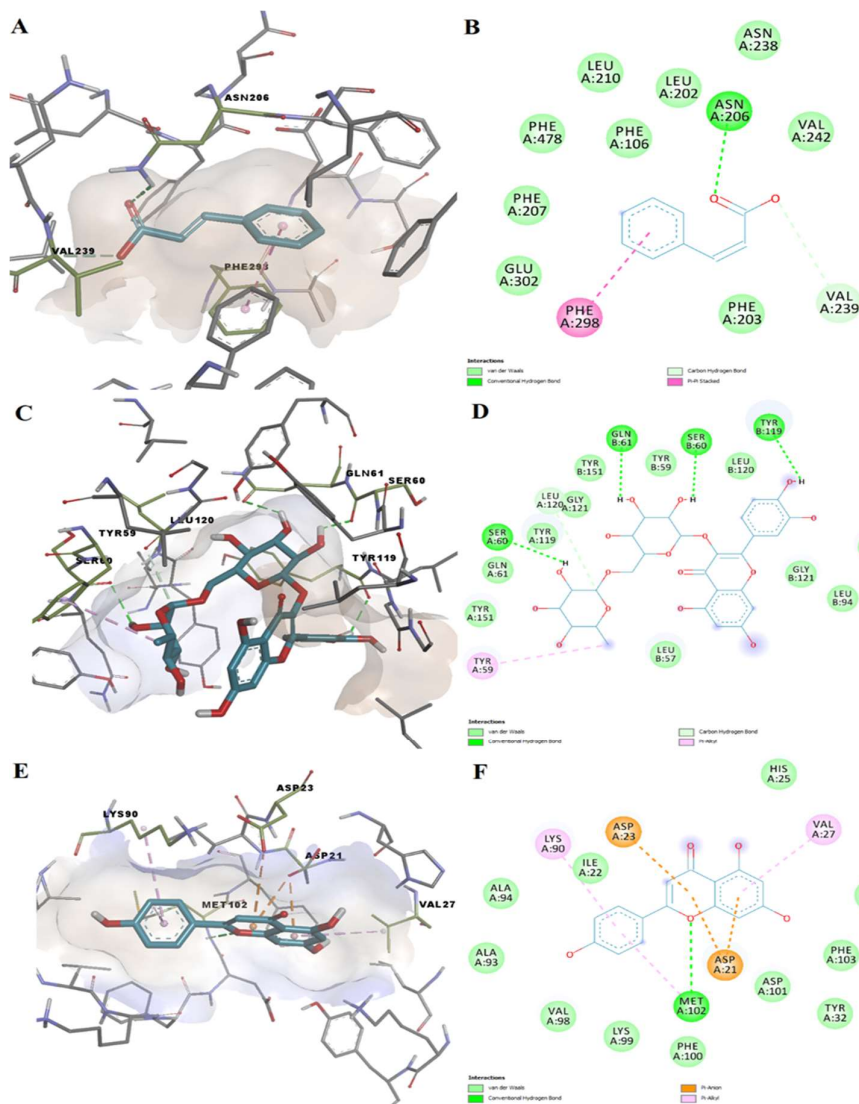


Fig. 5.1. Poziții de andocare și interacțiuni moleculare între liganzii andocați și proteinele țintă. (A) configurația 3D a complexului estimat acid cinamic-CYP2E1; (B) reprezentarea 2D a interacțiunilor proteină-ligand pentru complexul prezis acid cinamic-CYP2E1; (C) configurația 3D a complexului prezis rutozidă-TNF- α ; (D) reprezentarea 2D a interacțiunilor proteină-ligand pentru complexul prezis rutozidă-TNF- α ; (E) configurația 3D a complexului prezis apigenină-GPx4; (F) reprezentarea 2D a interacțiunilor proteină-ligand pentru complexul prezis apigenină-GPx4 [4].

6. Acțiunea antioxidantă a extractelor vegetale în sistem acelular

Efectele antioxidante induse de extractele testate sunt în corelație directă cu concentrația în metaboliți secundari. Comparând rezultatele obținute prin cele trei metode evaluate (Tabel VI.1.) se constată că acțiunile antioxidante cele mai intense sunt induse de *Agrimoniae extractum* (valoarea IC₅₀ cea mai mică prin toate cele 3 metode, comparativ cu celelalte extracte), fapt justificat și prin conținutul cel mai mare de polifenoli în acest tip de extract (31.7017 g acid tanic/100 g extract uscat). De asemenea, se poate observa că, dintre toate extractele analizate, valorile IC₅₀/EC₅₀ obținute pentru *Agrimoniae extractum* sunt mult mai apropiate de valorile antioxidante ale etalonului folosit (acidul ascorbic), ceea ce accentuează acțiunea antiradicalară superioară a extractului de turiță comparativ cu celelalte probe.

Tabel VI.1. Acțiunea antioxidantă a extractelor exprimată prin valoarea IC₅₀ [4]

Extract vegetal	Metoda DPPH	Metoda ABTS	Metoda FRAP
	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ (mg/mL)
<i>Cynarae extractum</i>	0.6596	0.1588	0.5413
<i>Rosmarini extractum</i>	0.0900	0.0297	0.0537
<i>Taraxaci extractum</i>	0.3121	0.0752	0.2745
<i>Cichorii extractum</i>	0.1954	0.0539	0.2012
<i>Agrimoniae extractum</i>	0.0537	0.0147	0.0483

Acțiunea antioxidantă imprimată de aceste extracte a prezentat o legătură puternică directă cu conținutul de polifenoli evaluat în extractele analizate. Luând în considerare rezultatele obținute prin cele 3 metode de cuantificare a efectului antioxidant (DPPH, ABTS, FRAP), se poate afirma că toate extractele luate în lucru prezintă un nivel ridicat al acțiunii antiradicalare datorită compușilor vegetali identificați în probe (AFC-uri, flavone, polifenoli totali). Varietatea mare de compuși chimici identificați în studiu prin tehnica UHPLC-HRMS/MS, arată o evaluare a acțiunii antioxidante a extractelor vegetale mult mai adecvată utilizând cel puțin 3 metode de determinare diferite pentru ca analiza comparativă să prezinte acuratețe. După evaluarea analizei comparative a capacității antioxidante a extractelor vegetale luate în lucru s-au obținut diferite activități antiradicalare pentru fiecare extract datorită tipurilor variate de principii active, dar și conținutului mare de compuși polifenolici și al altor constituenți fitochimici din compoziție. Conform rezultatelor, ordinea valorilor IC₅₀ a fost AE < RE < CHE < TE < CE. Astfel, având în vedere că o valoare scăzută a IC₅₀ semnifică o activitate antioxidantă totală mai mare, extractul de turiță a fost identificat ca fiind cel mai puternic antioxidant dintre toate, urmat de rozmarin, cicoare, păpădie și anghinare. Relația de inversă proporționalitate între potența efectului antioxidant și valoarea IC₅₀ determinată pentru fiecare extract este redată și în Fig. 6.1., care reliefează o activitate antioxidantă minimă pentru extractul de anghinare (cu o valoare IC₅₀ maximă prin toate cele 3 metode) și o activitate antioxidantă maximă pentru extractul de turiță mare.

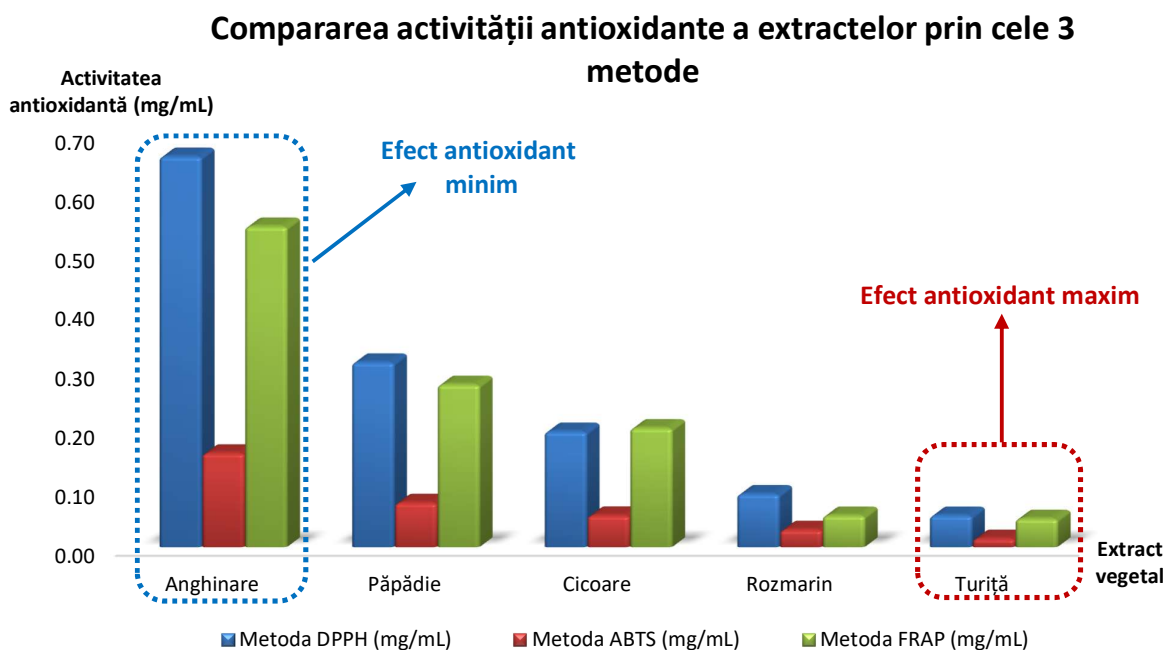


Fig. 6.1. Potența efectului antiradicalar în funcție de valoarea IC_{50}

După calcularea coeficientului Pearson și a coeficientului de determinare, s-a demonstrat corelația foarte puternică existentă nu numai între diferite metodologii antioxidante, ci și între principiile active și activitatea antioxidantă totală a extractelor. Activitatea antioxidantă a extractelor analizate, asociată cu un conținut ridicat de compuși polifenolici, poate explica potențialul lor hepatoprotector, deoarece liantul dintre hepatotoxicitate și stresul oxidativ, este în special producția de specii reactive de oxigen, care pot deteriora integritatea și funcționalitatea hepatocitelor și pot contribui la patogeneza multor boli hepatice.

7. Evaluarea citotoxicității extractelor și amestecului de extracte prin metode alternative

Amestecul de extracte uscate s-a realizat ținând cont de profilul farmacognostic al fiecărui extract vegetal în parte, de rezultatele obținute în urma determinărilor calitative și cantitative prin diferite metode, de capacitatea antioxidantă pe care o pot exercita fie prin împiedicarea peroxidării lipidice a membranei hepatocitare și înlăturarea stresului oxidativ, fie prin stimularea activității antioxidante a antiradicalarilor endogeni, dar și de gradul de stabilitate al extractelor (variația concentrației principiilor active în timp, solventul de extracție utilizat, consistența extractului). S-a urmărit obținerea unui fitopreparat cu un profil fitoterapeutic optim îmbunătățit, care prezintă concentrații considerabile de principii active (tabel VII.1.) relevante din punct de vedere clinic, dar care să nu aibă un impact major asupra sistemelor enzimactice de la nivel hepatic, ci să ofere o echilibrare a proceselor port-hepatice, astfel încât să se situeze în zona eficacității terapeutice fără înregistrarea efectelor secundare și fără să agreseze celula hepatică sau să altereze balanța redox în favoarea pro-oxidanților.

Tabel VII.1. Dozarea principiilor active din amestecul de extracte

AMESTEC	Concentrația de principii active [g principiu activ/100 g extract uscat]		
	AFC-uri	Flavone	Polifenoli Totali
	8.5016 ± 0.3444	3.2961 ± 0.3045	13.9088 ± 0.8186

* Rezultatele sunt exprimate ca medie ± SD (n = 5).

În ceea ce privește concentrația de principii active, amestecul de extracte uscate a înregistrat valori optime medii pentru toate cele trei categorii de constituenți chimici activi, care sunt relevante din punct de vedere fitofarmacologic și care justifică proprietățile terapeutice, precum și posibila sa utilizare ca adjuvant în diverse afecțiuni hepatice, vizând prevenția sau ameliorarea clinică. Amestecul de extracte a fost testat ulterior *in vitro* și *in vivo* pentru determinarea citotoxicității, dar și pentru a evalua eficacitatea terapeutică comparativ cu cea a extractelor singulare în vederea cuantificării profilului de siguranță, dar și a influenței asupra parametrilor biochimici esențiali la șobolan. În urma acestor determinări, amestecul de extracte poate fi supus apoi procedurilor de includere într-o formă farmaceutică destinată administrării la om dacă îndeplinește cerințele corespunzătoare privind valoarea terapeutică.

În scopul evaluării toxicității celulare se utilizează frecvent testele *in vivo* pe modele animale, dar din motive de etică profesională, aceste determinări au început să fie mult limitate, căutându-se metode alternative eficiente și modele de testare avantajoase. Printre cele mai eficiente și facile metode, utilizată frecvent în prezent pentru evaluarea citotoxicității extractelor din plante, este Testul BSLA (Brine Shrimp Lethality Assay), considerat un test preliminar *in vivo*, care se realizează pe larve de *Artemia salina*, specie de crustaceu, folosită în toxicologie, nanotoxicologie [5], testarea extractelor vegetale [6-9] etc. S-a observat că toate extractele testate sunt netoxice (tabel VII.2.), conform criteriilor Clarkson, efectele letale înregistrate la 50 % dintre organismele expuse apărând doar la concentrații mari, de peste 1000 μg/mL (concentrația de 1200 μg/mL a fost considerată reper de comparație).

Tabel VII.2. Centralizarea rezultatelor din cadrul testării extractelor pe *Artemia salina*

Proba	Extract vegetal	Conc. efecte letale (μg/mL)	Mortalitatea (%)	Mortalitatea (%) la conc. 1200 μg/mL	Clasificare citotoxicitate
1	<i>Rosmarini extr.</i>	ND	0	0	netoxic
2	<i>Agrimoniae extr.</i>	ND	0	0	netoxic
3	<i>Cichorii extr.</i>	3732	50	0	netoxic
4	<i>Cynarae extr.</i>	2990	50	0	netoxic
5	<i>Amestec extr.</i>	800	2	7	netoxic
6	<i>Taraxaci extr.</i>	800	7	7	netoxic

ND: nedetectat.

Determinarea citotoxicității extractelor analizate s-a realizat prin urmărirea influenței acestora, la diferite concentrații atent selectate într-un interval adecvat, asupra dezvoltării sau

asupra comportamentului organismelor din genul *Daphnia sp.* Toxicitatea extractelor asupra nevertebratului *Daphnia magna* sugerează potențiale acțiuni antivirale și antimicrobiene, cu posibilă utilitate clinică în afecțiuni hepatice de tip hepatite virale. Extractele de rozmarin și de turiță care au imprimat citotoxicitatea cea mai ridicată asupra *D. magna*, prezintă proprietăți antivirale și antibacteriene cunoscute în literatura de specialitate [10,11–13]. Astfel, studiul de evaluare a citotoxicității extractelor pe modelul *Daphnia* a condus către obținerea de rezultate care se află în strânsă corelație cu activitatea antioxidantă a acestora și cu concentrația de principii active determinate. Analizând valorile LC50 după 24 ore, s-a observat că extractele de anghinare și păpădie s-au dovedit a fi netoxice, extractul de cicoare a prezentat o toxicitate scăzută, extractul de turiță mare a exercitat o toxicitate medie, iar extractul de rozmarin a fost înregistrat ca fiind foarte toxic pe *Daphnia magna*, cu un efect biologic maxim.

A fost evaluat efectul extractelor analizate asupra celulelor tumorale HepG2, iar rezultatele au fost exprimate sub formă de viabilitate celulară ca valoare procentuală. Viabilitatea grupului martor a fost de 100 %, iar viabilitatea probelor s-a calculat ținând cont de valorile absorbanțelor pentru grupul tratat cu extracte și pentru grupul martor [14,15].

În Fig. 7.2. este reprezentat grafic efectul extractului de turiță asupra celulelor tumorale HepG2. O reducere semnificativă a viabilității celulelor tumorale a fost observată la concentrația probei de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (viabilitate $84.1\% \pm 6.3\%$ față de grupul martor). La concentrații mai mari s-a obținut o scădere semnificativă dependentă de doză a viabilității HepG2 (la 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ viabilitatea celulară a fost de $44.3\% \pm 3.3\%$ față de grupul martor).

Figura 7.3. ilustrează efectul extractului de rozmarin asupra liniei celulare de carcinom hepatocelular HepG2. O scădere semnificativă statistic a viabilității celulelor tumorale a fost obținută la toate concentrațiile utilizate, cea mai importantă reducere a viabilității celulelor fiind observată la cea mai mare doză testată, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (viabilitatea celulelor tumorale a fost de $7.2\% \pm 1.7\%$ față de grupul de control).

Efectul de inhibare a viabilității celulelor canceroase exercitat de extractul de cicoare este reprezentat în Fig. 7.4. După cum se poate observa în grafic, la concentrații începând cu 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, extractul reduce semnificativ viabilitatea celulelor tumorale, iar la concentrația maximă de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a fost obținută cea mai mare reducere a viabilității celulelor HepG2 (viabilitate celulară $59.3\% \pm 5.2\%$ vs. control).

În Fig. 7.5. este reprezentat efectul extractului de anghinare asupra celulelor de carcinom hepatocelular HepG2. Extractul a produs o scădere a viabilității celulelor tumorale pornind de la concentrația de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (viabilitate $86.7\% \pm 5.6\%$ față de control). La cea mai mare doză testată (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), viabilitatea celulelor tumorale a fost de $81.2\% \pm 9.5\%$ față de control.

HepG2 - celule de carcinom hepatocelular uman

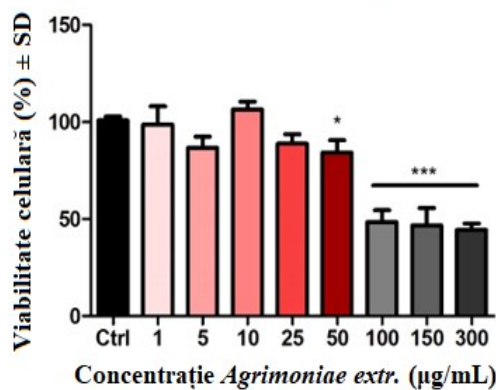


Fig. 7.2. Efectul extractului de turiță mare (*Agrimoniae extractum*) asupra viabilității celulelor de carcinom hepatocelular uman (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$);
Ctrl: grupul de control (grupul martor)

HepG2 - celule de carcinom hepatocelular uman

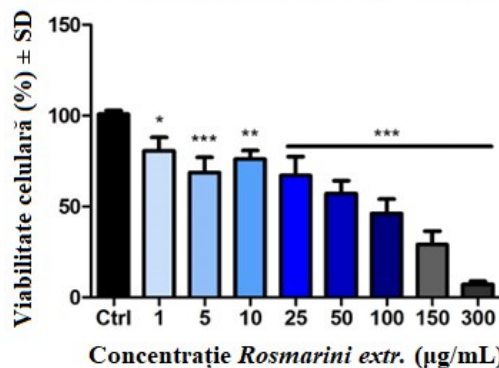


Fig. 7.3. Efectul extractului de rozmarin (*Rosmarini extractum*) asupra viabilității celulelor de carcinom hepatocelular uman (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$);
Ctrl: grupul de control (grupul martor)

HepG2 - celule de carcinom hepatocelular uman

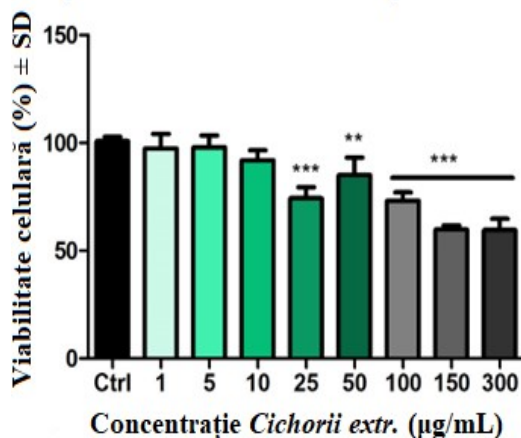


Fig. 7.4. Efectul extractului de cicoare (*Cichorii extractum*) asupra viabilității celulelor de carcinom hepatocelular uman (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$);
Ctrl: grupul de control (grupul martor)

HepG2 - celule de carcinom hepatocelular uman

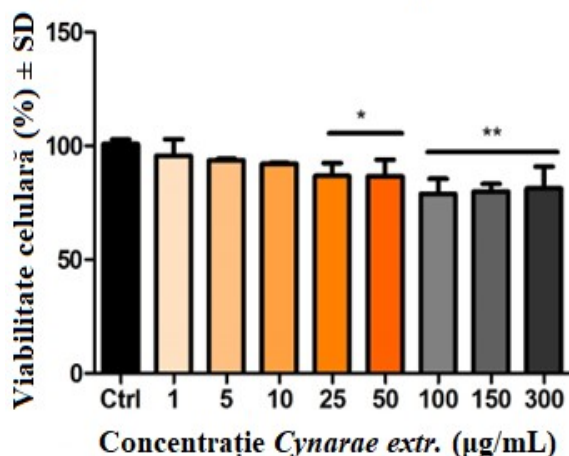


Fig. 7.5. Efectul extractului de anghinare (*Cynarae extractum*) asupra viabilității celulelor de carcinom hepatocelular uman (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$);
Ctrl: grupul de control (grupul martor)

După incubarea celulelor HepG2 cu probele de pădărie a fost observată o scădere semnificativă, dependentă de doză, a viabilității HepG2 pornind de la concentrația de 10 µg/mL (Fig. 7.6). Cea mai semnificativă reducere a viabilității celulelor a fost semnalată la concentrația de 300 µg/mL (viabilitate 77.6% ± 6.6% față de control).

HepG2 - celule de carcinom hepatocelular uman

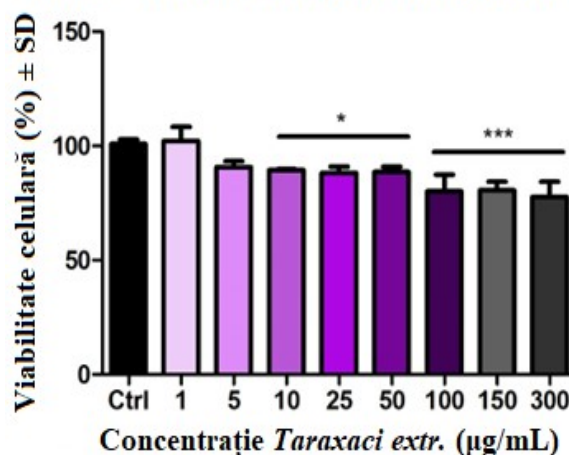


Fig. 7.6. Efectul extractului de pădărie (*Taraxaci extractum*) asupra viabilității celulelor de carcinom hepatocelular uman (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$);
Ctrl: grupul de control (grupul martor)

Efectul citotoxic indus de amestecul de extracte liniilor celulare canceroase este conturat în Fig. 7.7. Amestecul a fost testat în aceleași concentrații ca fiecare extract vegetal individual. După aplicarea metodei MTT, s-a observat o ușoară scădere a viabilității celulelor tumorale într-o manieră doză-dependentă, cel mai semnificativ efect fiind obținut la concentrația 300 µg/mL (viabilitate 78.5% ± 4.8% față de control).

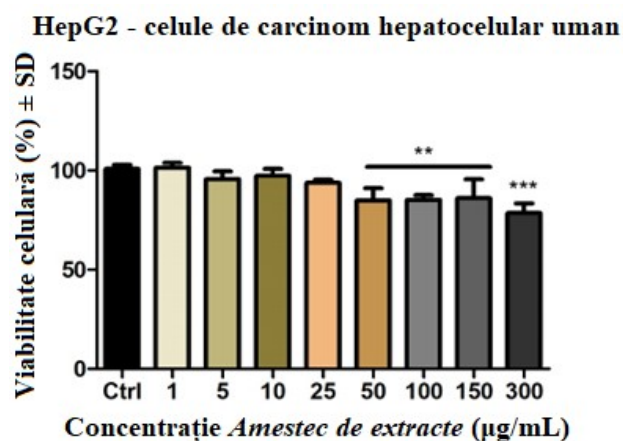


Fig. 7.7. Efectul amestecului de extracte asupra viabilității celulelor de carcinom hepatocelular uman (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$);
Ctrl: grupul de control (grupul martor)

Valorile IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) pentru extractele testate pe culturi de celule umane HepG2 sunt prezentate în Tabelul VII.3.

Tabel VII.3. Valorile IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ale extractelor – Testul *in vitro* de toxicitate pe linii celulare

<i>Agrimoniae</i> <i>extr.</i> IC_{50}	<i>Rosmarini</i> <i>extr.</i> IC_{50}	<i>Cichorii</i> <i>extr.</i> IC_{50}	<i>Cynarae</i> <i>extr.</i> IC_{50}	<i>Taraxaci</i> <i>extr.</i> IC_{50}	<i>Amestec</i> <i>extracte</i> IC_{50}
107.6 $\mu\text{g/mL}$	53.58 $\mu\text{g/mL}$	ND	ND	ND	ND

ND: nedetectat.

Valorile IC_{50} nu au putut fi calculate pentru extractele de cicoare, anghinare, păpădie și amestecul de extracte, deoarece acestea au imprimat o viabilitate ridicată pe tot parcursul analizei (între 59 – 100% viabilitate pentru toate concentrațiile și între 59 – 81% pentru concentrația maximă testată), procentul de letalitate fiind extrem de scăzut pentru concentrațiile testate ($L\% \leq 40\%$). Rezultatele centralizate obținute în urma analizei extractelor pe culturi de celule umane sunt expuse în Tabelul VII.4.

Tabel VII.4. Centralizarea rezultatelor pentru Testul de viabilitate celulară HepG2

Extract vegetal	Concentrație maximă testată (C_{\max} - $\mu\text{g/mL}$)	Viabilitatea la C_{\max} (%)	Letalitatea (L%)
<i>Agrimoniae extractum</i>	300 $\mu\text{g/mL}$	44.3%	55.7%
<i>Rosmarini extractum</i>	300 $\mu\text{g/mL}$	7.2%	92.8%
<i>Cichorii extractum</i>	300 $\mu\text{g/mL}$	59.3%	40.7%
<i>Cynarae extractum</i>	300 $\mu\text{g/mL}$	81.2%	18.8%
<i>Taraxaci extractum</i>	300 $\mu\text{g/mL}$	77.6%	22.4%
<i>Amestec de extracte</i>	300 $\mu\text{g/mL}$	78.5%	21.5%

Testul de citotoxicitate asupra celulelor tumorale din linia celulară HepG2 de carcinom hepatocelular uman a revelat un efect toxic celular marcant pentru extractul de rozmarin ($IC_{50} = 53.58 \mu\text{g/mL}$) și o toxicitate medie pentru extractul de turiță mare ($IC_{50} = 107.6 \mu\text{g/mL}$), conform criteriilor de citotoxicitate, rezultate confirmate și de viabilitatea celulară care a scăzut semnificativ pe măsură ce doza testată pentru aceste extracte a fost mai mare. Restul extractelor analizate (*Cichorii extractum*, *Cynarae extractum*, *Taraxaci extractum* și *Amestecul de extracte*) au imprimat o toxicitate mult redusă asupra celulelor tumorale, ceea ce indică faptul că nu sunt citotoxice potente pe celulele HepG2. Dintre acestea, extractul de anghinare și amestecul de extracte au indus mortalitatea celulară cea mai scăzută (18.8 % și respectiv 21.5 %) și au determinat scăderea viabilității celulelor HepG2 într-un mod predictibil, stabil și doză – dependent, dar celelalte extracte analizate au fost cele care au avut un efect mai puternic, mai ales la cele mai mari doze testate. Comparativ cu studiile de citotoxicitate *in vivo* efectuate pe nevertebrate (*Daphnia sp.* și *Artemia sp.*), gradele de toxicitate ale extractelor pe liniile de celule tumorale HepG2, au prezentat o corelație foarte bună, extractele de cicoare, anghinare, păpădie și amestecul fiind încadrate ca extracte netoxice în toate aceste metode. Diferențele de citotoxicitate care apar în cazul extractelor de rozmarin și turiță (netoxice pe *Artemia sp.*; foarte toxice/cu toxicitate medie pe *Daphnia sp.* și celule HepG2) pot fi explicate de complexitatea compoziției chimice și de profilul antioxidant amplificat al acestor extracte, care pot declanșa comportamente biologice și mecanisme de acțiune diferite la nivel celular și metabolic, în funcție de caracteristicile individului expus, dar și de condițiile biochimice distincte din mediul citoplasmatic. În acest sens, poate fi evidențiată o posibilă specificitate de substrat a *Rosmarini extractum* și *Agrimoniae extractum*, ca urmare a efectului citotoxic selectiv observat în cele două studii de toxicitate (HepG2, *Artemia sp.*), dovedindu-se citotoxicitatea directă pe celulele tumorale HepG2, însă prezentând inocuitate față de nevertebratul *Artemia salina*.

8. Cercetări biochimice și histologice

Testarea extractelor vegetale *in vivo* pe animale de laborator reprezintă una dintre metodele experimentale care furnizează cele mai importante rezultate cu un rol esențial în traiectoria preclinică din cadrul cercetării. După aplicarea metodelor alternative *in vivo* pe nevertebrate și *in vitro* pe linii celulare tumorale umane, pentru a caracteriza complet profilul fitofarmacologic al extractelor luate în studiu, s-a urmărit determinarea parametrilor biochimici sangvini specifici pentru evaluarea funcției hepatice, după expunerea animalelor experimentale, analiza biochimică a omogenatelor tisulare, precum și examenul histologic al fragmentelor de ficat prelevate de la fiecare animal în parte. Cercetările au vizat, pe lângă evaluarea funcției ficatului prin determinarea transaminazelor serice, și determinarea glicemiei, a colesterolului total, a trigliceridelor serice, a HDL - colesterolului, a colinesterazei serice și a proteinelor totale. Loturile folosite în testare: LOT

I - Lot Martor Normal: Ser fiziologic 0.9 % în doză de 10 mL/kg corp oral – 10 șobolani; LOT II - Lot Martor Intoxicat: CCl₄ în doză de 0.2 mL/kg corp oral – 10 șobolani; LOT III - Lot Referință Normal: Silimarină 35 mg în doză de 10 mL/kg corp oral – 10 șobolani; LOT IV - Lot Referință Intoxicat: Silimarină + CCl₄ (10 mL/kg corp oral + 0.2 mL/kg corp oral după o oră) – 10 șobolani; LOT V: *Cynarae extractum* (extract de anghinare) + CCl₄ (10 mL/kg corp oral + 0.2 mL/kg corp oral după o oră) – 10 șobolani; LOT VI: *Rosmarini extractum* (extract de rozmarin) + CCl₄ (10 mL/kg corp oral + 0.2 mL/kg corp oral după o oră) – 10 șobolani; LOT VII: *Cichorii extractum* (extract de cicoare) + CCl₄ (10 mL/kg corp oral + 0.2 mL/kg corp oral după o oră) – 10 șobolani; LOT VIII: *Taraxaci extractum* (extract de păpădie) + CCl₄ (10 mL/kg corp oral + 0.2 mL/kg corp oral după o oră) – 10 șobolani; LOT IX: *Agrimoniae extractum* (extract de turiță) + CCl₄ (10 mL/kg corp oral + 0.2 mL/kg corp oral după o oră) – 10 șobolani; LOT X - Lot Amestec: Amestec de extracte + CCl₄ (10 mL/kg corp oral + 0.2 mL/kg corp oral după o oră) – 10 șobolani.

A fost urmărită evoluția constantelor biochimice în intoxicația acută și cronică (fig. 8.1. – 8.3.).

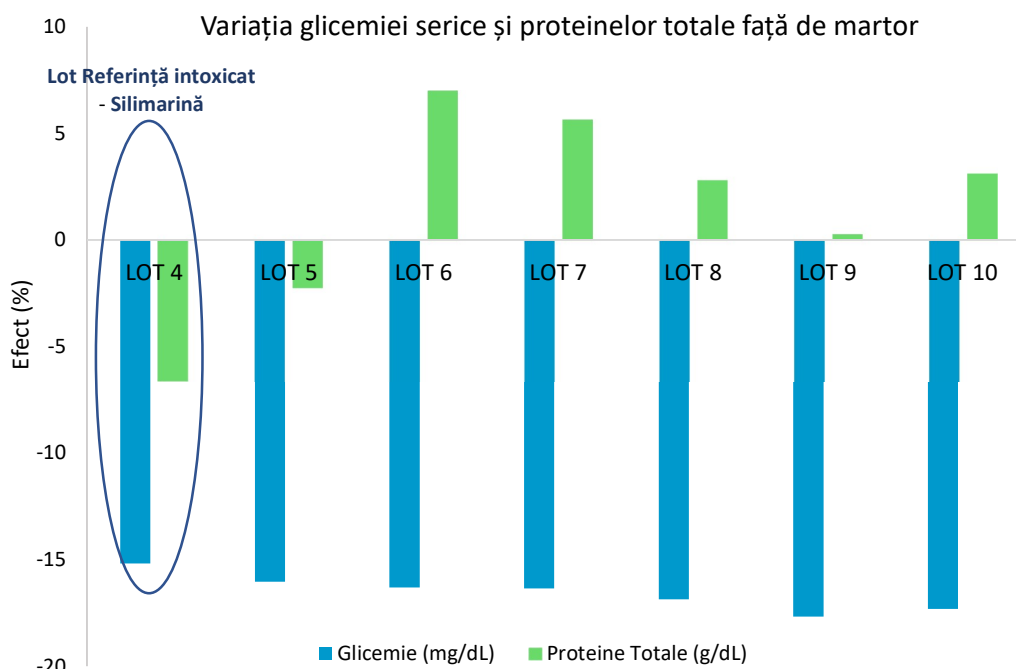


Fig. 8.1. Influența extractelor și amestecului de extracte asupra glicemiei și proteinelor totale la șobolan

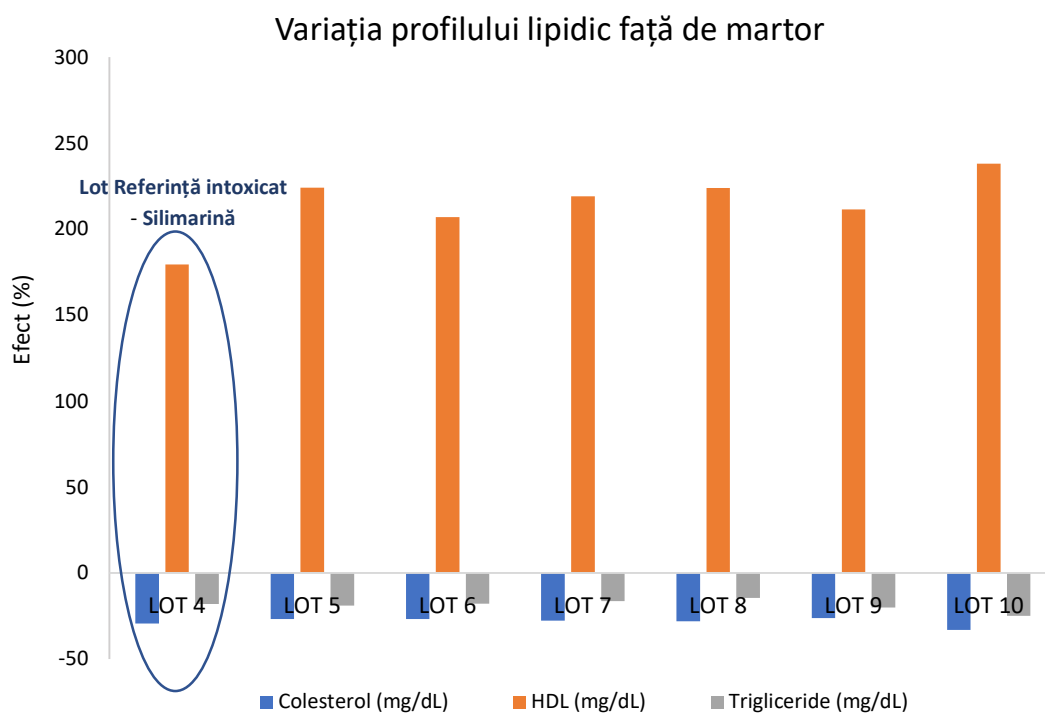


Fig. 8.2. Influența extractelor și amestecului de extracte asupra profilului lipidic la șobolan

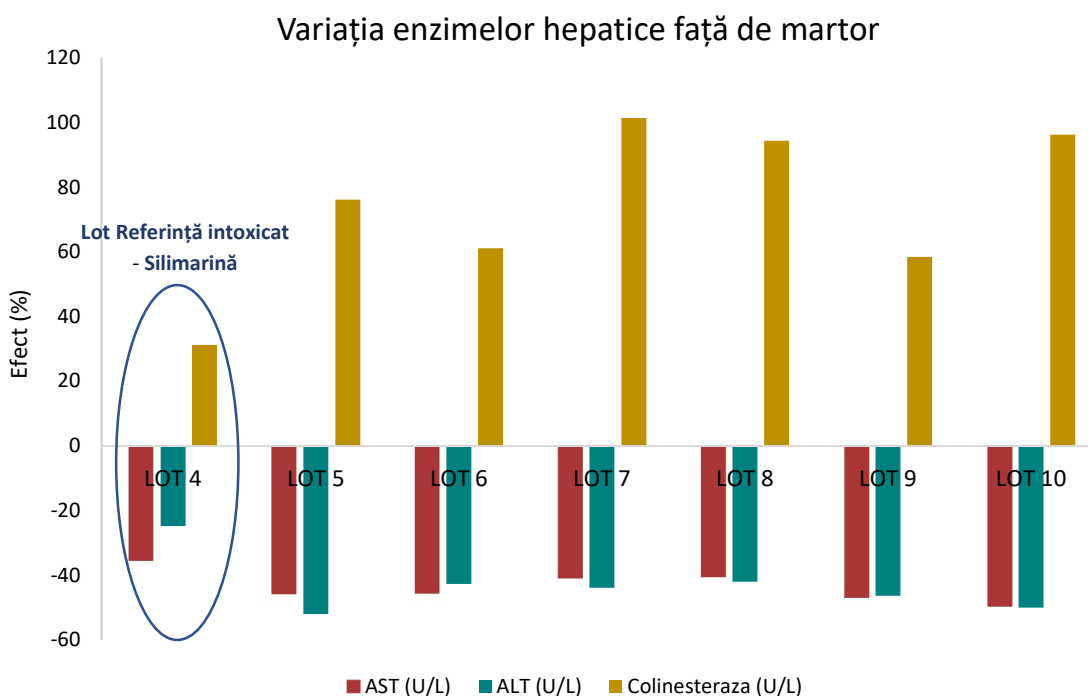


Fig. 8.3. Influența extractelor și amestecului de extracte asupra enzimelor hepatice la șobolan

Constantele biochimice evaluate au înregistrat valori îmbunătățite sau chiar normalizate cu ameliorarea toxicității induse de CCl₄, pentru loturile tratate cu amestecul de extracte sau cu

extractele individuale, toate extractele manifestând o influență pozitivă asupra mecanismelor de apărare și de regenerare hepatocelulară. Așadar, valoarea glicemiei serice, crescută de agentul toxic, a fost redusă de extractul de turiță și de amestecul de extracte, iar proteinele serice au fost normalizate de extractul de rozmarin, de cicoare și de amestecul de extracte. De asemenea, amestecul de extracte a imprimat un efect remarcabil de echilibrare a profilului lipidic, activitatea transaminazelor serice a fost diminuată semnificativ de amestecul de extracte și de extractul de anghinare, iar nivelul colinesterazei serice a fost influențat în mod pozitiv de extractul de cicoare și de amestecul de extracte. Exemplificăm, din punct de vedere histologic, doar comportamentul celulei hepatice sub acțiunea amestecului de extracte și a tetraclorurii de carbon: nu a prezentat zone de necroză celulară și nici hepatocite în apoptoză, spre deosebire de celelalte loturi tratate cu extractele individuale. S-au putut identifica zone cu degenerescență vacuolară și cordoane de fibroză ramificate ce par a fi concentrate la periferia lobulului (Fig. 8.4.a și b). Ca răspuns de apărare față de agresiunea imprimată de agentul toxic, pre-tratamentul cu amestecul de extracte a reușit să ofere protecție prin adaptarea structurilor celulare la condițiile toxice și îngroșarea pereților celulari, astfel încât să limiteze distrucția hepatocitară. Astfel, s-a observat că unele spații porte și-au păstrat arhitectura normală cu triada venă portă, arteriolă hepatică, canalicul biliar, dar cu peretele mai îngroșat decât normal (Fig. 8.4.c). De asemenea, s-au remarcat zone cu degenerescență microvacuolară, în principal, vase cu pereți îngroșați, eozinofili și depozite perivasculare de fibrină (Fig. 8.4.d).

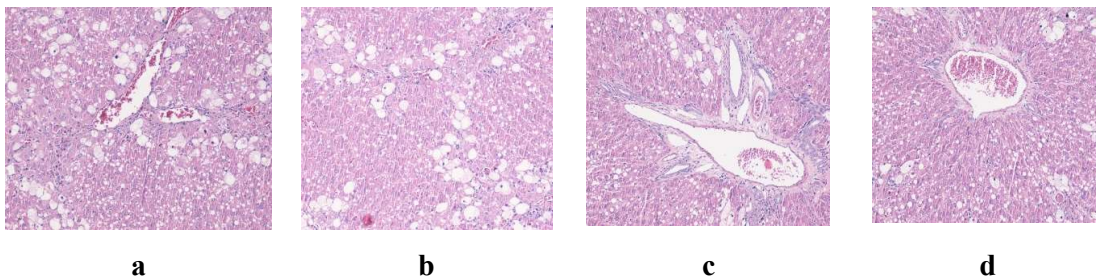


Fig. 8.4. Evaluarea histologică a probelor de ficat pentru Lotul X (*Amestecul de extracte + CCl₄*) la obiectiv 10x (**a, b, c, d**) (foto originale)

Examenul de histopatologie hepatocitară și citologie hepatică a confirmat efectele hepatoprotectoare ale amestecului de extracte prin păstrarea, într-un procent foarte ridicat, a arhitecturii hepatice normale (inclusiv în spațiile porte) și prin absența fenomenelor de necroză tisulară sau apoptoză celulară.

Cercetările efectuate pe omogenatele de ficat au evidențiat: diferențe semnificative statistic la compararea capacităților tisulare de captare a radicalilor liberi atât pentru durata de 7 zile, cât și pentru expunerea de 21 de zile, pentru evaluarea inițială la 5 minute ($p = 0.008$ și $p < 0.001$), 15 minute ($p = 0.009$ și $p < 0.001$) și 30 minute ($p = 0.009$ și $p < 0.001$). Activitatea catalazei a fost similară între grupuri, pentru ambele grupuri de tratament de 7 zile ($p = 0.756$) și 21 de zile

($p = 0.076$). Nivelurile de tioli totali au fost semnificativ diferite între grupuri la 7 zile ($p = 0.002$), dar nu și la 21 de zile ($p = 0.126$), deoarece s-au observat scăderi notabile. Insuficiența redox tisulară, determinată prin metoda FOX, a arătat diferențe semnificative între grupuri pentru ambele perioade de tratament: $p = 0.019$ (7 zile) și $p = 0.033$ (21 de zile). Nivelurile de nitriți hepatici au fost semnificativ diferite între grupuri la 7 zile ($p = 0.006$) și 21 de zile ($p < 0.001$). Pentru nitriții hepatici totali, nu s-au găsit diferențe semnificative la 7 zile ($p = 0.118$), ci doar la 21 de zile ($p = 0.024$).

9. Formularea, obținerea și controlul farmacotehnic al comprimatelor masticabile cu extracte vegetale

În vederea formulării unei forme farmaceutice cu extracte vegetale bogate în principii active cu numeroase beneficii pentru categoriile țintă de pacienți, a fost selectată forma farmaceutică solidă dozată pentru administrare orală, de comprimat masticabil, întrucât este o alternativă convenabilă la comprimatele convenționale.

Conform tuturor rezultatelor favorabile obținute în urma testărilor farmacotehnice efectuate, se poate aprecia concordanța clară dintre proprietățile comprimatelor obținute și cerințele de calitate specificate în literatura de specialitate în vigoare.

Parametrii de control ai calității pentru comprimatele masticabile formulate s-au încadrat în limitele și prevederile din monografiile de specialitate, ceea ce justifică formularea optimă selectată, ce va ceda în mod corespunzător principiile active în organism.

Formularea aleasă, prin numeroasele avantaje ale comprimatelor masticabile, poate aduce beneficii terapeutice semnificative pacienților din categorii speciale, copiilor, vârstnicilor sau persoanelor cu sensibilitate crescută la deglutiție.

Ajustarea formulei farmaceutice propuse, astfel încât să corespundă, atât metodei de formulare, cât și nevoilor pacienților, prin adaosul de diferiți excipienți (lianți, lubrifianți, glisanți, edulcoranți sau aromatizanți), a condus la obținerea unui produs farmaceutic final, care poate răspunde cerințelor medicale și farmaceutice, indiferent de perspectiva profesională (medic, farmacist sau producător).

CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Concluzii Generale

Au fost incluse în studiu 5 produse vegetale: *Cynarae folium* (frunze de anghinare), *Rosmarini folium* (frunze de rozmarin), *Agrimoniae herba* (părți aeriene de turiță mare), *Taraxaci herba* (părți aeriene de păpădie) și *Cichorii herba* (părți aeriene de cicoare), toate prezentând în literatura științifică date referitoare la acțiunile benefice asupra sistemului hepato-biliar, cu

excepția turiței pentru care s-au găsit mult mai puține evidențe despre efectul hepatoprotector-hepatoregenerator, comparativ cu celelalte produse.

❖ A fost evaluată extracția principiilor active (acizi fenolcarboxilici, flavone și polifenoli totali) în diferite concentrații de etanol (20°, 50°, 70°), obținându-se cele mai mari concentrații de principii active în etanol 20° pentru păpădie și în etanol 50° pentru anghinare, rozmarin, turiță și cicoare. Dintre toate soluțiile hidroetanolice analizate, în soluțiile extractive de *Agrimoniae herba* și *Rosmarini folium* s-a detectat cea mai mare cantitate de flavone (1.17 g rutozidă/100 g produs vegetal uscat pentru turiță și 1.27 g rutozidă/100 g produs vegetal uscat pentru rozmarin), AFC-uri (6.55 g acid clorogenic/100 g produs vegetal uscat pentru turiță și 5.67 g acid clorogenic/100 g produs vegetal uscat pentru rozmarin) și polifenoli totali (8.56 g acid tanic/100 g produs vegetal uscat pentru turiță și 8.82 g acid tanic/100 g produs vegetal uscat pentru rozmarin).

❖ În urma obținerii extractelor uscate prin metoda liofilizării, utilizând solventul de extracție adecvat, s-au efectuat determinări cantitative ale compușilor cu posibilă acțiune la nivel hepatic (AFC, flavone, polifenoli totali) și s-a constatat că cele mai bogate extracte au fost și de aceasă dată rozmarinul și turița, iar pentru cicoare, păpădie și anghinare, valorile concentrațiilor au prezentat creșteri uniforme și relevante din punct de vedere terapeutic față de rezultatele de la soluțiile extractive. Studiul stabilității extractelor vegetale uscate standardizate în principii active, efectuat pe o perioadă de monitorizare de un an, ce a presupus determinări cantitative de AFC, flavone și polifenoli totali la 3 luni, la 6 luni și la 12 luni de la obținere, a reliefat stabilitatea fitochimică a flavonelor și polifenolilor totali, nivelul terapeutic păstrându-se la cote optime de-a lungul celor 12 luni pentru toate extractele analizate. Unica diferență semnificativă statistic s-a obținut pentru conținutul de AFC-uri din extractul de rozmarin, însă acest comportament a fost previzibil, având în vedere instabilitatea și labilitatea acestor compuși, în schimb, pentru celelalte extracte uscate, evoluția AFC-urilor în timp a înregistrat variații mici și ne semnificative, în pofida influenței numeroșilor factori de conservare. Analiza cromatografică ultra-performantă cuplată cu spectrometrie de masă de înaltă rezoluție (UHPLC-HRMS/MS) a compușilor polifenolici din extractele vegetale uscate a permis cuantificarea lor calitativă și cantitativă de mare precizie. Astfel, în *Cynarae extractum* (CE) au fost identificați 28 de compuși, în *Rosmarini extractum* (RE) – 48 de compuși, în *Taraxaci extractum* (TE) – 39 de compuși, în *Cichorii extractum* (CHE) – 43 de compuși și în *Agrimoniae extractum* (AE) – 31 de compuși, iar din punct de vedere cantitativ, după aplicarea analizei UHPLC-HRMS/MS, în CE s-au cuantificat 13 compuși, în RE – 17 compuși, în TE – 18 compuși, în CHE – 19 compuși și în AE – 19 compuși, printre care rutozida, genistina, acidul cafeic, acidul clorogenic, acidul elagic și acidul azelaic. În funcție de variabilele din sistemul cromatografic s-a efectuat analiza cluster prin utilizarea de algoritmi de clasificare a constituenților din extractele vegetale în vederea grupării lor în clase omogene. Examinarea

multivariată comparativă a clusterelor a demonstrat o distribuție generală într-un număr variabil de clustere pentru toate extractele, rezultatele obținute fiind în corelație directă cu compușii identificați prin metoda UHPLC-HRMS/MS. Practic, fiecare cluster obținut prin sistemul grupării ierarhice poate fi considerat o „oglindă” transparentă a profilului polifenolic al extractelor, în care compușii prezintă aranjare organizată și simplificată, în funcție de variația similitudinii dintre aceștia, fiind o exprimare grafică mult mai sugestivă.

❖ Studiile de andocare moleculară au avut rolul de a prezice posibilul mecanism molecular de acțiune al extractelor prin proiectarea afinităților de legare de ținte biologice cu rol esențial în dinamica proceselor enzimatice și metabolice, în care ficatul este sediul principal. Astfel, simulările *in silico* au evaluat compușii polifenolici determinați în extracte ca potențiali inhibitori ai izoformei 2E1 a citocromului P450 (CYP2E1) și ai factorului alfa de necroză tumorală (TNF- α), dar și ca activatori alosterici ai glutacion-peroxidazei 4 (GPx4), putând avea un rol deosebit de important în reglarea alosterică a multor enzime sau structuri biologice esențiale pentru buna funcționare a arborelui hepato-biliar. S-a generat o analogie *in silico* a comportamentului în organism a fitoconstituenților din sursele vegetale și s-au putut prezice modificări conformaționale, acțiuni sau interacțiuni la nivel celular și tisular. A fost demonstrat, în urma evaluărilor *in silico*, efectul hepatoprotector al compușilor polifenolici prin interacțiunea acestora cu CYP2E1, TNF- α și GPx4, iar reducerea stresului oxidativ, anihilarea toxicității hepatocelulare, atenuarea fibrogenezei, precum și reglarea enzimelor cheie cu rol antioxidant și antiinflamator fiind posibile acțiuni terapeutice benefice ale extractelor luate în lucru, întrucât aceste efecte au fost conturate și confirmate cu ajutorul tehnicilor de modelare moleculară computațională cu rol esențial în proiectarea rațională a fitomedicamentelor.

❖ Acțiunea antioxidantă a extractelor vegetale evaluată în sistem acelular, prin cele 3 metode DPPH, ABTS și FRAP, a demonstrat efectele antioxidante induse de extractele vegetale aflate în corelație directă ($p < 0.05$) cu concentrația de metaboliți secundari, cel mai puternic antioxidant dintre toate fiind *Agrimoniae extractum*, urmat de *Rosmarini extractum*, *Cichorii extractum*, *Taraxaci extractum* și *Cynarae extractum*.

❖ A fost formulat amestecul de extracte vegetale prin stabilirea raportului optim dintre extractele uscate individuale, ținând cont de profilul farmacognostic al fiecărui extract, de rezultatele obținute în urma determinărilor calitative și cantitative, dar și de acțiunea antioxidantă exercitată *in vitro*. După dozarea principiilor active din amestecul de extracte s-au obținut valori optime medii pentru toate cele 3 categorii de constituenți chimic activi, amestecul fiind supus ulterior testărilor *in vitro* și *in vivo* împreună cu extractele individuale.

❖ Evaluarea citotoxicității extractelor și amestecului de extracte pe modele alternative a evidențiat, pe de o parte, profilul de siguranță, iar, pe de altă parte, a conturat și o oarecare

specificitate de substrat a extractelor analizate. În urma testării citotoxicității *in vivo* pe modelul *Artemia salina* s-a constatat că toate extractele testate sunt netoxice conform criteriilor Clarkson și nu influențează procesele de diviziune celulară, creștere sau diferențiere a larvelor, efectele letale apărând la concentrații mari, de peste 1000 μg/mL. Studiile de citotoxicitate *in vivo* pe modelul *Daphnia magna* a reliefat absența toxicității pentru extractul de anghinare și păpădie, o toxicitate scăzută pentru extractul de cicoare, o toxicitate medie pentru turiță și o toxicitate ridicată pentru extractul de rozmarin, ceea ce sugerează potențialele acțiuni antivirale și antimicrobiene ale extractului de rozmarin și turiță, cu posibilă utilitate clinică în afecțiunile hepatice de tip hepatite virale. Citotoxicitatea extractelor a fost determinată și *in vitro* asupra unor linii celulare de cancer hepatic (HepG2), revelând un efect toxic celular marcant pentru extractul de rozmarin ($IC_{50} = 53.58 \mu\text{g/mL}$) și o toxicitate medie pentru extractul de turiță mare ($IC_{50} = 107.6 \mu\text{g/mL}$), restul extractelor analizate imprimând o toxicitate mult redusă asupra celulelor tumorale, ceea ce indică faptul că nu sunt citotoxice potente pe celulele HepG2. În plus, s-a evidențiat o posibilă specificitate de substrat a *Rosmarini extractum* și *Agrimoniae extractum*, ca urmare a efectului citotoxic selectiv observat în cele două studii de toxicitate (HepG2, *Artemia sp.*), dovedindu-se citotoxicitatea directă pe celulele tumorale HepG2, însă prezentând inocuitate față de nevertebratul *Artemia salina*.

❖ Cercetarea *in vivo* pe animale de laborator a condus la confirmarea acțiunii hepatoprotectoare imprimată de extractele vegetale la șobolanii intoxicați cu CCl_4 , timp de 7 zile și de 21 de zile, protecția evaluată fiind superioară referinței utilizate în studiu (silimarina). Constantele biochimice evaluate (glicemie, proteine serice, profil lipidic, enzime hepatice) au înregistrat valori îmbunătățite sau chiar normalizate cu ameliorarea toxicității induse de CCl_4 , pentru loturile tratate cu amestecul de extracte sau cu extractele individuale, toate extractele manifestând o influență pozitivă asupra mecanismelor de apărare și de regenerare hepatocelulară, iar rata de supraviețuire cea mai ridicată printre animale a fost înregistrată pentru lotul amestec. Examenul anatomo-patologic macroscopic a identificat modificări tisulare majore la toți indivizii intoxicați cu CCl_4 , aspectul organului fiind diferit de cel al martorilor neintoxicați. Comparativ cu martorul intoxicat, ficatul prelevat de la șobolanii din loturile tratate cu extracte vegetale, prezintă un aspect mai sănătos și o culoare roșie îmbunătățită, însă rămâne decelabilă infiltrația grasă a hepatocitelor. În intoxicația cronică, s-a putut decela apariția nodulilor de regenerare hepatică la nivelul regiunilor inițiale de citoliză pentru toate loturile tratate cu extractele vegetale de analizat. Analiza histopatologică a confirmat efectele hepatoprotectoare ale amestecului de extracte prin păstrarea, într-un procent foarte ridicat, a arhitecturii hepatice normale (inclusiv în spațiile porte), prin anihilarea hipoxiei celulare și prin absența fenomenelor de necroză tisulară sau apoptoză celulară, spre deosebire de celelalte probe. În ceea ce privește influența extractelor asupra

statusului redox în omogenate tisulare și suspensii mitocondriale de șobolan, s-a observat că, atât extractele individuale, dar mai ales amestecul de extracte, determină amplificarea răspunsului protector al sistemelor antioxidante endogene, cu păstrarea în limite normale a nivelului antioxidantilor totali pentru loturile pretratate cu extractele vegetale sau amestecul de extracte și scăparea de sub supravegherea antioxidantă a stresului oxidativ pentru lotul tratat doar cu agentul toxic.

❖ Formularea tehnico-farmaceutică a comprimatelor masticabile, care conțin amestecul de extracte ca principiu activ, a concretizat acțiunile terapeutice dovedite în urma cercetării într-o formă farmaceutică cu numeroase beneficii pentru diferite categorii de pacienți, îndeplinind cerințele de calitate specificate în monografiile în vigoare și asigurând cedarea corespunzătoare în organism.

Gradul de Originalitate

Elementele de originalitate ale tezei sunt: asocierea produselor vegetale selectate și procentul propus din fiecare extract vegetal uscat în vederea formulării fitopreparatului final; forma farmaceutică solidă masticabilă destinată administrării orale pentru obținerea efectului hepatoprotector-hepatoregenerator, antioxidant și antihepatotoxic, ca alternativă mai avantajoasă la comprimatele convenționale; evaluarea compoziției chimice și a comportamentului constituenților chimici prin metode diverse (analiza farmacognostică, metoda UHPLC-HRMS/MS, metode antioxidante *in vitro*, studiul stabilității în timp) pentru extractele componente ale fitomedicamentului, în vederea standardizării și cuantificării preparatului din perspective fitochimice și farmacocinetice; evaluarea impactului fitofarmacologic și toxicologic al fitomedicamentului nou dezvoltat asupra celulei animale prin efectuarea de studii *in vivo* pe nevertebrate și animale de laborator, *in vitro* pe linii celulare de carcinom uman HepG2, *in silico* prin andocare și modelare moleculară și biochimice asupra statusului redox subcelular în omogenate tisulare și preparate mitocondriale de șobolan.

Perspective de Cercetare

În viitor ne propunem să aducem cercetarea din etapa preclinică în etapa clinică prin realizarea un studiu clinic pe voluntari sănătoși, predispuși la afectare hepatică, dar și pe pacienți care prezintă afecțiuni hepatice instalate în diverse stadii, pentru a cuantifica acțiunea terapeutică la om, gradul de îmbunătățire a calității vieții sau nivelul de protecție oferit de fitomedicament, ținând cont de variabilitatea răspunsului în prezența factorilor interindividuali, factorilor de risc sau factorilor de mediu.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Costea, L.; Ghica, M.; Costea, T.; Gîrd, C.E. Spectrophotometric evaluation of flavonoids, phenolcarboxylic acids and total phenolic contents of several indigenous herbal products with potential hepatoprotective effect. *Farmacia* 2021, *69*, 1176–1181. 10.31925/farmacia.2021.6.23.
2. Mišek, M.; Marcinčáková, D.; Legáth, J. Polyphenols Content, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Assessment of *Taraxacum officinale* Extracts Prepared through the Micelle-Mediated Extraction Method. *Molecules* 2019, *24*, 1025. 10.3390/molecules24061025.
3. Kenny, O.; J Smyth, T.; M Hewage, C.; P Brunton, N. Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS/MS analysis of phenolic compounds in dandelion (*Taraxacum officinale*) root extracts. *Free Radicals and Antioxidants* 2014, *4*, 55–61. 10.5530/fra.2014.1.9.
4. Costea, L.; Chişescu, C.L.; Boscencu, R.; Ghica, M.; Lupuliasa, D.; Mihai, D.P.; Deculescu-Ioniţă, T.; Duţu, L.E.; Popescu, M.L.; Luţă, E.-A.; et al. The Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Five Vegetal Extracts with Hepatoprotective Potential. *Plants* 2022, *11*, 1680. 10.3390/plants11131680.
5. Johari, S.A.; Rasmussen, K.; Gulumian, M.; Ghazi-Khansari, M.; Tetarazako, N.; Kashiwada, S.; Asghari, S.; Park, J.-W.; Yu, I.J. Introducing a new standardized nanomaterial environmental toxicity screening testing procedure, ISO/TS 20787: aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater Lakes using *Artemia sp.* nauplii. *Toxicol Mech Methods* 2019, *29*, 95–109. 10.1080/15376516.2018.1512695.
6. Braguini, W.L.; Alves, B.B.; Pires, N.V. Toxicity assessment of *Lavandula officinalis* extracts in Brine Shrimp (*Artemia salina*). *Toxicol Mech Methods* 2019, *29*, 411–420. 10.1080/15376516.2019.1567892.
7. Coe, F.G.; Parikh, D.M.; Johnson, C.A.; Anderson, G.J. The good and the bad: Alkaloid screening and brineshrimp bioassays of aqueous extracts of 31 medicinal plants of eastern Nicaragua. *Pharm Biol* 2012, *50*, 384–392. 10.3109/13880209.2011.608077.
8. Hong, L.S.; Ibrahim, D.; Kassim, J. Assessment of in vivo and in vitro cytotoxic activity of hydrolysable tannin extracted from *Rhizophora apiculata* barks. *World J Microbiol Biotechnol* 2011, *27*, 2737–2740. 10.1007/s11274-011-0727-1.
9. Montanher Pimentel, A.B.; Pizzolatti, M.G.; Brighente Costa, I.M. An Application of the Brine Shrimp Bioassay for General Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Acta Farm. Bonarense* 2002, *21*, 175–178.
10. Kwon, D.H.; Kwon, H.Y.; Kim, H.J.; Chang, E.J.; Kim, M.B.; Yoon, S.K.; Song, E.Y.; Yoon, D.Y.; Lee, Y.H.; Choi, I.S.; et al. Inhibition of hepatitis B virus by an aqueous extract of *Agrimonia eupatoria* L. *Phytotherapy Research* 2005, *19*, 355–358. 10.1002/ptr.1689.
11. Mancini, D.A.P.; Torres, R.P.; Pinto, J.R.; Mancini-Filho, J. Inhibition of DNA virus: Herpes-1 (HSV-1) in cellular culture replication, through an antioxidant treatment extracted from rosemary spice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, *45*, 127–133. 10.1590/S1984-82502009000100016.
12. Nasr-Eldin, M.; Abdelhamid, A.; Baraka, D. Antibiofilm and Antiviral Potential of Leaf Extracts from *Moringa oleifera* and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Lam.). *Egypt J Microbiol* 2018, *52*, 129–139. 10.21608/ejm.2017.1439.1027.
13. Garber, A.; Barnard, L.; Pickrell, C. Review of Whole Plant Extracts With Activity Against Herpes Simplex Viruses In Vitro and In Vivo. *J Evid Based Integr Med* 2021, *26*, 1–57. 10.1177/2515690X20978394.
14. Lin, X.; Bai, D.; Wei, Z.; Zhang, Y.; Huang, Y.; Deng, H.; Huang, X. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PLoS One* 2019, *14*. 10.1371/journal.pone.0216711.
15. Suganya, K.; Poornima, A.; Sumathi, S.; Chigurupati, S.; Alyamani, N.M.; Ghazi Felemban, S.; Bhatia, S.; Al-Harrasi, A.; Sayed Moawad, A. Rutin induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in human triple-negative breast carcinoma MDA-MB-231 cells – In vitro and in silico docking studies. *Arabian Journal of Chemistry* 2022, *15*, 104021. 10.1016/j.arabjc.2022.104021.