

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

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA-ELENA**

**Student doctorand:**

**IONIȚĂ ELENA-IULIANA**

**2024**

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

**ROLUL COMPUȘILOR NATURALI ÎN  
MANAGEMENTUL HIPERLIPIDEMIILOR  
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA-ELENA**

**Student doctorand:**

**IONIȚĂ ELENA-IULIANA**

**2024**

## CUPRINS

INTRODUCERE .....	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII .....	3
1. ROLUL LIPIDELOR ÎN ORGANISM.....	3
1.1. Tipuri de lipide.....	4
1.2. Digestia și absorbția lipidelor .....	6
1.3. Importanța lipidelor .....	7
1.4. Reglarea producției de lipide .....	7
1.5. Structura țesutului adipos .....	7
1.6. Hormonii țesutului adipos .....	8
1.7. Hiperlipidemii.....	10
1.7.1. Boli care generează hiperlipidemii .....	11
1.7.2. Boli produse de hiperlipidemii .....	12
1.8. Dislipidemii .....	12
1.9. Tratamentul hiperlipidemiilor.....	12
2. SURSE VEGETALE CU ACȚIUNE HIPOLIPEMIANTĂ.....	14
2.1. Rosmarinus officinalis L. ....	14
2.2. Cynara scolymus L. ....	15
2.3. Crataegi species .....	16
2.4. Allium cepa L. ....	19
2.5. Apium graveolens L.....	20
2.6. Cichorium intybus L.....	21

CERCETĂRI PERSONALE .....	22
3. STABILIREA CALITĂȚII MATERIILOR PRIME VEGETALE .....	22
3.1. Determinarea conținutului în principii active, pentru produsele vegetale selectate .....	22
3.1.1. Obținerea soluțiilor extractive .....	22
3.1.2. Dozarea conținutului de polifenoli totali din soluțiile extractive .....	22
3.1.3. Dozarea conținutului de acizi fenolcarboxilici (AFC) din soluțiile extractive.....	23
3.1.4. Dozarea conținutului de flavone (flavonozide) din soluțiile extractive .....	24
3.2. Concluzii.....	25
4. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTELOR VEGETALE .....	26
4.1. Obținerea extractelor vegetale prin metoda liofilizării.....	26
4.2. Determinarea calității extractelor vegetale .....	26
4.2.1. Analiza organoleptică .....	26
4.2.2. Dozarea polifenolilor totali.....	27
4.2.3. Dozarea acizilor fenolcarboxilici (AFC) .....	27
4.2.4. Dozarea conținutului de flavone (flavonozide) .....	28
4.2.5. Dozarea polifenolilor prin metoda UHPLC-MS .....	29
4.3. Prelucrarea statistică a datelor .....	30
4.4. Determinarea in vitro a acțiunii antioxidante .....	32
4.4.1. Metoda ABTS .....	32
4.4.2. Metoda DPPH.....	33
4.4.3. Metoda FRAP .....	34
4.5. Analiza statistică a diferențelor dintre activitățile antioxidante.....	35
4.5.1. Matricea de corelație a testelor Pearson și Heatmap .....	37
4.5.2. Evaluarea modelului de comportament antioxidant al extractelor de plante.....	40
4.6. Concluzii.....	44
5. CERCETĂRI DE PREDICȚII COMPUTAȚIONALE CU ȚINTE BIOLOGICE .....	50
5.1. Materiale și metode .....	50
5.1.1. Predicția țintei.....	50

5.1.2. Modelarea omologiei.....	50
5.1.3. Docking molecular .....	51
5.1.4. Dinamica moleculară.....	52
5.2. Rezultate .....	52
5.3. Concluzii.....	58
6. CERCETAREA MINERALELOR DIN EXTRACTELE VEGETALE .....	61
6.1. Materiale și metode .....	61
6.2. Rezultate .....	62
7. EVALUAREA FITOTOXICITĂȚII EXTRACTELOR VEGETALE .....	64
7.1. Testarea citotoxicității pe larve de Artemia sp. (BSLA = brine shrimp letality assay)...	64
7.1.1. Protocol experimental.....	65
7.1.2. Rezultate și discuții.....	66
7.2. Testarea citotoxicității pe Daphnia magna și Daphnia pulex.....	69
7.2.1. Materiale și metode .....	69
7.2.2. Rezultate și discuții.....	70
8. EVALUĂRI BIOCHIMICE ȘI HISTOLOGICE.....	79
8.1. Protocol experimental pentru animalele de laborator.....	79
8.2. Materiale și metode .....	82
8.2.1. Determinarea glicemiei prin metoda Cormay .....	82
8.2.2. Determinarea acidului uric prin metoda enzimatică.....	82
8.2.3. Determinarea homocisteinei prin metoda enzimatică .....	82
8.2.4. Determinarea trigliceridelor prin metoda Cormay .....	82
8.2.5. Determinarea colesterolului total prin metoda Cormay .....	83
8.2.6. Determinarea HDL-colesterolului prin metoda Cormay .....	83
8.2.7. Determinarea LDL-colesterolului prin metoda enzimatică .....	83
8.2.8. Determinarea calciului prin metoda Cormay.....	83
8.2.9. Determinarea sodiului prin metoda enzimatică .....	83
8.2.10. Determinarea potasiului prin metoda turbidimetrică.....	83
8.2.11. Determinarea fierului prin metoda Cormay.....	84

8.2.12. Determinarea magneziului prin metoda Cormay.....	84
8.2.13. Determinarea fosforului prin metoda Cormay.....	84
8.2.14. Determinarea clorurilor prin metoda colorimetrică.....	84
8.2.15. Analiza statistică.....	84
8.3. Rezultate și discuții.....	85
8.4. Examen histopatologic .....	95
8.4.1. Materiale și metode .....	95
8.4.2. Rezultate și discuții.....	95
8.4.3. Concluzii.....	105
8.5. Capacitatea extractelor vegetale de a influența statusul redox al diferitelor tipuri de țesuturi animale.....	106
8.5.1. Materiale și metode .....	106
8.5.2. Rezultate și discuții.....	107
9. PRELUCRAREA AMESTECULUI DE EXTRACTE VEGETALE ÎN FORME FARMACEUTICE SOLIDE DOZATE PENTRU ADMINISTRARE ORALĂ .....	116
9.1. Obținerea capsulelor operculate .....	116
9.2. Rezultate și discuții.....	118
CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE .....	120
BIBLIOGRAFIE .....	123
ANEXE.....	154

## Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI:

1. **Ilie (Ioniță) Elena Iuliana**, Olaru OT, Pițuru MT, Pogan AC, Moroșan E, Văleanu A, Corbu AR, Nica AE, Țăpoi DA, Tănăsescu MD, Mincă A, Gîrd CE. In vivo evaluation of the effects induced by hawthorn (*Crataegi* sp.) extract in rats, in two experimental diet models. *Farmacia*. 2024 Apr; 72(2): 305–314, revistă indexată ISI, cu factor de impact **1,2**, ISSN: 2065-0019 (*for the Online Edition*) and 0014-8237 (*for the Printed Edition*), link: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.2.9>. Articolul a fost elaborat din capitolele 7 și 8 ale tezei de doctorat.

2. **Ilie Elena Iuliana**, Popescu L, Luță EA, Biță A, Corbu AR, Mihai DP, Pogan AC, Balaci TD, Mincă A, Duțu LE, et al. Phytochemical Characterization and Antioxidant Activity Evaluation for Some Plant Extracts in Conjunction with Pharmacological Mechanism Prediction: Insights into Potential Therapeutic Applications in Dyslipidemia and Obesity. *Biomedicines*. 2024 June; 12(7):1431, revistă indexată ISI, factor de impact **3,9**, ISSN: 2227-9059, link: <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071431>. Articolul a fost elaborat din capitolele 4 și 5 ale tezei de doctorat.

Lucrări științifice comunicate la manifestări internaționale:

➤ **Elena Iuliana Ilie**, Liliana Costea, Emanuela Alice Luță, Cerasela Elena Gîrd. Natural compounds with hypolipidemic action (2023). Phytochemical Society of Europe Meeting 2023: „Natural compounds as regulators of molecular mechanisms in health and disease”, Seoul, Coreea de Sud, 19-21 Mai, rezumat publicat în *Book of abstracts*.

## INTRODUCERE

Hiperlipidemia, o afecțiune cu care ne confruntăm tot mai frecvent, se caracterizează prin valori crescute de colesterol seric (hipercolesterolemia), trigliceride (hipertrigliceridemia) sau ambele (hiperlipidemia mixtă), fapt datorat și unui stil de viață haotic, unui stres marcant la nivelul organismului și nu numai, dar și unei moșteniri genetice. Efectele induse de această patologie sunt devastatoare la nivelul organismului, diversificarea afecțiunilor cardiovasculare fiind în corelație directă cu hiperlipidemia. Tratamentul de bază se axează în special pe molecula de sinteză, dar compușii naturali au constituit și vor constitui o alternativă în tratament, știind că sunt bine tolerați în administrare, de cele mai multe ori fără efecte secundare, chiar în tratament pe perioadă îndelungată.

Desigur, obiectivul actual al terapiilor în această afecțiune complexă este să reducă efectele secundare induse de hiperlipidemie și să mențină constantele biochimice la valori optime, în special la categoriile vulnerabile de pacienți și să asigure un tratament care să fie cât mai blând cu organismul în ceea ce privește efectele secundare.

Deși piața farmaceutică oferă o diversitate de produse medicamentoase, inclusiv fitoterapice, necesitatea unor formulări care să conțină extracte vegetale standardizate în principii active și supuse tuturor testelor biochimice, poate constitui un progres din punct de vedere terapeutic.

În acest context, scopul cercetării este să formuleze medicamente fitoterapice pe bază de combinații de extracte vegetale standardizate în principii active, corelat cu determinarea acțiunii antioxidante a acestora, citotoxicității pe nevertebrate, testări biochimice pe animalele de experiență în asociere cu diverse modele de dietă, evaluări histologice ale organelor țintă supuse deteriorărilor specifice patologiei și propunerea de forme farmaceutice.

**Obiectivele cercetării** sunt: selectarea unor materii prime vegetale, pe baza datelor din literatura de specialitate, cu acțiune hipocolesterolemiantă, hipolipidemică, antioxidantă; stabilirea calității materiilor prime vegetale prin analize de profil specifice domeniului fitochimiei; obținerea extractelor vegetale și determinarea calității acestora prin dozarea de principii active prin metode spectrofotometrice și HPLC; determinarea conținutului de minerale; determinarea acțiunii antioxidante *in vitro*; stabilirea legăturii dintre compușii identificați și diverse ținte biologice pe baza studiilor computaționale; evaluarea fitotoxicității; evaluarea biochimică, histologică și a statusului redox pe diferite tipuri de organe; obținerea de forme farmaceutice solide, dozate cu administrare orală.



## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### 1. Rolul lipidelor în organism

Acest capitol cuprinde date despre tipurile de lipide, digestia și absorbția acestora, importanța și reglarea producției de lipide, structura și hormonii țesutului adipos, hiperlipidemii, cu bolile generate de către acestea, dar și cu bolile din cauza cărora pot apărea, dislipidemii și tratamentul hiperlipidemiilor.

### 2. Surse vegetale cu acțiune hipolipemiantă

Acest capitol cuprinde date selective din literatura de specialitate despre diferite surse vegetale care sunt utilizate pentru acțiunea lor hipolipemiantă și antioxidantă.

## CERCETĂRI PERSONALE

### 3. Stabilirea calității materiilor prime vegetale

S-a folosit analiza farmacognostică pentru studierea celor cinci produse vegetale selectate pe baza literaturii de specialitate (*Rosmarini folium*, *Cynarae folium*, *Cichorii herba*, *Allii cepae folium* (proaspăt), *Apii graveolentis folium* var. *dulcis* (proaspăt)). Principiile active au fost dozate prin metode spectrofotometrice, conform tabelului III.1.

Tabel III.1. Dozări ale polifenolilor, acizilor fenolcarboxilici și flavonelor

<i>Produs vegetal</i>	Polifenoli		AFC		Flavone	
	Etanol 50%	Etanol 70%	Etanol 50%	Etanol 70%	Etanol 50%	Etanol 70%
<i>Ceapă verde</i>	0,1015	0,4354	ND	ND	0,1643	0,1374
<i>Apio</i>	0,0798	0,1034	0,0355	0,0644	0,0407	0,0626
<i>Rozmarin</i>	6,3423	5,9178	7,7078	6,7835	0,8844	0,9544
<i>Cicoare</i>	2,1362	1,2697	1,4107	1,1392	0,4912	0,3956
<i>Anghinare</i>	2,5959	2,4798	1,9187	2,0610	1,3868	1,3972

ND = nedetectat

În concordanță cu rezultatele prezentate mai sus, și luând în considerare distribuția cât mai uniformă a datelor, la obținerea extractelor vegetale s-a folosit etanolul 50% pentru cicoare și anghinare, și etanolul 70% pentru rozmarin, ceapă verde și apio.

### 4. Obținerea și caracterizarea extractelor vegetale

În vederea obținerii unor extracte destinate administrării interne în tratamentul hiperlipidemiilor, s-a folosit liofilizarea, metodă prin care constituenții chimici activi de interes nu se degradează. Întrucât randamentul de obținere al extractului de apio a fost unul foarte mic, iar extractul obținut nu a avut consistența și stabilitatea scontate, a fost introdus în lucru și extractul de păducel,

calitativ și stabil, cu un randament bun, și care, conform literaturii de specialitate, are proprietăți hipolipemiante. S-au efectuat dozări spectrofotometrice pentru caracterizarea extractelor vegetale, conform tabelului IV.1 [1].

Tabelul IV.1. Conținutul chimic și valorile antioxidante ale extractelor vegetale

Extract vegetal	TP (g acid tanic / 100 g EU)	FL (g rutozidă / 100 g EU)	AFC (g acid clorogenic / 100 g EU)	IC50 ABTS (mg/mL)	IC50 DPPH (mg/mL)	EC50 FRAP (mg/mL)
ACE	3.77	2.03	ND	0.18	1.32	1.41
AGE	0.57	0.35	0.38	2.66	10.31	2.65
CE	7.74	4.38	4.47	0.20	0.37	0.06
CGE	25.93	5.32	14.05	0.03	0.11	0.13
CHE	30.51	3.64	6.15	0.15	0.34	0.26
RSE	39.62	3.71	22.05	0.04	0.11	0.15

EU: extract uscat; PT: polifenoli totali; FL: flavone; AFC: acizi fenolcarboxilici; ND: nedetectat; ABTS: metoda acidului 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic; DPPH: metoda 2,2-difenil-1-picril-hidrazină; FRAP: metoda puterii antioxidante de reducere a fierului.

Rezultatele au evidențiat faptul că cele mai mari concentrații de PT pentru RSE ( $39.62 \pm 13.16$  g de acid tanic/100 g de extract uscat), CHE ( $30.51 \pm 1.96$  g de acid tanic/100 g de extract uscat) și CGE ( $25.93 \pm 1.10$  g de acid tanic/100 g de extract uscat) au fost semnificative din punct de vedere statistic ( $p < 0.05$ ), comparativ cu cele obținute pentru celelalte extracte. O diferență semnificativă între extractele vegetale a fost, de asemenea, observată pentru determinarea AFC ( $p < 0.05$ ), dezvăluind valori mai mari pentru RSE ( $22.05 \pm 1.31$  g acid clorogenic/100 g extract uscat) și CGE ( $14.05 \pm 1.65$  g acid clorogenic/100 g extract uscat). Profilul chimic al FL a arătat că extractul de păducel a fost cel mai bogat, cu o concentrație semnificativă de  $5.32 \pm 0.26$  g exprimată în rutozidă ( $p < 0.001$ ) [1].

Capacitatea antioxidantă de reducere a ionilor ferici a fost mult mai bună pentru extractul de anghinare, CE înregistrând cea mai mică valoare IC50 prin această metodă (CE:  $EC50_{FRAP} = 0.06$  mg/mL). Dar următoarele extracte care au prezentat un efect antioxidant ridicat au fost, de asemenea, CGE ( $EC50_{FRAP} = 0.13$  mg/mL) și RSE ( $EC50_{FRAP} = 0.15$  mg/mL). Capacitatea de eliminare a radicalilor liberi de către RSE și CGE, evaluată prin toate cele trei tehnici antioxidante, a fost foarte apropiată de valoarea IC50 a referinței ( $IC50$  acid ascorbic =  $0.0165$  mg/mL). Cel mai mic efect antioxidant obținut în cadrul acestui studiu a fost disponibil pentru extractul de țelină, având cea mai mare valoare IC50 dintre toate cele șase extracte, indiferent de tipul de metodă (AGE:  $IC50_{ABTS} = 2.66$  mg/mL;  $IC50_{DPPH} = 10.31$  mg/mL;  $EC50_{FRAP} = 2.65$  mg/mL). În concordanță cu modelul de

comportament piramidal, extractul de ceapă a fost agentul antioxidant modest, luând în considerare rezultatele metodelor DPPH și FRAP (ACE:  $IC_{50_{DPPH}} = 1.32 \text{ mg/mL}$ ;  $EC_{50_{FRAP}} = 1.41 \text{ mg/mL}$ ). Extractul vegetal cu cea mai mică concentrație de fitocompuși a fost AGE (FL:  $0.35 \pm 0.07 \text{ g}$  rutozidă/100 g extract uscat; TP:  $0.57 \pm 0.06 \text{ g}$  acid tanic/100 g extract uscat; AGE:  $0.38 \pm 0.01 \text{ g}$  acid clorogenic/100 g extract uscat). Concentrații modeste, dar semnificative din punct de vedere statistic, de FL ( $2.03 \pm 0.12 \text{ g}$  rutozidă/100 g extract uscat) și TP ( $3.77 \pm 0.84 \text{ g}$  acid tanic/100 g extract uscat) au fost înregistrate pentru ACE, în timp ce nivelul de AFC din extractul de ceapă nu a putut fi detectat spectrofotometric [1].

Pentru a evidenția mult mai ușor și mai clar cât de strâns legate sunt variabilele analizate, s-a creat Matricea de corelație Heatmap (HCM), prezentată în figura 4.1. După aplicarea setării matricei, se observă că orice celulă cu o valoare a coeficientului de corelație de 0.4 ar fi colorată în albastru, celulele cu o valoare de 0.7 ar fi colorate în alb, iar celulele cu o valoare de 1 ar fi colorate în roșu. Se va obține un gradient de culoare în intervalul de valori [0.4-1], ale cărui nuanțe vor indica intensitatea corelației, ceea ce va face ca matricea să fie mult mai ușor de înțeles pentru cititor. În intervalul de valori, punctul minim este 0.4, punctul median este 0.7, iar punctul maxim este +1. Orice valoare cuprinsă între aceste puncte va avea nuanța de culoare care reprezintă acea valoare a coeficientului de corelație [1].

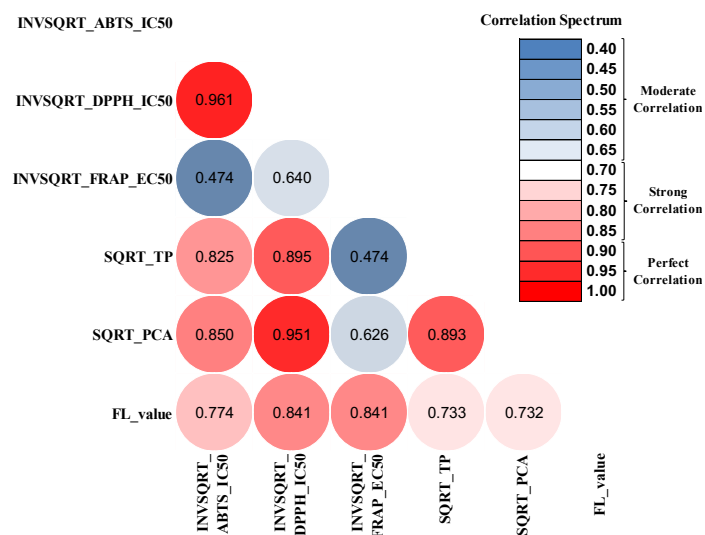


Figura 4.1. Matricea de corelație Heatmap și spectrul de corelație (corelație moderată: [0.40 – 0.69]; corelație puternică: [0.70 – 0.89]; corelație perfectă: [0.90 – 1.00];  $|r|$  = valoarea absolută a coeficientului de corelație Pearson; INVSQRT = transformarea inversă a rădăcinii pătrate a datelor; SQRT = transformarea rădăcinii pătrate a datelor).

Se poate observa cu ușurință în HCM prezentat în figura 4.5 că corelațiile dintre DPPH\_IC50 vs ABTS\_IC50 ( $|r| = 0.961$ ) și dintre PCA vs DPPH\_IC50 ( $|r| = 0.951$ ) sunt corelațiile perfecte (corelații foarte puternice), deoarece sunt celulele cu cea mai închisă nuanță de roșu.

De asemenea, corelațiile dintre TP vs FRAP\_EC50 ( $|r| = 0.474$ ) și FRAP vs ABTS ( $|r| = 0.474$ ) s-au dovedit a fi corelații moderate colorate în cea mai închisă nuanță de albastru.

După ce s-a realizat metoda UHPLC-MS, s-a putut observa că acidul clorogenic și acidul rozmarinic au prezentat concentrații deosebit de ridicate, ceea ce indică abundența acestora în extractele vegetale respective. Prezența și cantitatea acestor compuși contribuie în mod semnificativ la beneficiile antioxidante și la potențialele beneficii pentru sănătate ale extractelor. Concentrațiile scăzute de acid galic, acid abscisic, acid elagic și acid p-cumaric în toate probele analizate, după cuantificarea prin metoda UHPLC-MS, pot fi atribuite mai multor factori intrinseci naturii acestor compuși și caracteristicilor materialelor vegetale din care au fost extrași [1].

### **5. Cercetări de predicții computaționale cu ținte biologice**

Pe baza analizei UHPLC-MS, au fost selectate acidul rozmarinic (RA) și acidul clorogenic (CGA) pentru studii *in silico* suplimentare, pentru a prezice potențialul mecanism farmacologic implicat în activitățile hipolipemice și anti-obezitate. Predicțiile realizate cu ajutorul algoritmului PASS au relevat probabilități mai mari de 50 % pentru ca RA să exercite activități antioxidante, de curățare a radicalilor liberi, de inhibitor al peroxidazei lipidice, hipolipemice, de antagonist al colesterolului și de agonist al receptorului activat al proliferării peroxizomale, în timp ce pentru CGA algoritmul a prezis activități antioxidante, reducătoare, de curățare a radicalilor liberi, de inhibitor al peroxidazei lipidice, hipolipemice și de reglare a metabolismului lipidic. Mai mult, abordările SwissTargetPrediction și SEA au prezis pentru ambii compuși fitochimici activități inhibitoare asupra mai multor subtipuri de anhidrază carbonică. În special, ambele substanțe au fost prezise ca inhibitori ai izoformelor 5A și 5B ale anhidrazei carbonice, ambele fiind exprimate la nivel mitocondrial. Este interesant faptul că s-a demonstrat că anhidraza carbonică 5A (CA5A) este implicată în sinteza hepatică a acizilor grași și că este o țintă terapeutică promițătoare pentru gestionarea obezității [2]. Prin urmare, am ales CA5A ca țintă moleculară putativă pentru RA și CGA. Acetazolamida, un inhibitor CA neselectiv, a fost, de asemenea, utilizată ca un control pozitiv pentru ambele predicții. Controlul pozitiv a avut o probabilitate de 0,2915 de a inhiba CA5A și un coeficient Tanimoto maxim de 1 pentru aceeași țintă, subliniind faptul că predicția SEA este mai fiabilă în identificarea inhibitorilor adevărați în acest caz.

În plus, s-a utilizat structura YASARA pentru a construi modele omologice ale CA5A uman, având în vedere că doar omologul de șoarece a fost cristalizat anterior. Folosind două structuri CA5A de șoarece ca șabloane (1KEQ și 1DMY), s-au construit două modele cu conformații diferite ale situsului de legare, unul cu o apă catalitică legată de  $Zn^{2+}$  (1KEQ) și altul cu acetazolamidă (un inhibitor neselectiv al anhidrazei carbonice) legată direct de  $Zn^{2+}$  catalitic (1DMY). S-au ales două modele pentru docare moleculară, considerând că substanțele fitochimice selectate fie ar putea lega molecula de apă prin grupările hidroxil fenolice, fie ar interacționa prin sarcini atractive prin fracțiunea carboxil. Ambele modele au avut scoruri de ciocnire excepțional de bune, încadrându-se în percentila 100. Numai trei lanțuri laterale au avut conformații care nu sunt fezabile din punct de vedere statistic în modelul 1KEQ, în timp ce pentru modelul 1DMY a fost observat un singur rotamer slab. În plus, modelul 1KEQ a avut 96,35% rotamere favorizate, în timp ce modelul 1DMY a prezentat 97,72% conformații favorizate ale lanțurilor laterale. Scorul Z al modelului 1KEQ a fost negativ, în timp ce scorul modelului 1DMY a avut o valoare foarte apropiată de 0, sugerând că ambele structuri au avut scoruri de calitate apropiate de media structurilor de referință de înaltă calitate. În plus, niciuna dintre structurile prezise nu a avut abateri ale pozițiilor atomilor  $C\beta$  mai mari de 0,25 Å, în timp ce o proporție foarte mică de lungimi și unghiuri ale legăturilor au fost în afara intervalelor ideale. Analiza graficului Ramachandran a arătat că niciun reziduu nu a fost modelat ca valoare aberantă Ramachandran, în timp ce 97,63% din reziduuri au fost considerate Ramachandran favorizate pentru modelul bazat pe 1KEQ, iar 98,72% au fost favorizate pentru modelul bazat pe 1DMY. Modelul 1KEQ a avut un scor MolProbity mai apropiat de 1, evidențiind calitatea superioară a acestui model particular [1].

Simulările de andocare moleculară au fost efectuate utilizând structurile 3D validate ale CA5A uman. Acidul cafeic (CFA) și acetazolamida (AZM) au fost andocate ca controale pozitive pentru comparație. Am ales CFA ca control pozitiv pentru modelul homologic, care a inclus molecula de apă legată de zinc, luând în considerare următorii doi factori: a fost validat experimental anterior ca inhibitor al CA5A ( $K_i = 6,49 \mu M$ ) [4] și a fost, de asemenea, identificat în patru din cele șase extracte de plante evaluate. CFA a prezentat o energie de legare de -5,820 kcal/mol și a avut o poziție andocată în site-ul activ, care reflectă comportamentul de legare așteptat, angajându-se în legături de hidrogen cu molecula de apă catalitică și reziduuri relevante, cum ar fi Thr236, Gln103 și Gln128. De asemenea, s-au format interacțiuni hidrofobe cu reziduurile His130, Val157 și Leu234 din buzunarul de legare. AZM a fost fixat în situl activ al structurii fără apă și a avut o energie de legare prezisă de -7,140 kcal/mol. Nu este surprinzător faptul că fracțiunea sulfonamidă a format o legătură metalică

cu zincul catalitic și legături de hidrogen cu Glu142 și Thr235. În plus, inelul 1,3,4-tiadiazol s-a angajat în interacțiuni pi-alchil cu Leu234 și interacțiuni pi-sulfur și pi-pi în formă de T cu His130.

Studiile de andocare au arătat că RA are un potențial mai mare de a inhiba activitatea CA5A prin interacțiunea cu apa catalitică legată de atomul de Zn (șablon 1KEQ), în timp ce CGA a fost mai probabil să interacționeze favorabil cu conformația site-ului activ al CA5A legată de inhibitor prin legarea directă a Zn<sup>2+</sup> catalitic, similar cu acetazolamida (șablon 1DMY). Comportamentul diferit al celor doi liganzi este deosebit de interesant, având în vedere că ambele substanțe fitochimice sunt produse de condensare ale cunoscutului inhibitor CA5A acid cafeic. Calculele de docare au produs o energie de legare de -7,235 kcal/mol pentru RA și -7,465 kcal/mol pentru CGA, ambele valori fiind mai mici decât cele obținute pentru controalele pozitive. După cum se observă în figura 5.1. a,b, similar cu controlul pozitiv CGA, RA a format o legătură de hidrogen cu molecula de apă legată de zinc și alte patru legături de hidrogen cu Thr98, Ser233 și Thr235 prin intermediul grupărilor hidroxil fenolice. În plus, grupa carboxil s-a angajat în legături de hidrogen cu Gln128, în timp ce oxigenul cetonc a format o legătură de hidrogen cu Gln103. Complexul proteină-ligand este în continuare stabilizat prin interacțiuni hidrofobe, cum ar fi interacțiunile pi-sigma cu Leu234 și interacțiunile pi-alchil cu trei valine. Pe de altă parte, CGA a interacționat direct cu Zn<sup>2+</sup> catalitic prin gruparea carboxil prin intermediul sarcinilor atractive, în timp ce gruparea hidroxil din  $\alpha$ -carbonul a format o legătură de hidrogen cu Thr235 (similar cu AZM). Hidroxilii fenolici au format, de asemenea, legături de hidrogen cu Thr98, Gln128 și Tyr167 (Figura 5.1. c,d). În mod notabil, Thr235 este un reziduu conservat în rândul subtipurilor CA care se crede că este implicat în legarea inhibitorilor fenolici [3].

Au fost identificate mai multe activități farmacologice potențiale care sunt în conformitate cu domeniul de aplicare al cercetării, cum ar fi activitățile antioxidante, hipolipidemice, agoniste ale receptorului activat al proliferării peroxizomale (PPAR) și de reglare a metabolismului lipidic. Interesant, s-a demonstrat anterior că acidul rosmarinic își exercită într-adevăr activitățile antiinflamatoare și cardioprotectoare prin activarea PPAR-gamma [4]. În plus, atât acidul rosmarinic, cât și acidul clorogenic au fost prezise în studiu ca potențiali modulatori ai izoformelor anhidrazei carbonice 5 (CA5). CA5 este singura anhidrază carbonică exprimată la nivel mitocondrial și este implicată în biosinteza și lipogeneza acizilor grași endogeni. Cele două izoforme ale CA5, CA5A și CA5B, prezintă modele de expresie diferite, și anume, CA5A este expresată în principal în hepatocite, în timp ce CA5B are o distribuție tisulară mai largă [2, 5].

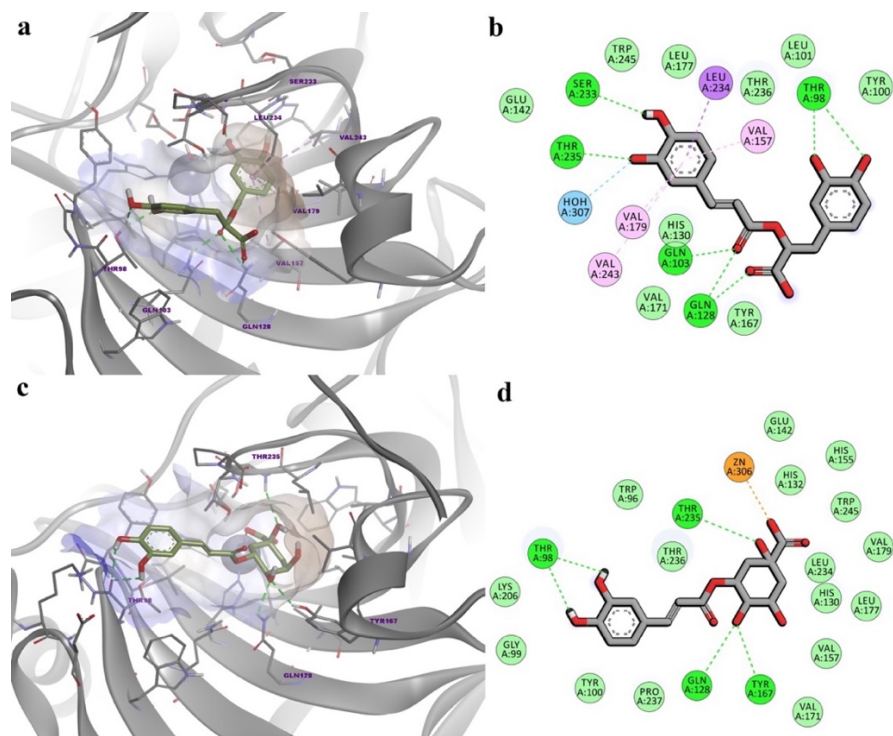


Figura 5.3. Poziții de legare preconizate ale RA și CGA în situsul activ al CA5A. (a) conformația prezisă a complexului RA-CA5A; (b) diagrama 2D a interacțiunilor prezise între RA și CA5A; (c) conformația prezisă a complexului CGA-CA5A; (d) diagrama 2D a interacțiunilor prezise între CGA și CA5A. Puncte verzi - legături de hidrogen, puncte albastre - legături de hidrogen cu moleculele de apă, puncte portocalii - sarcini atractive, puncte purpurii - interacțiuni pi-sigma, puncte roz - interacțiuni pi-alkilice, cercuri verde deschis - interacțiuni van der Waals.

Constatările *in silico* sugerează că potențialele activități antiobezitate și hipolipidemice ale extractului de anghinare, de păducel și de rozmarin ar putea fi parțial susținute de inhibarea CA5A hepatic de către acidul rosmarinic și acidul clorogenic. În plus, s-a demonstrat anterior că ambii compuși posedă efecte hipolipemice și de scădere a greutateii corporale și a masei de grăsime viscerală în mai multe contexte experimentale, inclusiv modele animale de obezitate, prin diverse mecanisme moleculare [6-9].

## 6. Cercetarea mineralelelor din extractele vegetale

Există o serie de corelații posibile între anumiți micronutrienți (zinc, magneziu, cupru, crom, seleniu, calciu, vanadiu, mangan, etc.) și nivelul de lipide din organism. Aceste corelații pot fi complexe și variabile în funcție de contextul specific, inclusiv de starea de sănătate a individului, dieta și alte condiții de mediu.

Siliciul este regăsit în rozmarin în cea mai mare cantitate, urmat de cicoare și anghinare, în cantitate similară. Fosforul are concentrația cea mai mare în extractul de cicoare, urmat de apio, anghinare, păducel și rozmarin, regăsindu-se cel mai puțin în ceapa verde. Sulfurul are cantități variabile în extractele analizate, astfel că are concentrații mari în cicoare, anghinare și rozmarin, și cantități considerabil mai reduse în ceapă verde, apio și păducel. Potasiul este prezent în cantități foarte mari în extractele de cicoare și rozmarin, urmat de cantități similare în păducel, ceapă verde și apio, cantitatea cea mai mică fiind determinată în extractul de anghinare. Calciul este prezent în cantități variabile în toate extractele, dar se regăsește în cea mai mare concentrație în extractul de rozmarin. Cromul, nichelul și manganul sunt prezente în rozmarin și cicoare, dar lipsesc în celelalte extracte vegetale. Toate extractele conțin fier, însă cantitatea cea mai mare se regăsește în rozmarin. Cuprul este prezent în păducel și cicoare, dar lipsește în celelalte extracte. Deși prezente în toate extractele, zincul este mai concentrat în cicoare, în timp ce rubidiul este în cantitate mai mare în anghinare. Au fost determinate cantități similare de argint în ceapă verde și păducel. Magneziul este regăsit în cantități importante în cicoare, anghinare și apio, este detectat în probele de ceapă verde, dar lipsește în păducel și rozmarin. Aluminiul este prezent în probele de anghinare și apio, în timp ce seleniul se regăsește doar în anghinare. A fost cuantificat, în cantități variabile, uraniul în probele de ceapă verde, păducel și cicoare, detectat în probele de rozmarin și anghinare, și nedetectat în apio.

Elemente precum titanul, staniul, stibiul, wolframul, mercurul, molibdenul, vanadiul, cobaltul și arsenicul nu s-au regăsit în niciuna dintre probele de extracte vegetale analizate.

Existența unor elemente care s-au regăsit (detectat) doar în una sau două din cele trei determinări realizate pentru fiecare extract vegetal, poate sugera neuniformitatea probelor de analizat.

## **7. Evaluarea fitotoxicității extractelor vegetale**

Testele de toxicitate care utilizează specii de nevertebrate, precum *Artemia* și *Daphnia* (*D. magna* și *D. pulex*) reduc numărul de vertebrate folosite în experimente, aliniind practicile de laborator cu principiile de reducere, înlocuire și rafinare (principiile „3Rs”) promovate de organizații bioetice globale [10].

În cazul speciilor de *Artemia*, viabilitatea larvelor la 24h la concentrațiile testate cuprinse între 500 - 2500  $\mu\text{g/mL}$  este foarte ridicată, între 80-100%, conform figurii 7.1. Reducerea cu 20% a fost înregistrată la concentrația de 2500  $\mu\text{g/mL}$  a extractelor de AG (anghinare) și RZ (rozmarin), și poate fi corelată cu diferențele fitochimice. Viabilitatea scăzută sub 50% este înregistrată pentru concentrația de 5000  $\mu\text{g/mL}$  la extractele CI (cicoare) și AG (anghinare).



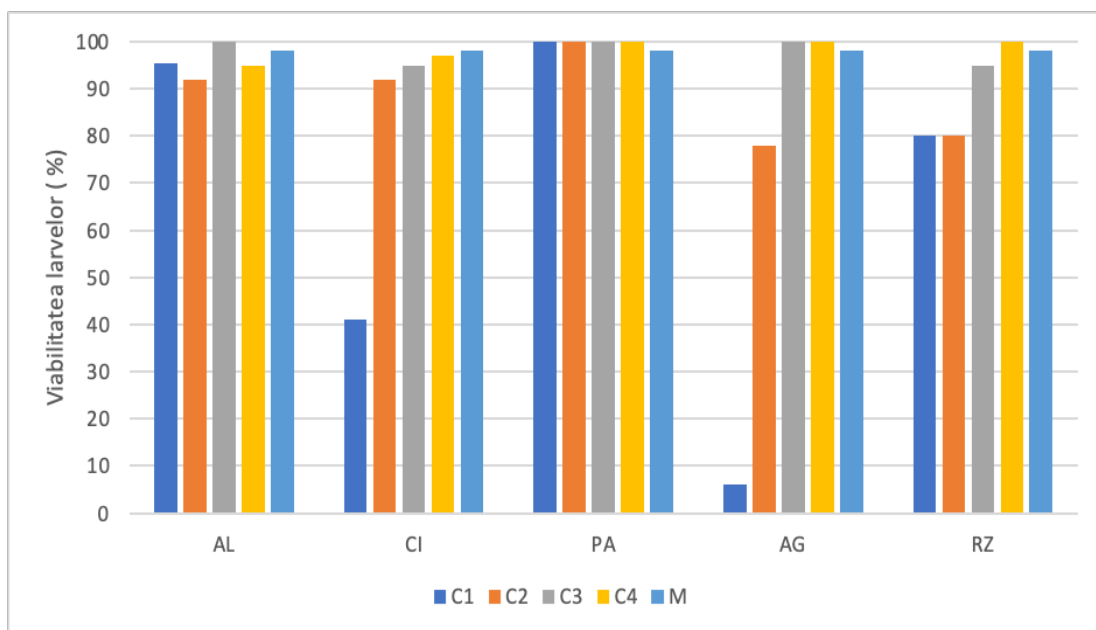


Figura 7.1. Viabilitatea (%) a larvelor de *Artemia salina* expuse la extractele testate, după 24h (test de toxicitate acută); C1 = 5000  $\mu\text{g/mL}$ ; C2 = 2500  $\mu\text{g/mL}$ ; C3 = 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; C4 = 500  $\mu\text{g/mL}$ ; M = martor (apă salină)

Conform acestor rezultate se pot considera toate extractele ca fiind netoxice la concentrații de maxim 2500  $\mu\text{g/mL}$ .

Testele de toxicitate pe *Daphnia* sunt valoroase pentru că permit evaluarea rapidă a mai multor parametri, inclusiv mortalitatea, inhibiția creșterii, și efectele subletale, cum ar fi schimbările comportamentale. Extractele au fost codificate conform denumirilor prescurtate folosite în Capitolul 4, astfel: ACE – extract de ceapă verde; AGE – extract de apio; CE – extract de anghinare; CGE – extract de păducel; CHE – extract de cicoare; RSE – extract de rozmarin.

Rezultatele determinării letalității procentuale (L%) pentru *Daphnia magna* (DM) sunt prezentate în tabelul VII.1.

Tabelul VII.1. Valorile letalității (%) obținute la testul *D. magna*

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSE		ACE		CE		CHE		AGE		CGE	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1000	0	50	0	5	80	100	0	25	10	15	10	35
750	5	40	0	5	55	100	10	20	0	10	5	30
500	5	20	0	5	25	95	0	5	25	35	0	15
250	0	15	0	0	0	5	0	10	0	0	0	20
100	5	10	0	15	0	0	0	0	10	15	0	15
50	0	0	0	10	0	0	0	5	0	0	0	10

DM a prezentat o rezistență mare la rozmarin, cu o mortalitate maximă de 50% observată la 1000 mg/L după 48 de ore. Toxicitatea extractului de ceapă a arătat rezistență pentru DM, cu mortalitate scăzută la toate concentrațiile testate, sugerând că compușii bioactivi din ceapă nu sunt extrem de toxici pentru *Daphnii*. DM a demonstrat o sensibilitate mare la extractul de anghinare, cu mortalitate de 100% la concentrațiile înalte. Aceasta evidențiază potențialul toxic superior al compușilor din anghinare asupra organismelor acvatice. DM a prezentat o rezistență mare la extractul de cicoare, cu un maxim de 25% mortalitate la 1000 mg/L după 48 de ore. Rezultatele extractului de apio pentru DM au fost puțin pronunțate, cu efecte minore asupra mortalității. Sensibilitatea DM la extractul de păducel a fost comparabilă cu alte extracte, cu o mortalitate de până la 35% la 1000 mg/L. Acesta reflectă o susceptibilitate moderată a DM la compușii prezenți în păducel.

Testarea extractelor vegetale pe embrioni de *Daphnia magna* a relevat efecte variate, dependente de tipul extractului și concentrația acestuia. Extractele de rozmarin și apio au accelerat ușor dezvoltarea embrionară, menținând caracteristicile morfologice normale. În contrast, ceapa la 250 μg/mL și cicoarea la aceeași concentrație au provocat întârzieri în dezvoltare și embriotoxicitate, cu modificări specifice ale ochiului compus și antenelor. Anghinarea la 250 μg/mL a demonstrat embriotoxicitate semnificativă, fără modificări morfologice la embrionii supraviețuitori. Concentrațiile mai scăzute, de 100 μg/mL, pentru ceapă, anghinare și cicoare nu au indus modificări. Păducelul a stimulat dezvoltarea, fără a afecta negativ morfologia embrionară [11].

## 8. Evaluări biochimice și histologice

Pe lângă cercetările fitotoxicologice, sunt de asemenea de interes evaluări preclinice, pe animale de laborator. Astfel, sunt necesare teste biochimice specifice pentru a evalua modificările asupra serologiei, induse de expunerea animalelor de laborator la diferiți factori, examene histologice pentru mai multe organe (inimă, testicule, ficat) și determinări biochimice ale capacității antioxidante imprimare de omogenate tisulare (inimă, creier, ficat, rinichi și testicule).

180 de șobolani au fost împărțiți în 18 loturi, a câte 10 subiecți fiecare, astfel: Lot I = martor normal 1 (MN1)\* – hrană normală de laborator, fără tratament – 10 șobolani; Lot II = glucide martor 1 (GM1)\* – hrană hiperglucidică, fără tratament – 10 șobolani; Lot III = lipide martor 1 (LM1)\* – hrană hiperlipidică, fără tratament – 10 șobolani (\* lot sacrificat la jumătatea studiului, după 21 de zile); Lot IV = martor normal 2 (MN2)\*\* – hrană normală de laborator, fără tratament – 10 șobolani; Lot V = glucide martor 2 (GM2)\*\* – hrană hiperglucidică, fără tratament – 10 șobolani; Lot VI = lipide martor 2 (LM2)\*\* – hrană hiperlipidică, fără tratament – 10 șobolani; Lot VII = glucide

anghinare (GAN)\*\* ◇ – hrană hiperglucidică, și tratament cu extract de anghinare 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot VIII = glucide ceapă (GCE)\*\* ◇ – hrană hiperglucidică, și tratament cu extract de ceapă 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot IX = glucide cicoare (GCI)\*\* ◇ – hrană hiperglucidică, și tratament cu extract de cicoare 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot X = glucide păducel (GP)\*\* ◇ – hrană hiperglucidică, și tratament cu extract de păducel 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot XI = glucide rozmarin (GR)\*\* ◇ – hrană hiperglucidică, și tratament cu extract de rozmarin 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot XII = glucide amestec (GA)\*\* ◇ – hrană hiperglucidică, și tratament cu amestec de extracte 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot XIII = lipide anghinare (LAN)\*\* ◇ – hrană hiperlipidică, și tratament cu extract de anghinare 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot XIV = lipide ceapă (LCE)\*\* ◇ – hrană hiperlipidică, și tratament cu extract de ceapă 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot XV = lipide cicoare (LCI)\*\* ◇ – hrană hiperlipidică, și tratament cu extract de cicoare 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot XVI = lipide păducel (LP)\*\* ◇ – hrană hiperlipidică, și tratament cu extract de păducel 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot XVII = lipide rozmarin (LR)\*\* ◇ – hrană hiperlipidică, și tratament cu extract de rozmarin 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani; Lot XVIII = lipide amestec (LA)\*\* ◇ – hrană hiperlipidică, și tratament cu amestec de extracte 2%, 5mL/kg corp/animal – 10 șobolani (\*\* lot sacrificat la finalul studiului, după 42 de zile; ◇ administrarea extractelor s-a făcut începând cu ziua 22, și continuând până la ziua 42).

După colectarea sângelui în urma sacrificării, s-a făcut centrifugarea probelor și s-au realizat determinările pe ser: glicemie, acid uric, homocisteină, trigliceride, colesterol total, HDL-C, LDL-C, calciu, sodiu, potasiu, fier, magneziu, fosfor, cloruri.

Se observă o creștere a glicemiei în cazul lotului GM2 timp de 42 de zile, comparativ cu lotul MN2, care a primit hrană normală de laborator pentru aceeași perioadă de timp. Cea mai mare scădere a glicemiei este înregistrată de lotul GA, prin raportare la lotul GM2. Totuși, toate loturile care au primit extracte vegetale individuale au înregistrat scăderi ale glicemiei. În ceea ce privește acidul uric, acesta a crescut pentru lotul GM2 față de lotul MN2, dar a înregistrat scăderi pentru toate loturile tratate cu extracte, prin comparație cu lotul GM2. Astfel, lotul GA a avut cea mai mare scădere a acidului uric, urmat de GCI, GR și GP [11]. În unele cazuri, apariția diabetului duce la scăderi masive ale homocisteinei pentru GM2 față de MN2. În plus, tratarea cu extracte vegetale generează alte scăderi ale homocisteinei față de GM2, cea mai mare scădere fiind indusă la loturile GR, GCE și GP. Cea mai mică scădere a homocisteinei este indusă la lotul GCI. Creșterea glicemiei la șobolani LM2

este semnificativ mai mică decât la lotul GM2, dar scăderile induse de administrarea extractelor individuale și respectiv amestecului de extracte sunt mai mici. Astfel, LA imprimă cea mai mare scădere, comparativ cu LM2, urmat de LCE, LAN și LR, cele mai mici scăderi fiind generate de LCI și LP. De asemenea, variațiile suferite de acidul uric nu sunt la fel de mari în cazul dietei hiperlipidice, comparativ cu dieta hiperglucidică. Astfel, LM2 înregistrează o creștere foarte mică, față de MN2, iar cea mai mare scădere a acidului uric apare la lotul LA. Și în cazul LM2 apar scăderi ale homocisteinei, dar nu la fel de masive ca în cazul GM2, prin comparație cu MN2. Se observă că în cazul dietei hiperlipidice, introducerea extractelor vegetale generează scăderi mai mari decât cele induse de aceleași extracte în dieta hiperglucidică.

Trigliceridele au crescut pentru GM2, comparativ cu MN2, și au înregistrat scăderi modeste pentru toate loturile cărora li s-au administrat extracte vegetale. Colesterolul total a crescut în cazul GM2 față de MN2, dar a scăzut în cazul loturilor care au fost tratate cu extractele vegetale, în ciuda continuării administrării aceluiași tip de dietă pe tot parcursul experimentului. Nivelul de HDL-colesterol a scăzut la GM2 față de MN2, însă a înregistrat creșteri considerabile în urma administrării extractelor vegetale. Prin comparație, s-a observat creșterea LDL-colesterolului pentru lotul GM2 față de MN2. Totuși administrarea extractelor a condus la scăderi ale valorilor LDL-ului pentru toate loturile tratate cu extracte vegetale, cel mai mult scăzând la lotul GA. Comparativ cu GM2, LM2 a înregistrat creșteri aproape duble în ceea ce privește trigliceridele și colesterolul total, dar și scăderile au fost considerabil mai mari în urma administrării extractelor vegetale. În cazul HDL-colesterolului, LM2 a înregistrat scăderi față de MN2, însă administrarea extractelor a imprimat o creștere masivă a acestuia, cu până la 80%, în cazul lotului LA. LDL-colesterolul a suferit o creștere în cazul LM2, comparativ cu MN2, și a scăzut în cazul lotului LA, urmat de LR și LAN. Scăderi similare au fost imprimate loturilor LP și LCI [11].

Ionii de calciu suferă creșteri atât în cazul GM2, față de MN2, cât și în cazul loturilor tratate cu extracte, față de GM2. Sodiul crește în cazul GM2, față de MN2. Prin comparație cu GM2, acesta scade în toate cazurile tratate cu extracte. Ionii de potasiu suferă scăderi în cazul GM2, comparativ cu MN2, și continuă să scadă în urma administrării extractelor vegetale, cu valori modeste pentru GAN și GCI, urmate de GR și GCE, ca valori medii, respectiv valori mai mari pentru GP și GA. Ionii de calciu nu prezintă nicio variație între MN2 și LM2, însă apar creșteri în toate cazurile de administrare a extractelor vegetale. Sodiul prezintă scăderi în cazul tuturor loturilor de șobolani. Potasiul prezintă creșteri în toate situațiile.

Ionii de fier scad în cazul GM2, comparativ cu MN2, însă folosirea extractelor vegetale face ca valorile pentru celelalte loturi să aibă variații ascendente. Există creșteri ale valorilor magneziului în cazul tuturor loturilor, cele mai mari variații înregistrându-se la loturile GAN și GR. Ca și în cazul loturilor care au primit dietă hiperglucidică, și dieta hiperlipidică imprimă același tip de variație asupra ionilor de fier, în sens descendent pentru LM2 față de MN2, și în sens ascendent pentru toate loturile tratate cu extracte vegetale față de LM2. Magneziul prezintă variații în sens ascendent pentru toate loturile cu dietă hiperlipidică.

Ionii de fosfor prezintă variații neuniforme în cadrul loturilor care au primit hrană hiperglucidică. Astfel, GM2 înregistrează o creștere față de MN2. Lotul GP prezintă o creștere față de GM2, spre deosebire de celelalte extracte care fie imprimă creșteri insesizabile (GAN), fie scad valorile fosforului. Clorurile scad în cazul GM2 față de MN2 și cresc foarte mult în urma administrării extractelor. Fosforul prezintă, ca și în cazul loturilor cu dietă hiperglucidică, variații neuniforme, cu scăderea a LM2 față de MN2, și scăderi în cazul loturilor care au primit extracte. Nivelul clorurilor este scăzut în cazul LM2 față de MN2, dar înregistrează creșteri foarte mari în cazul tuturor loturilor care au fost tratate cu extracte vegetale.

Pentru o evaluare cât mai completă și corectă a efectelor extractelor vegetale asupra organelor și sistemelor, a fost necesară efectuarea unui examen histopatologic. În studiu au fost luate trei organe: ficat, inimă și testicule.

Pe baza scorului de activitate NAS, au fost evaluate secțiuni hepatice din fiecare dintre loturile sacrificate la 42 de zile. Atât cazurile cu regim hiperlipidic, pentru lotul LM2, cât și cele cu regim hiperglucidic, pentru lotul GM2, au prezentat caracteristici histopatologice similare. Steatoza panlobulară difuză a fost observată în >66% din probele examinate (scor NAS = 3). În plus, ambele grupuri au dezvoltat un răspuns inflamator cronic moderat cu aproximativ trei focare/20x (scor NAS = 2). Alte modificări mai puțin frecvent întâlnite au inclus prezența unor corpuri apoptotice frecvente și a unor corpuri Mallory-Denk ocazionale. Cu toate acestea, nu au fost observate fibroză și hepatocite balonizate. Luând în considerare toate aceste caracteristici, în medie, ambele grupuri au obținut 5 puncte din 8 (echivalentul unei boli hepatice severe) la scorul NAS, aceste rezultate fiind în concordanță cu diagnosticul de steatohepatită non-alcoolică (NASH) [11].

O exemplificare a aspectului secțiunilor hepatice și modificărilor morfologice se pot observa în figura 8.1.A-D pentru loturile MN2, GM2, LM2 și LP.

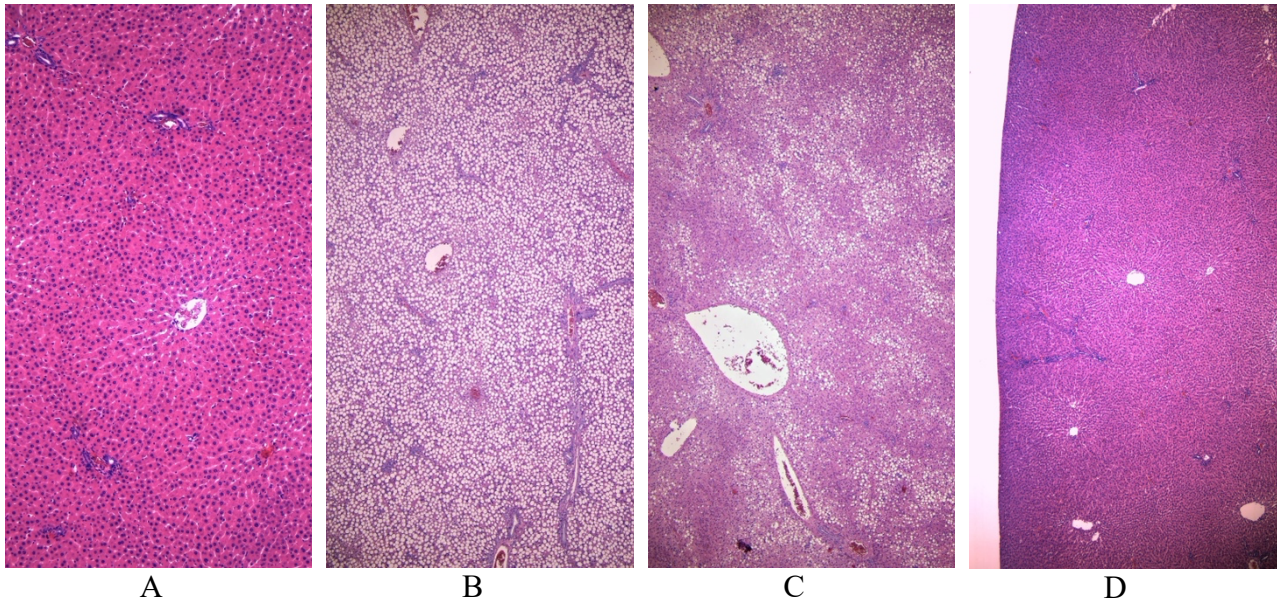


Figura 8.1. Modificări morfologice ale ficatului la loturile:  
 A – MN2 (10x); B – GM2 (4x); C – LM2 (4x); D – LP (4x).

Cito-arhitectura ficatului pentru lotul LP a fost restaurată în totalitate, fiind similară cu aspectul lotului martor normal 2 (MN2) [11].

Capacitatea extractelor vegetale de a influența statusul redox al organelor s-a analizat prin metoda ABTS și prin metoda GSH (evaluarea tiolilor totali). Se va exemplifica rezultatul obținut pentru omogenatele de creier prin cele două metode [12-14].

Conform rezultatelor obținute în urma testului ABTS asupra omogenatelor de creier prelucrate de la șobolanii cu dietă hiperglucidică, densitatea optică cea mai mare, corespunzătoare celui mai slab efect antioxidant, este înregistrată de lotul GCI, urmat de GP, GA, GM2, GR, GAN și MN2, în timp ce efectul antioxidant cel mai bun este înregistrat de lotul GCE. În cazul omogenatelor de creier obținute de la șobolanii care au primit dietă hiperlipidică, capacitatea antioxidantă cea mai redusă a fost asociată lotului LR, urmând lotul LP. Cu activitate antioxidantă similară au fost loturile LA, LAN și LM2, urmate de MN2 și LCI, cea mai mică densitate optică fiind asociată lotului LCE.

În cazul omogenatelor de creier evaluate prin metoda GSH, au fost înregistrate diferențe semnificative din punct de vedere statistic pentru loturile LP, GCI și GR, la  $p < 0.05$ , față de lotul MN2, și pentru lotul LCE, la același nivel de semnificație, față de lotul LM2.

## 9. Prelucrarea amestecului de extracte vegetale în forme farmaceutice solide dozate pentru administrare orală

În scopul obținerii unor forme farmaceutice pentru administrare orală la pacienți adulți, dar și la copii sau persoane cu dificultăți la înghițire, s-a optat pentru prelucrarea amestecului de extracte vegetale cu acțiune hipolipemiantă, sub formă de capsule operculate.

Pentru formularea și prepararea materialului de umplere a capsulelor s-au utilizat materiale de calitate farmaceutică: amestec de extracte vegetale standardizate în principii active, în părți egale: extract de anghinare, ceapă verde, cicoare, păducel și rozmarin; excipienți necesari pentru formularea amestecului de umplere a capsulelor operculate: alcool etilic (agent de aglutinare), poliplasdon XL (dezagregant), stearat de magneziu (lubrifiant), dioxid de siliciu coloidal (glisant) [15]. Formularea materialului de umplere a capsulelor este prezentată în tabelul IX.1.

Tabelul IX.1. Formularea materialului de umplere a capsulelor

<b><i>Componenta activă</i></b>	<b><i>Cantitatea (mg / cps.)</i></b>
Amestec de extracte	450
<b><i>Excipienti</i></b>	
Alcool etilic	q.s.
Poliplasdon XL	8
Stearat de magneziu	4
Dioxid de siliciu coloidal	5
<b><i>Masa totala</i></b>	<b><i>467</i></b>

### CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

#### Concluzii

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au avut drept scop identificarea unor produse vegetale cu potențială asociere în tratamentul hiperlipidemiilor în urma evaluării efectelor terapeutice induse de extractele obținute din acestea pe diferite modele experimentale animale.

- Pe baza datelor din literatura de specialitate s-au selectat surse vegetale (*Cynarae folium*, *Cichorii herba*, *Rosmarini folium*, *Allii cepae folium*, *Apii graveolentis folium* var. *dulcis*, *Crategi* sp.) cu potențială aplicabilitate în diverse combinații în tratamentul adjuvant al hipercolesterolemiilor;
- A fost determinată calitatea materiilor prime vegetale prin evaluarea conținutului de polifenoli totali, acizi fenolcarboxilici și flavone, folosind etanolul de concentrație 50 și respectiv 70% în extracție; s-a concluzionat că pentru la obținerea extractelor vegetale să se folosească etanolul 50% pentru cicoare și anghinare, și etanolul 70% pentru rozmarin, ceapă verde și apio;

- S-au obținut extracte vegetale uscate folosind metoda liofilizării; a fost determinat conținutul de principii active prin metode spectrofotometrice (concentrații considerabil mai mari de polifenoli totali s-au evaluat în extractele de rozmarin, cicoare și păducel, comparativ cu extractele de anghinare, ceapă verde și apio; concentrații considerabil mai mari de acizi fenolcarboxilici în extractele de rozmarin și păducel, comparativ cu extractele de cicoare și anghinare, apio având cea mai redusă cantitate de acid clorogenic; concentrații mai mari de flavone în extractele de păducel și anghinare, comparativ cu extractele de rozmarin, cicoare și ceapă verde, apio având cea mai redusă cantitate de rutozidă) și cromatografice (principalii compuși evaluați în toate probele în ceea ce privește cantitatea lor, pe baza datelor obținute prin analiza UHPLC-MS, sunt: acidul clorogenic, acidul rozmarinic, acidul protocatecuic, acidul cafeic, acidul siringic, dependent de tipul de extract; în ceea ce privește acțiunea antioxidantă, aceasta este în corelare directă cu conținutul în principii active;
- Cercetările de docking molecular au fost efectuate pentru a prezice potențialele mecanisme antiobezitate și hipolipidemice pentru acidul rozmarinic și acidul clorogenic, doi compuși fitochimici evaluați în cantități mari în extractele investigate; noutatea studiului computațional extins este ilustrată de observația că, deși atât acidul clorogenic, cât și acidul rozmarinic sunt produse de esterificare între acidul cafeic și acidul chinic (CGA) sau acidul dihidroxifenil-lactic (RA) și sunt polifenoli înrudiți chimic, cei doi metaboliți au comportamente in silico complet diferite;
- Evaluarea conținutului de minerale este corelat cu acțiunea terapeutică a extractelor vegetale;
- Viabilitatea larvelor speciilor de *Artemia* la concentrațiile testate cuprinse între 500 - 2500 μg/mL este foarte ridicată, între 80-100%, ceea ce demonstrează că extractele nu sunt toxice la concentrații de maxim 2500 μg/mL; evaluarea lizozomală indică o intensă activitate metabolică; extractul de *Allium* a permis creșterea și favorizarea dezvoltării larvare, astfel încât în probele urmărite au ajuns și la stadiul de preadult (în 7 zile); rezultatele obținute pe speciile de *Daphnia*, indică diferențe semnificative între cele două specii folosite în testare în ceea ce privește susceptibilitatea comportamentului lor prin expunere la aceleași extracte (*Daphnia pulex* pare să fie mai sensibilă în general, cu valori LC50 mai scăzute comparativ cu *Daphnia magna* pentru majoritatea extractelor); embriotestul pe embrionii de *Daphnia magna* a relevat efecte variate, dependente de tipul extractului și concentrația acestuia;
- Evaluările biologice în modele experimentale la animalele de laborator, au vizat determinarea tuturor constantelor biochimice care sunt asociate hiperlipidemiilor: cea mai mare scădere a glicemiei a fost pentru lotul cu amestecul de extracte (21 de zile), prin raportare la lotul care a primit doar hrană hiperglucidică, loturile care au primit extracte individuale au înregistrat scăderi ale glicemiei, de



aproximativ 11% pentru extractele de anghinare și ceapă, aproximativ 10% pentru extractele de cicoare și păducel, în timp ce extractul de rozmarin a avut efectul cel mai redus, cu o scădere de 9.96%; lotul care a primit amestecul de extracte a avut cea mai mare scădere a acidului uric, cu 20.20%, urmat de cicoare și rozmarin, care au scăzut valorile cu aproximativ 16%, și păducel cu aproximativ 14%; tratarea cu extracte vegetale generează scăderi și ale homocisteinei față de martorul hiperglucidic, cea mai mare scădere fiind indusă de rozmarin, aproximativ 34%, strâns urmată de ceapă și păducel (32.06%, respectiv 31.45%); amestecul de extracte a scăzut cel mai mult nivelul trigliceridelor, cu 5.25%, urmat de cicoare (4.25%), rozmarin și păducel (aproximativ 3%), în timp ce anghinarea și ceapa au imprimat scăderi aproape insesizabile; amestecul de extracte a imprimat o scădere a colesterolului total cu aproximativ 9%, cicoarea, păducelul și rozmarinul cu aproximativ 7%, urmat de ceapă (6.57%) și anghinare (3.59%); amestecului a condus la creșteri de 77.61% a HDL-colesterolului față de martorul hiperglucidic, rozmarinul, cicoarea și păducelul au imprimat creșteri între 57-60%, iar anghinarea și ceapa au avut creșteri de aproximativ 40%; LDL-colesterolul a scăzut cu 16.41% pentru lotul tratat cu amestec de extracte, cu aproximativ 12% pentru extractele de anghinare și cicoare, și aproximativ 11% pentru păducel și rozmarin; extractele de ceapa și anghinarea imprimă creșteri de 13-14%, urmate de rozmarin și amestec, cu 22-24%, valorile cele mai mari fiind generate de păducel și cicoare (34-35%) pentru variațiile ionului de calciu; asupra ionilor de potasiu, anghinarea generează o scădere de 6.42%, urmată de ceapă, rozmarin și cicoare, cu valori cuprinse între 8 și 9%, în timp ce păducelul și amestecul de extracte imprimă scăderi cuprinse între 11 și 12%; există creșteri ale valorilor magneziului, fierului, ionii de fosfor, în cazul tuturor loturilor;

➤ Examenele histologice pe diferite tipuri de organe sunt în corelație directă cu compoziția chimică a fiecărui tip de extract testat, astfel: în ficatul provenit de la loturile hiperglucidice, tratamentului cu păducel și rozmarin a condus la dispariția completă a steatozei hepatice, cu mențiunea că s-au observat persistența de rare celule inflamatorii izolate; la loturile hiperlipidice, în urma tratamentelor cu păducel și amestec de extracte, cito-arhitectura ficatului a fost restaurată în totalitate, fără a se mai identifica aspecte patologice; tratamentul cu extract de păducel și cel cu amestec de extracte, au produs pentru loturile hiperglucidice, o restabilire totală a histologiei miocardului, fără aspecte patologice; în modelul de hiperlipidemie, în urma tratamentului cu rozmarin, histologia miocardului a fost restituită aproape în întregime, remarcându-se doar foarte rare fibre musculare cu nucleii hiperchromi, polilobați; aspectele microscopice asupra țesutului testicular a arătat o îmbunătățire a acestuia dependent de tipul de extract vegetal administrat; testările efectuate

pe diferitele tiruri de omogenate de organe sunt în corelare directă cu compoziția chimică a extractelor testate;

➤ S-a propus o formulare farmaceutică care conține amestecul de extracte vegetale testat, supusă testărilor farmaco-tehnice specifice domeniului Tehnologiei farmaceutice.

### **Contribuții personale**

➤ Toate obiectivele de cercetare au fost îndeplinite, iar întreaga cercetare este originală, pornind de la selectarea materiilor prime vegetale, determinarea calității acestora, obținerea extractelor vegetale uscate, evaluarea cantitativă, determinarea acțiunii antioxidante, studii de docking molecular, determinarea conținutului de oligoelemente, evaluarea fitotoxicității, cercetări pe modele experimentale la animalele de laborator, evaluări histologice pe diferite tipuri de organe, evaluarea statusului redox pe diferite tipuri de omogenate, propunerea unei formulări farmaceutice.

### **Perspective de cercetare**

- Evaluarea UHPLC și a altor clase de constituenți chimici implicați în răspunsul terapeutic;
- Studii de stabilitate a extractelor vegetale;
- Propunerea și de alte tipuri de formulări farmaceutice;
- Studii de farmacocinetică.

## Bibliografie selectivă

1. **Ilie EI**, Popescu L, Luță EA, Biță A, Corbu AR, Mihai DP, Pogan AC, Balaci TD, Mincă A, Duțu LE, et al. Phytochemical Characterization and Antioxidant Activity Evaluation for Some Plant Extracts in Conjunction with Pharmacological Mechanism Prediction: Insights into Potential Therapeutic Applications in Dyslipidemia and Obesity. *Biomedicines*. 2024; 12(7):1431. doi: 10.3390/biomedicines12071431.
2. Supuran, C.T. Anti-Obesity Carbonic Anhydrase Inhibitors: Challenges and Opportunities. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2022, 37, 2478–2488. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2121393>.
3. Karioti, A.; Carta, F.; Supuran, C. Phenols and Polyphenols as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Molecules* 2016, 21, 1649. <https://doi.org/10.3390/molecules21121649>.
4. Han, J.; Wang, D.; Ye, L.; Li, P.; Hao, W.; Chen, X.; Ma, J.; Wang, B.; Shang, J.; Li, D.; et al. Rosmarinic Acid Protects against Inflammation and Cardiomyocyte Apoptosis during Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Front. Pharmacol.* 2017, 8, 456. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00456>.
5. Aspatwar, A.; Supuran, C.T.; Waheed, A.; Sly, W.S.; Parkkila, S. Mitochondrial Carbonic Anhydrase VA and VB: Properties and Roles in Health and Disease. *J. Physiol.* 2023, 601, 257–274. <https://doi.org/10.1113/JP283579>.
6. Pimpley, V.; Patil, S.; Srinivasan, K.; Desai, N.; Murthy, P.S. The Chemistry of Chlorogenic Acid from Green Coffee and Its Role in Attenuation of Obesity and Diabetes. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2020, 50, 969–978. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1786699>.
7. Ohishi, T.; Fukutomi, R.; Shoji, Y.; Goto, S.; Isemura, M. The Beneficial Effects of Principal Polyphenols from Green Tea, Coffee, Wine, and Curry on Obesity. *Molecules* 2021, 26, 453. <https://doi.org/10.3390/molecules26020453>.
8. Kumar, R.; Sharma, A.; Iqbal, M.S.; Srivastava, J.K. Therapeutic Promises of Chlorogenic Acid with Special Emphasis on Its Anti-Obesity Property. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2020, 13, 7–16. <https://doi.org/10.2174/1874467212666190716145210>.
9. Alam, M.A.; Subhan, N.; Hossain, H.; Hossain, M.; Reza, H.M.; Rahman, M.M.; Ullah, M.O. Hydroxycinnamic Acid Derivatives: A Potential Class of Natural Compounds for the Management of Lipid Metabolism and Obesity. *Nutr. Metab.* 2016, 13, 27. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0080-3>.
10. Silva, J. D. S., Rocha, I. K. B. D. S., Freitas, L. C. D., Pereira, N. J., & Carvalho Neta, R. N. F. (2015). Bioethical principles applied to aquatic ecotoxicological studies. *Revista Bioética*, 23, 409-418.
11. **Ilie (Ioniță) EI**, Olaru OT, Pițuru MT, Pogan AC, Moroșan E, Văleanu A, Corbu AR, Nica AE, Țăpoi DA, Tănăsescu MD, Mincă A, Gîrd CE. In vivo evaluation of the effects induced by hawthorn (*Crataegi* sp.) extract in rats, in two experimental diet models. *Farmacía*. 2024 Apr; 72(2): 305–314. <https://doi.org/10.31925/farmacía.2024.2.9>.
12. Ungurianu, A.; Șeremet, O.; Gagniuc, E.; Olaru, O.T.; Guțu, C.; Grădinaru, D.; Ionescu-Tîrgoviște, C.; Margină, D.; Dănciulescu-Miulescu, R. Preclinical and clinical results regarding the effects of a plant-based antidiabetic formulation versus well established antidiabetic molecules. *Pharmacol Res* 2019, 150. 10.1016/j.phrs.2019.104522.
13. Mihai DP, Ungurianu A, Ciotu CI, Fischer MJM, Olaru OT, Nitulescu GM, Andrei C, Zbarcea CE, Zăfirescu A, Seremet OC, Chirita C, Negres S. Effects of Venlafaxine, Risperidone and Febuxostat on Cuprizone-Induced Demyelination, Behavioral Deficits and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 2;22(13):7183. doi: 10.3390/ijms22137183. PMID: 34281235; PMCID: PMC8268376.
14. Nitulescu G, Mihai DP, Nicorescu IM, Olaru OT, Ungurianu A, Zăfirescu A, Nitulescu GM, Margina D. Discovery of natural naphthoquinones as sortase A inhibitors and potential anti-infective solutions against *Staphylococcus aureus*. *Drug Dev Res.* 2019 Dec;80(8):1136-1145. doi: 10.1002/ddr.21599. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31486108.
15. Lupuleasa Dumitru, Popovici Iuliana, Tehnologie Farmaceutica, vol III, Editura Polirom, Iasi, 2009.