

## CUPRINS

LISTĂ ABREVIERI.....	3
INTRODUCERE .....	4
STADIUL CUNOAȘTERII ASUPRA DIABETULUI ZAHARAT ȘI FITOTERAPIEI ACESTUIA .....	5
1 CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND DIABETUL ZAHARAT .....	5
2 DATE FARMACOGNOSTICE ȘI FARMACOLOGICE CUNOSCUTE DESPRE PRODUSELE VEGETALE STUDIAȚE ÎN TEZĂ .....	5
CONTRIBUȚII PERSONALE .....	6
3 CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A UNOR TINCTURI DIN PRODUSE VEGETALE POTENȚIAL HIPOGLICEMIANTE .....	6
3.1 Obiective .....	6
3.2 Concluzii.....	6
4 CERCETĂRI PRELIMINARE ALE EXTRACTELOR VEGETALE .....	7
4.1 Determinarea toxicității acute și subacute a extractelor vegetale .....	7
4.1.1 Material și metodă.....	7
4.1.2 Rezultate și discuții .....	7
4.2 Stabilirea dozei eficiente pentru tincturile studiate utilizând testul de toleranță la glucoză orală, la șoareci cu funcție pancreatică normală .....	8
4.2.1 Material și metodă.....	8
4.2.2 Rezultate și discuții .....	8
4.3 Testarea efectului hipoglicemiant al extractelor vegetale, utilizând șoareci cu hiperglicemie indusă experimental cu adrenalina.....	9
4.3.1 Material și metodă.....	9
4.3.2 Rezultate și discuții .....	9

5	EVALUAREA EFECTULUI HIPOGLICEMIANȚ, HIPOLIPEMIANȚ ȘI ANTIOXIDANT AL EXTRACTELOR VEGETALE STUDIAȚE, UTILIZÂND ȘOARECI CU DIABET INDUS EXPERIMENTAL CU STREPTOZOTOCINĂ .....	10
5.1	Model experimental de determinare a potențialului hipoglicemiant și hipolipemiant al extractelor vegetale .....	10
5.1.1	Rezultate .....	11
5.2	Testarea potențialului antioxidant <i>in vivo</i> al extractelor vegetale, determinând nivelul activității superoxid dismutazei, glutation peroxidazei, glutation reductazei și nivelul substanțelor reactive cu acidul tiobarbituric .....	13
5.2.1	Rezultate .....	13
5.3	Concluzii .....	13
6	EVALUAREA HISTOPATOLOGICĂ A ȚESUTURILOR BIOLOGICE PRELEVATE DE LA ȘOARECI CU DIABET INDUS, DUPĂ CINCI SĂPTĂMÂNI DE TRATAMENT ..	14
7	DETERMINAREA EFECTULUI ANTIBACTERIAN AL EXTRACTELOR VEGETALE .....	15
7.1	Material și metodă .....	15
7.2	Rezultate și discuții .....	15
	CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE .....	17
	BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ .....	20

## LISTĂ ABREVIERI

ABH	-	<i>Acanthi balcanici herba</i>
ADR	-	adrenalină
APFC	-	acid polifenolcarboxilic
ATP	-	adenozin trifosfat
CAF	-	<i>Cardui acanthoiditis folium</i>
CSS	-	cromatografie pe strat subțire
DPH	-	<i>Dorycnii pentaphylli herba</i>
DZ	-	diabet zaharat
F.R. X	-	farmacopeea a-X-a
FT-IR	-	spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier
GC-MS	-	gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă
GPx	-	glutathionperoxidaza
Gr	-	glutathionreductaza
HBA1C	-	hemoglobină glicozilată
HDL	-	high-density lipoprotein (lipoproteine cu densitate crescută)
HPLC	-	cromatografie lichidă de înaltă performanță
IR	-	infraroșu
LDL	-	low-density lipoprotein (lipoproteine cu densitate mică)
MDA	-	malondialdehida
M-fol.	-	<i>Myrtilli folium</i>
M-fr.	-	<i>Myrtilli fructus</i>
OMS	-	Organizația Mondială a Sănătății
POL	-	peroxizi lipidici
ROS	-	specii reactive ale oxigenului
SOD	-	superoxide dismutaza
STZ	-	streptozotocina
TC	-	colesterol total
TG	-	trigliceride
TPF	-	<i>Tragoponis pratensis folium</i>
TRFF	-	<i>Tamaricis ramosissimae folium et flos</i>
TTGO	-	test de toleranță la glucoză orală
VIS	-	vizibil
VLDL	-	very-low-density lipoprotein (lipoproteine cu densitate foarte mică)

## INTRODUCERE

Diabetul zaharat (DZ) este cea mai frecventă boală metabolică, cu o prevalență și o incidență în continuă expansiune, care duce la invaliditate precoce și la o mortalitate ridicată, ocupând ca frecvență și gravitate locul trei în lume, după afecțiunile cardiovasculare și oncologice [1]. OMS clasifică diabetul zaharat în următoarele categorii principale: tipul 1, tipul 2, alte tipuri de diabet zaharat, produs de cauze multiple și diabetul gestațional. Cele mai des întâlnite forme sunt diabetul zaharat de tip 1 și diabetul zaharat de tip 2. Tratamentul actual al diabetului zaharat se face gradual, în funcție de severitatea afecțiunii: regim igienico-dietetic (dietă echilibrată ce presupune consumul de alimente cu indice glicemic scăzut, activitate sportivă regulată), tratament fitoterapeutic, tratament farmacologic cu antidiabetice orale sau insulină injectabilă [2]. Din cele mai vechi timpuri oamenii au utilizat plantele întregi sau părțile lor vegetale bogate în principii active, proaspete sau prelucrate (sub formă de infuzie, decoct, tinctură, macerat apos) pentru proprietățile lor curative [3]. Numeroase plante prezintă proprietăți terapeutice hipoglicemiante importante, fiind unanim recunoscute și acceptate în terapia curentă a diabetului zaharat. În fitoterapia românească este utilizat în mod tradițional pentru menținerea homeostaziei glucozei afinul (*Vaccinium myrtillus*).

Obiectivul tezei de doctorat este de a stabili dacă extractele vegetale ce provin de la specii vegetale puțin studiate: *Tragopogon pratensis* (barba caprei, barba țapului), *Dorycnium pentaphyllum subsp herbaceum* (sulițică, brâncuța de pisică), *Acanthus balcanicus* (talpa ursului, matrună), *Tamarix ramosissima* (cătina roșie), *Carduus acanthoides* (spin, scai roșu) au proprietăți antidiabetice comparativ cu *Vaccinium myrtillus* (afin).

# STADIUL CUNOAȘTERII ASUPRA DIABETULUI ZAHARAT ȘI FITOTERAPIEI ACESTUIA

## 1 CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND DIABETUL ZAHARAT

Printr-o bibliografie de actualitate, în partea generală a tezei am detaliat subcapitolele legate de diabetul zaharat: definiție, clasificare, prevalență, pancreasul și insulina, patogeneză, cauze și factori de risc, complicații acute și tardive, implicarea stresului oxidativ în apariția complicațiilor microvasculare ale diabetului zaharat, medicamente ce au ca efect advers producerea hiperglicemie și inducerea insulinorezistenței, managementul actual al diabetului zaharat, produse vegetale utilizate tradițional în tratamentul diabetului zaharat și a complicațiilor acestuia

## 2 DATE FARMACOGNOSTICE ȘI FARMACOLOGICE CUNOSCUTE DESPRE PRODUSELE VEGETALE STUDIAȚE ÎN TEZĂ

În literatura de specialitate apar puține informații referitoare la utilizările medicinale ale extractelor vegetale selectate în teză: *Tragoponis pratensis folium* (TPF); *Dorycnii pentaphylli herba* (DPH); *Acanthi balcanici herba* (ABH); *Tamaricis ramosissimae folium et flos* (TRFF); *Cardui acanthoiditis folium* (CAF). Aceste date sunt prezentate împreună cu cele legate de *Vaccinium myrtillus*, o plantă cu o compoziție chimică și efecte farmacologice mai intens studiate.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### 3 CERCETĂRI PRIVIND OBTINEREA ȘI CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A UNOR TINCTURI DIN PRODUSE VEGETALE POTENȚIAL HIPOGLICEMIANTE

#### 3.1 Obiective

-Obținerea tincturilor prin percolare simplă, conform F.R. X și apoi caracterizarea din punct de vedere fizico-chimic (culoare, gust, miros, densitate relativă, indice de refracție, condiții de calitate – conținut în fier, metale grele, reziduu la evaporare, concentrația în alcool).

-Analiza calitativă, prin CSS și prin HPLC, a flavonoidelor (hiperozida, rutozida, isoquercitrozida, apigenol-7-glucozida, quercetol, luteol, kaempferol, apigenol) și acizilor polifenol-carboxilici (acid cafeic, acid clorogenic, acid rozmarinic);

-Analiza calitativă, prin GC-MS, a compușilor volatili din tincturi (etil-metil-carbonat, esterul etilic al acidului etanimidic, 2-propen-1-ol-acetat, 3-metoxi-3-metil-2-butanona, 1-butanol-3-metil-benzoat etc.)

-Analiza cantitativă spectrofotometrică, în VIZ, a compușilor fenilpropanici;

-Analiza capacității antioxidante a tincturilor, prin determinarea totalului polifenolic și a totalului flavonoidic;

-Caracterizarea calitativă a tincturilor din punctul de vedere al maximelor de absorbție în VIZ și al vibrațiilor specifice în IR.

#### 3.2 Concluzii

Tincturile obținute conțin cantități apreciabile de polifenoli, cel mai mare conținut avându-l tinctura TRFF urmată de tinctura M-fr și de tinctura ABH. Din punctul de vedere al conținutului flavonoidic, cele mai bogate sunt tincturile M-fr și M-fol, urmate de TPF. Analiza prin CSS și HPLC confirmă prezența flavonozidelor și a acizilor polifenolcarboxilici în tincturile studiate.

În urma analizei GC-MS am observat că în tinctura CAF a fost identificat numărul cel mai mare de compuși volatili, comparativ cu celelalte tincturi analizate.

Analiza spectrelor în VIZ ale tincturilor evidențiază prezența maximului de absorbție pentru clorofila a (640–670 nm) și a două maxime de absorbție la  $\lambda$  530–540 nm și 600–610 nm, datorate probabil flavonoidelor.

Vibrațiile din spectrele FT-IR ale tincturilor sunt atribuite compușilor de tip polifenoli (flavonoide, acizi polifenolcarboxilici), carotenoide ( $\beta$ -caroten, esteri carotenoidici), trigliceride, fitosteroli, aminoacizi.

Prin conținutul de flavonoide și de acizi polifenolcarboxilici, care conferă produselor vegetale proprietăți hipoglicemiante și antioxidante, tincturile studiate ar putea fi recomandate ca surse de polifenoli naturali cu rol adjuvant în profilaxia și tratamentul unor boli, cauzate de prezența în organism a speciilor reactive ale oxigenului, precum diabetul zaharat.

## **4 CERCETĂRI PRELIMINARE ALE EXTRACTELOR VEGETALE**

### **4.1 Determinarea toxicității acute și subacute a extractelor vegetale**

#### **4.1.1 Material și metodă**

În cadrul testării toxicității acute și subacute am realizat loturi experimentale a câte 4 șoareci, masculi și femele, cărora le-am administrat prin gavaj o doză unică din tincturile studiate (1, 2, 3, 4, 5 g/kg), respectiv 400 mg/kg timp de 2 săptămâni. Am avut și un lot martor, care a primit prin gavaj ser fiziologic. După administrarea extractelor, animalele sunt analizate permanent timp de 24 ore, urmărindu-se toxicitatea și letalitatea.

#### **4.1.2 Rezultate și discuții**

Am observat lipsa toxicității pentru tincturile ABH, DPH, TPF, TRFF, M-fr. Tinctura CAF prezintă toxicitate,  $DL_{50}$  fiind 4g/kg, administrarea acesteia în doză de 5g/kg a produs moartea tuturor animalelor prin convulsii, la intervale de timp variind între 30 min și o oră. În cadrul testării toxicității subacute, extractele vegetale nu au avut efect letal în doză de 400 mg/zi, iar comportamentul animalelor a fost normal. Nu s-au produs modificări de greutate.

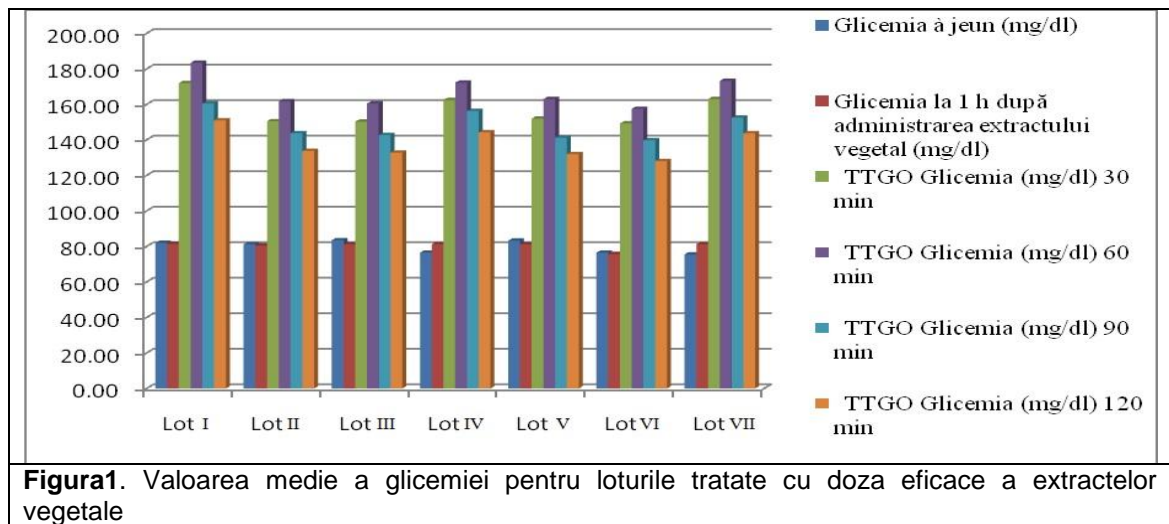
## 4.2 Stabilirea dozei eficiente pentru tincturile studiate utilizând testul de toleranță la glucoză orală, la șoareci cu funcție pancreatică normală

### 4.2.1 Material și metodă

Experimentul a fost efectuat pe VII loturi, a câte nouă șoareci, loturile II-VII fiind împărțite fiecare în trei subgrupuri. Pretratamentul administrat prin gavaj șoarecilor a fost următorul: lotul I - mator, apă distilată; lotul II - tinctura DPH; lotul III - tinctura TRFF; lotul IV - tinctura TPF; lotul V - tinctura CAF; lotul VI - tinctura ABH și lotul VII - martor, tinctura M-fr. Fiecare subgrup de șoareci din fiecare lot a primit prin gavaj același extract vegetal, dar în doză crescândă (100mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg), dizolvat în 0,3 ml apă distilată.

Tincturile au fost administrate șoarecilor cu 30 de minute înaintea administrării prin gavaj a glucozei (2g/kg). În cadrul TTGO am determinat glicemia la 30, 60, 90, 120 de minute. Testul s-a desfășurat pe parcursul unei singure zi.

### 4.2.2 Rezultate și discuții



În urma experimentului am observat că doza eficientă terapeutică este de 200 mg/kg pentru tinctura DPH și 150 mg/kg pentru tincturile TRFF, TPF, CAF, ABH și M-fr.

În cadrul TTGO toate extractele vegetale au evidențiat capacitate antihiperglicemiantă, glicemia loturilor tratate cu acestea fiind mai redusă, comparativ



cu lotul I. Tinctura ABH 150 mg/kg, prezintă cel mai puternic efect antihiperglicemiant, observat la toate intervalele de timp din cadrul testului de toleranță la glucoză orală.

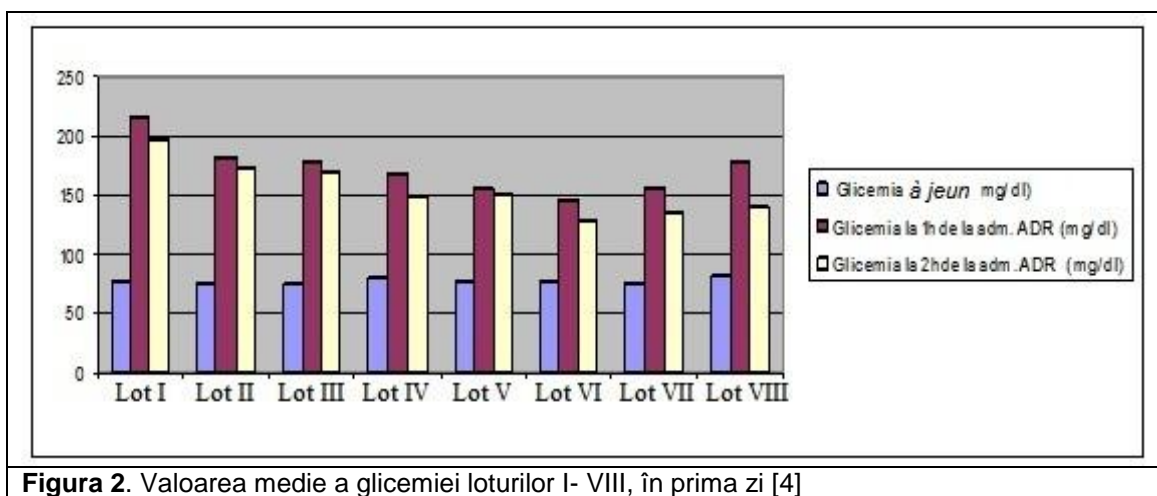
### 4.3 Testarea efectului hipoglicemiant al extractelor vegetale, utilizând șoareci cu hiperglicemie indusă experimental cu adrenalină

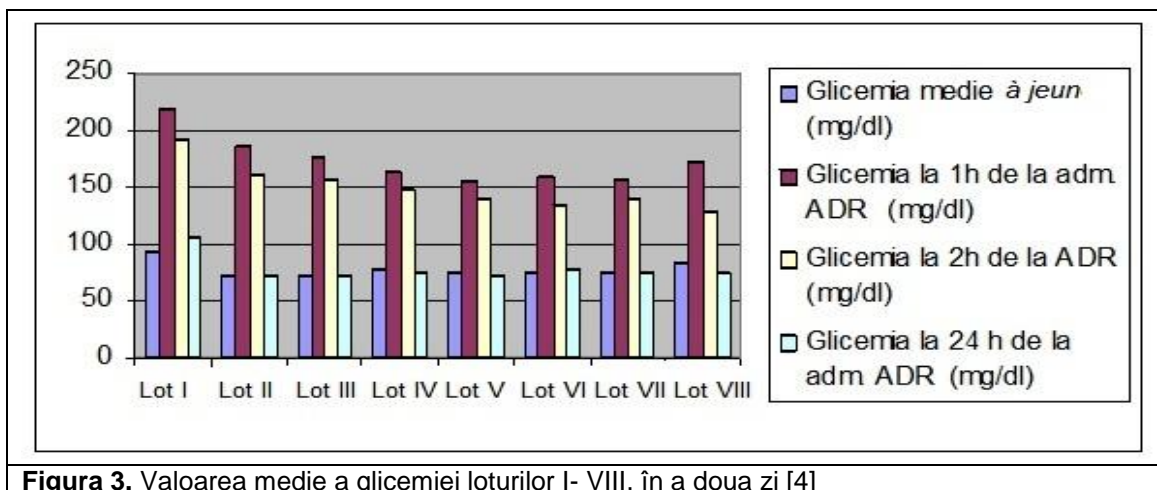
#### 4.3.1 Material și metodă

Hiperglicemia a fost provocată utilizând 0,01 ml soluție de adrenalină 1‰ (ADR), prin administrare subcutanată. Testarea animalelor a fost realizată pe parcursul a două zile, loturile primind aceeași medicație, în aceleași doze.

Pretratamentul administrat prin gavaj șoarecilor cu o oră înainte inducerii hiperglicemiei a fost următorul: lotul I – martor apă distilată; loturile II și III tinctura M-fol și respectiv M-fr; lotul IV – tinctura TPF; lotul V – tinctura DPH; lot VI – tinctura ABH; lotul VII – tinctura TRFF; lotul VIII – tinctura CAF. Administrarea adrenalinei s-a făcut și la 24 ore, după pretratament cu aceleași doze de tincturi. Am determinat glicemia la o oră și la două ore după administrarea adrenalinei în prima și a doua zi.

#### 4.3.2 Rezultate și discuții





**Figura 3.** Valoarea medie a glicemiei loturilor I- VIII, în a doua zi [4]

Tinctura M- fol și M-fr scade semnificativ valorile glicemiei la șoarecii cu hiperglicemie indusă cu adrenalină, în comparație cu lotul I, căruia i-am administrat doar adrenalină.

Produsele vegetale studiate au scăzut semnificativ valorile hiperglicemiei provocate, fiind mai eficiente decât extractele M- fol și M-fr, tinctura ABH având cea mai înaltă eficacitate hipoglicemiantă.

## 5 EVALUAREA EFECTULUI HIPOGLICEMIANȚ, HIPOLIPEMIANT ȘI ANTIOXIDANT AL EXTRACTELOR VEGETALE STUDIATE, UTILIZÂND ȘOARECI CU DIABET INDUS EXPERIMENTAL CU STREPTOZOTOCINĂ

### 5.1 Model experimental de determinare a potențialului hipoglicemiant și hipolipemiant al extractelor vegetale

Pentru inducerea diabetului zaharat experimental s-a injectat i.p streptozotocină în doză unică de 180 mg/kg, animalele cu valori ale glicemiei à jeun peste 300 mg/dl, confirmate prin două determinări au fost considerate diabetice [5].

Am realizat VIII loturi, a câte 5 animale, fiind tratate zilnic, diferit pe parcursul celor cinci săptămâni de testare: lotul I - martor sănătos, netratat; lotul II – martor diabetic netratat; lotul III – tinctura TPF; lotul IV – tinctura DPH; lotul V – tinctura TRFF; lotul VI – tinctura CAF; lotul VII – tinctura ABH; lotul VIII - tinctura M-fr.

Animalele au fost monitorizate pe parcursul a cinci săptămâni, parametrii urmăriți fiind ingestia de apă, hrană, greutatea corporală, nivelul glucozei, nivelul colesterolului și trigliceridelor plasmatic. La intervale de șapte zile, la aceeași oră, animalele au fost monitorizate după un post alimentar de 12 ore, determinându-se glicemia și colesterolul, iar trigliceridele plasmatic la începutul studiului și după 5 săptămâni.

După cinci săptămâni de testare, animalele au fost sacrificate, au fost recoltate probe de sânge în tuburi heparinizate, fiind prelucrate pentru separarea plasmei și hemoliza eritrocitelor. Investigațiile biochimice efectuate s-au adresat determinării nivelului peroxidilor lipidici și activității superoxid dismutazei (SOD), glutacion peroxidazei (GPX) și glutacion reductazei (GR) [6].

### 5.1.1 Rezultate

Nr. lot	Apă consumată M ± SD (ml/zi)	Hrană consumată M ± SD (g/zi)
Lot I	10,2 ± 3,65	4,3 ± 0,59
Lot II	33,5 ± 10,28	9,3 ± 1,8
Lot III	24,3 ± 4,75	7,7 ± 1,3
Lot IV	20,1 ± 2,60	5,7 ± 0,9
Lot V	17,9 ± 5,15	4,9 ± 1,1
Lot VI	18,4 ± 6,6	6,5 ± 1,38
Lot VII	15,5 ± 3,5	4,8 ± 0,41
Lot VIII	19,2 ± 4,4	5,2 ± 0,88

**Tabelul 1.** Valoarea medie a consumului de apă și hrană pentru loturile I-VIII, pe parcursul experimentului

Nr. lot	Greutate (g) inițială	Greutate (g) prima săpt.	Greutate (g) săpt. 2	Greutate (g) săpt. 3	Greutate (g) săpt. 4	Greutate (g) săpt. 5
Lot I	37 ± 2,34	37,2 ± 2,16	37,2 ± 1,92	38 ± 2,23	39 ± 2,23	39,4 ± 1,51
Lot II	35 ± 2,91	34 ± 2,34	33 ± 1,87	32,6 ± 1,14	30,4 ± 1,14	28,6 ± 1,67
Lot III	34,6 ± 1,14	33,8 ± 2,28	33,4 ± 2,70	34,2 ± 2,38	35,2 ± 2,38	36 ± 1,73
Lot IV	38 ± 2,54	39 ± 2,73	38,6 ± 2,07	39,4 ± 2,40	38,8 ± 2,28	40 ± 2,00
Lot V	37,4 ± 4,50	37,2 ± 3,70	37,4 ± 2,70	38,2 ± 1,48	39 ± 1,22	40,2 ± 0,83
Lot VI	36,4 ± 3,64	35 ± 3,80	34,6 ± 3,43	36 ± 3,74	36,4 ± 3,64	37 ± 4,30
Lot VII	34,8 ± 2,16	36,2 ± 2,16	35,8 ± 1,30	37,8 ± 2,38	38,8 ± 2,16	40,4 ± 1,51
Lot VIII	34,8 ± 3,03	34,4 ± 2,07	34,6 ± 2,70	33,8 ± 1,92	34,6 ± 2,07	35,4 ± 1,81

**Tabelul 2.** Valoarea medie a greutății corporale pentru loturile I-VIII, pe parcursul experimentului

Loturi	Glicemia inițială, M ± SD (mg/dl)	Glicemia prima săpt, M ± SD (mg/dl)	Glicemia săpt. 2, M ± SD (mg/dl)	Glicemia săpt, 3, M ± SD (mg/dl)	Glicemia săpt, 4, M ± SD (mg/dl)	Glicemia săpt. 5, M ± SD (mg/dl)
Lot I	87,9 ± 3,19	91,4 ± 3,50	90,2 ± 2,58	91,6 ± 2,07	91 ± 2,34	88,8 ± 1,92
Lot II	309,8 ± 4,65	323,2 ± 7,56	315,8 ± 5,26	329,4 ± 5,12	329,2 ± 1,64	329,6 ± 2,88
Lot III	312,6 ± 2,30	304,4 ± 4,72	260,2 ± 2,58	207,4 ± 2,70	159,4 ± 2,96	120 ± 3,16
Lot IV	308,8 ± 8,28	282,8 ± 3,56	239,8 ± 3,03	191,8 ± 4,49	133 ± 2,91	107,2 ± 8,49
Lot V	313 ± 2,91	281,6 ± 4,21	237,6 ± 3,84	187,6 ± 3,04	130,8 ± 1,92	109,4 ± 3,20
Lot VI	309,4 ± 3,07	286 ± 4,84	252,4 ± 2,40	191,4 ± 3,64	135,2 ± 2,58	116,4 ± 2,07
Lot VII	316,2 ± 2,77	275,2 ± 4,14	223,8 ± 3,70	174,2 ± 2,77	115,8 ± 3,27	96,6 ± 8,29
Lot VIII	311,8 ± 3,03	303,6 ± 2,07	263,8 ± 4,14	213,8 ± 2,86	163,6 ± 6,26	159,8 ± 3,49

**Tabelul 3.** Valorile nivelului glucozei serice la loturile luate în studiu, pe parcursul experimentului, M = media; SD = deviația standard; [7]

Nr. lot	Colest. inițial, M ± SD (mg/dl)	Colest. prima săpt, M ± SD (mg/dl)	Colest. săpt 2, M ± SD, (mg/dl)	Colest. săpt. 3, M ± SD, (mg/dl)	Colest. săpt, 4, M ± SD (mg/dl)	Colest. săpt, 5, M ± SD (mg/dl)
Lot I	75,6 ± 2,40	75,4 ± 2,70	83,4 ± 2,70	77,2 ± 2,38	77,4 ± 1,51	79,2 ± 2,58
Lot II	174 ± 2,73	174 ± 5,38	172,2 ± 4,76	174,4 ± 3,91	173,6 ± 2,30	174,2 ± 1,48
Lot III	174 ± 4,84	186,6 ± 3,43	177 ± 2,91	165,8 ± 2,58	155,8 ± 3,96	136,2 ± 3,96
Lot IV	169,4 ± 4,72	172,4 ± 5,31	168,2 ± 5,01	166,4 ± 5,59	160,2 ± 4,43	153,8 ± 4,20
Lot V	175,2 ± 2,94	172,8 ± 3,70	170,8 ± 3,56	168,4 ± 2,60	168,4 ± 3,84	162 ± 4,52
Lot VI	174,4 ± 1,14	188,2 ± 3,56	192,2 ± 2,28	189,4 ± 2,88	179,8 ± 1,92	166,4 ± 3,20
Lot VII	163,2 ± 2,38	157,8 ± 2,48	152 ± 4,30	133,2 ± 3,49	118,4 ± 3,50	101,6 ± 3,84
Lot VIII	172 ± 4,18	172 ± 2,23	170 ± 3,93	169,8 ± 1,48	166,4 ± 1,14	159,8 ± 3,49

**Tabelul 4.** Valorile nivelului colesterolului total seric la loturile luate în studiu, pe parcursul experimentului, M = media; SD = deviația standard; [7]

Nr. lot	Trigliceride inițiale, M ± SD (mg/dl)	Trigliceride săpt. 5, M ± SD (mg/dl)
Lot I	108,2 ± 3,42	107,8 ± 2,38
Lot II	207,2 ± 3,70	208,4 ± 2,19
Lot III	210,6 ± 3,84	165,4 ± 3,64
Lot IV	209,6 ± 3,91	133,4 ± 3,84
Lot V	204,8 ± 3,49	127,4 ± 2,30
Lot VI	201,2 ± 3,11	134,4 ± 3,84
Lot VII	207,2 ± 1,78	105,8 ± 2,94
Lot VIII	203,8 ± 3,83	153,6 ± 3,20

**Tabelul 5.** Valorile nivelului trigliceridelor serice la loturile luate în studiu, pe parcursul experimentului, M = media; SD = deviația standard; [7]

## 5.2 Testarea potențialului antioxidant *in vivo* al extractelor vegetale, determinând nivelul activității superoxid dismutazei, glutation peroxidazei, glutation reductazei și nivelul substanțelor reactive cu acidul tiobarbituric

### 5.2.1 Rezultate

Nr. lot	GR (U/l sânge total), M ± SD	GPx (U/l hemolizat), M ± SD	SOD (U/ml hemolizat) M ± SD	POL( mmoli/l), M ± SD
Lot I	60,25 ± 1,91	4251,5 ± 28,99	203,8 ± 1,84	0,5350 ± 0,06
Lot II	46,3 ± 2,12	3415,5 ± 98,29	191,7 ± 10,75	2,6937 ± 0,007
Lot III	60,3 ± 8,63	5652 ± 1370,37	243,6 ± 1,13	1,1808 ± 0,16
Lot IV	61,4 ± 2,26	6269 ± 207,89	220,3 ± 0	0,9594 ± 0,014
Lot V	89,6 ± 0	7124 ± 246,07	227,65 ± 10,39	0,3690 ± 0,014
Lot VI	57,7 ± 0,14	6580,5 ± 672,46	212,45 ± 5,30	0,7749 ± 0,007
Lot VII	59,3 ± 0,70	5755,5 ± 236,88	195,1 ± 2,27	0,3321 ± 0,007
Lot VIII	52,5 ± 0,70	4 301 ± 11,31	194,15 ± 3,18	0,5904 ± 0,028

**Tabelul 6.** Valorile nivelului enzimelor antioxidante și a peroxizilor lipidici la loturile luate în studiu la finalul experimentului, M = media; SD = deviația standard; [8]

### 5.3 Concluzii

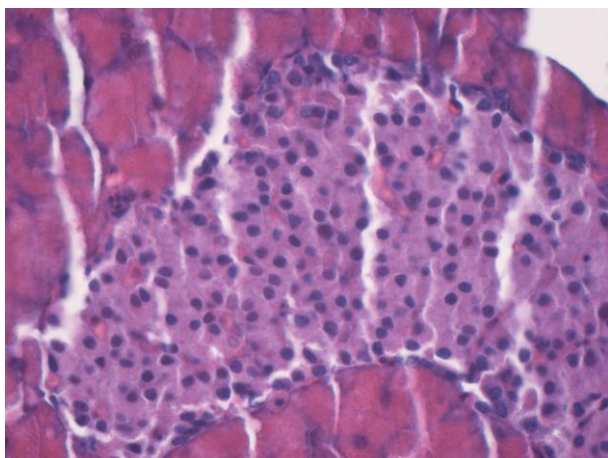
1. Administrarea extractelor vegetale la animale diabetice a avut efecte pozitive asupra consumului de apă și hrană, influențând în mod favorabil și greutatea corporală.
2. Produsele vegetale testate au demonstrat un important potențial hipoglicemiant în diabetul streptozotocinic, specia *Acanthus balcanicus* având cel mai puternic efect terapeutic.
3. În cazul șoarecilor diabetici tincturile ABH și TPF au exercitat un puternic efect hipocolesterolemiant, iar extractele vegetale provenite de la speciile DPH, TRFF, CAF, ABH au provocat o scădere semnificativă a nivelului trigliceridelor plasmatică, comparativ cu loturile martor. Tinctura ABH, spre deosebire de M-fr, are efecte favorabile și în reglarea metabolismului lipidic la animalele cu diabet indus cu streptozotocină.
4. Tinctura TRFF a demonstrat un puternic efect antioxidant, lotul V, tratat cu aceasta, prezentând cele mai ridicate valori ale activității enzimatică pentru glutation reductază și glutation peroxidază. Nivelul superoxid dismutazei cel mai ridicat s-a obținut în cazul

lotului tratat cu tinctura TPF. Nivelul plasmatic al peroxizilor lipidici a fost cel mai scăzut la șoarecii diabetici tratați cu tinctura ABH.

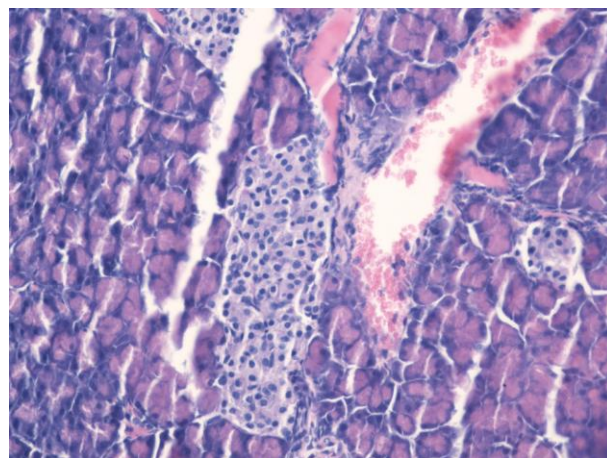
## 6 EVALUAREA HISTOPATOLOGICĂ A ȚESUTURILOR BIOLOGICE PRELEVATE DE LA ȘOARECI CU DIABET INDUS, DUPĂ CINCI SĂPTĂMÂNI DE TRATAMENT

La sfârșitul experimentului pe șoarecii diabetici, după sacrificarea animalelor, am realizat analiza histologică a țesuturilor de interes, de la fiecare lot prelevând probe din pancreas, creier, rinichi, și ficat.

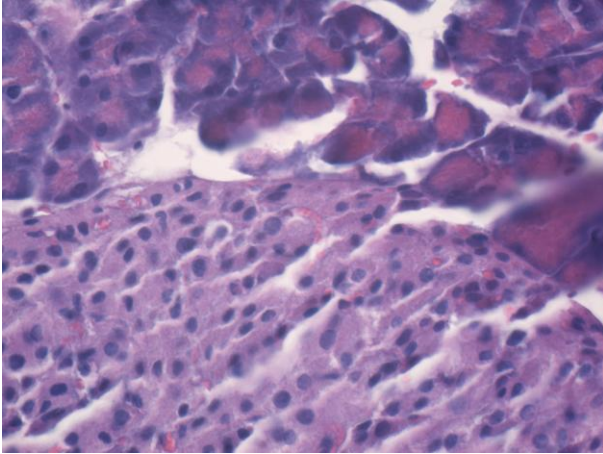
Observațiile microscopice au scos în evidență anormalități structurale ale pancreasului la șoarecii diabetici, comparativ cu șoarecii normali. Pancreasul animalelor din lotul VIII, tratate cu M-fr are structură parțial conservată, leziunile fiind mai reduse comparativ cu lotul II. Pancreasul animalelor tratate cu tinctura ABH prezintă citoarhitectonie nemodificată. Toate extractele vegetale testate au dovedit eficacitate terapeutică, limitând efectele distructive ale streptozotocinei [9], [10].



**Imaginea 1.** Lotul I (lot martor, sănătos) - pancreas endocrin structură normală, ×400



**Imaginea 2.** Lotul II (martor diabetic, netratat) – insule Langerhans; leziuni necrotice de natură hemoragică, disociante acinar, ×200



**Imaginea 3.** Lotul VII, tratat cu tinctura *Acanthi balcanici herba* – histoarhitectonie acino-insulară fără modificări, ×400

## 7 DETERMINAREA EFECTULUI ANTIBACTERIAN AL EXTRACTELOR VEGETALE

### 7.1 Material și metodă

În vederea testării efectelor antibacteriene pentru cele șase tincturi de analizat a fost utilizată metoda difuzimetrică cu discuri pe agar nutritiv (*Kirby-Bauer*), în acord cu prevederile F.R. X.

Testarea efectului antibacterian al tincturilor s-a efectuat luând ca referință efectul antibacterian recunoscut al antibioticelor de elecție (martor +) asupra tulpinilor de referință. Martorul pozitiv a fost ales în funcție de sensibilitatea specie bacteriene: amoxicilina + acid clavulanic 20 μg - (*Staphylococcus aureus*); levofloxacină 5 μg - (*Escherichia coli*); amikacina 30 μg - (*Proteus vulgaris*); ceftazidimă 30 μg - (*Pseudomonas aeruginosa*); cefotaximă 30 μg - (*Klebsiella pneumoniae*).

Totodată, am urmărit efectele sinergice/antagonice apărute între extractele vegetale de testat și antibioticul utilizat de elecție (martor +), cu efect antibacterian cunoscut asupra specie bacteriene testate.

### 7.2 Rezultate și discuții

Proprietățile antibacteriene ale produselor vegetale au variat semnificativ, depinzând predominant de specia vegetală, dar și de specia bacteriană. Tincturile ABH și DPH nu au dovedit activitate antibacteriană asupra nici unui microorganism testat. De

asemenea tincturile ABH și DPH anulează efectul antibacterian al antibioticului standard (amoxicilină + acid clavulanic, levofloxaină, amikacină), atunci când sunt asociate cu acestea. Testarea noastră a demonstrat că tincturile TPF și M-fr prezintă un efect antimicrobian asupra unui spectru larg de microorganisme.



## CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

1. Diabetul zaharat reprezintă o afecțiune cu etiologie heterogenă, caracterizată prin hiperglicemie cronică și alte tulburări metabolice, care se datorează deficienței de insulină, insulinorezistenței sau ambelor fenomene.
2. Diabetul poate fi ameliorat cu ajutorul unor extracte din plante care conțin principii active hipoglicemiante. Produsele vegetale pot fi folosite separat sau în amestecuri.
3. Produsele vegetale utilizate pentru menținerea homeostaziei glucozei conțin principii active hipoglicemiante reprezentate de: acizii polifenolcarboxilici, antocianozide, carotenoide, uleiuri volatile, triterpene, tioheterozide, taninuri, steroli, saponozide triterpenice, proantocianidoli, principii amare, flavonoide, cumarine.
4. Prin cercetarea „*in vitro*” și farmacognozică am obținut și caracterizat fizico-chimic tincturi cu proprietăți posibil hipoglicemiante, ale speciilor vegetale: *Tragopogon pratensis*, *Dorycnium pentaphyllum subsp herbaceum*, *Acanthus balcanicus*, *Tamarix ramosissima*, *Carduus acanthoides*, comparativ cu *Vaccinium myrtillus* (plantă cunoscută ca hipoglicemiantă), pentru a continua studiul „*in vivo*” în vederea utilizării lor ca produse medicinale.
5. Prin conținutul de flavonoide și de acizi polifenolcarboxilici, care conferă produselor vegetale proprietăți hipoglicemiante și antioxidante, tincturile obținute ar putea fi recomandate ca surse de polifenoli naturali cu rol adjuvant în profilaxia și tratamentul unor boli, ca diabetul zaharat, în patogenia cărui sunt implicate și speciile reactive ale oxigenului.
6. Studiul toxicității acute a extractelor de testat a relevat lipsa toxicității pentru tincturile *Acanthi balcanici herba*, *Dorycnii pentaphylli herba*, *Tragoponis pratensis folium*, *Tamaricis ramosissimae folium et flos*, *Myrtilli fructus*, chiar la administrarea prin gavaj a dozei de 5g/kg și toxicitatea tincturii *Cardui acanthoiditis folium*, la doza de 4g/kg.
7. În urma efectuării testului de toleranță la glucoză orală, am stabilit pentru tincturile luate în studiu concentrația optimă la care apare cel mai puternic efect hipoglicemiant, respectiv 200 mg/kg pentru tinctura *Dorycnii pentaphylli herba* și 150 mg/kg pentru tincturile *Tamaricis ramosissimae folium et flos*, *Tragoponis pratensis folium*, *Cardui acanthoiditis folium*, *Acanthi balcanici herba* și *Vaccinium myrtillus*.

8. Tinctura *Acanthi balcanici herba* 150 mg/kg, prezintă cel mai puternic efect antihiperglicemiant, comparativ cu celelalte extracte testate, observat la toate intervalele de timp din cadrul testului de toleranță la glucoză orală (30, 60, 90, 120 minute).
9. După inducerea hiperglicemiei prin injectarea adrenalinei, produsele vegetale studiate au scăzut semnificativ valorile hiperglicemiei provocate, fiind mai eficiente decât extractele *Myrtilli folium* și *Myrtilli fructus*, tinctura provenită de la specia *Acanthus balcanicus* având cea mai înaltă eficacitate hipoglicemiantă.
10. Extractele vegetale aparținând speciilor *Acanthus balcanicus* și *Tragopogon pratensis* au exercitat un puternic efect hipocolesterolemiant, iar extractele vegetale provenite de la speciile *Dorycnium herbaceum*, *Tamarix ramosissima*, *Carduus acanthoides*, *Acanthus balcanicus* au provocat o scădere semnificativă a nivelului trigliceridelor plasmatic, comparativ cu loturile martor.
11. Preparatul farmaceutic din *Acanthus balcanicus* spre deosebire de cel din *Vaccinium myrtillus* (cunoscut ca hipoglicemiant), are efecte favorabile și în reglarea metabolismului lipidic la animalele cu diabet indus cu streptozotocină.
12. Administrarea extractelor vegetale la animale diabetice a avut efecte pozitive asupra consumului de apă și hrană, influențând în mod favorabil și greutatea corporală.
13. În urma studiului putem observa la lotul de șoareci cu diabet netratat că nivelul crescut al glucozei, menținut timp îndelungat induce stres oxidativ, ce se reflectă prin concentrația crescută de malondialdehidă și valori scăzute ale enzimelor antioxidante.
14. *Tamarix ramosissima* a demonstrat în urma experimentului un puternic efect antioxidant, la șoarecii cu diabet streptozotocinic tratat cu aceasta, prezentând cele mai ridicate valori ale activității enzimatică pentru glutathion reductază și glutathion peroxidază.
15. Nivelul superoxid dismutazei cel mai ridicat s-a obținut în cazul lotului de șoareci diabetici tratat cu extract vegetal provenit de la specia *Tragopogon pratensis*.
16. Nivelul plasmatic al peroxizilor lipidici a fost cel mai scăzut la șoarecii diabetici tratați cu extract provenit de la specia *Acanthus balcanicus*.
17. Extractele vegetale au demonstrat efecte antioxidante importante, limitând efectele stresului oxidativ din diabetul zaharat.
18. Observațiile microscopice au scos în evidență anormalități structurale ale pancreasului la șoarecii diabetici, comparativ cu șoarecii normali. Insulele Langerhans au

aspect neregulat în formă și dimensiune, iar la șoarecii diabetici a fost observată amiloidoza insulelor.

19. La loturile cu diabet streptozotocinic tratat cu tincturile luate în studiu s-a observat o ameliorare a aspectului histologic al insulelor Langerhans din pancreas, mai ales în cazul extractului vegetal provenit de la specia *Acanthus balcanicus*, de unde reiese potențialul regenerativ tisular pancreatic al tincturii.

20. Structură histologică normală la nivelul encefalului este întâlnită la lotul de șoareci diabetici tratați cu extract alcoolic provenit de la specia *Acanthus balcanicus*.

21. Ameliorări ale aspectelor histologice s-au remarcat la nivelul ficatului și mai puțin la nivelul rinichiului, cu o citoarhitectonică mai puțin degradată de efectele streptozotocinei.

22. Citoarhitectonică hepatică puțin modificată apare la lotul de șoareci diabetici tratați cu extract vegetal provenit de la specia *Acanthus balcanicus*, observându-se la acest nivel hepatocite binucleate, markeri ai proceselor de regenerare.

23. Tincturile *Acanthi balcanici herba* și *Dorycnii pentaphylli herba* nu au dovedit activitate antibacteriană asupra nici unui microorganism testat.

24. De asemenea tincturile *Acanthi balcanici herba* și *Dorycnii pentaphylli herba* anulează efectul antibacterian al antibioticului standard (amoxicilină + acid clavulanic, levofloxacină, amikacină), atunci când sunt asociate cu acestea.

25. Zone de inhibiție mai mari au fost înregistrate pentru extractele studiate în cazul testării contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*.

26. Realizarea antibiogramei a demonstrat că tincturile *Tragoponis pratensis folium* și *Myrtilli fructus* prezintă efect antimicrobian asupra unui spectru larg de microorganisme (gram pozitive și negative).

27. Tinctura *Acanthi balcanici herba* a dovedit a avea efectele terapeutice cele mai puternice în diabetul streptozotocinic la șoarece, influențând favorabil metabolismul glucidic, lipidic și stresul oxidativ. Datele biochimice au fost în concordanță cu ameliorarea histologică relevată la nivelul pancreasului endocrin, ficatului, creierului și mai puțin la nivelul rinichiului.

28. Cercetarea de față impune aprofundarea studiului legat de acțiunea tincturii provenită de la specia *Acanthus balcanicus* în vederea brevetării produsului medicinal.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- 
- <sup>1</sup> World health Organization, The top 10 causes of death, 2014.
  - <sup>2</sup> Handelsman Z., Mechanick J.I., Blonde L., *et al.* American Association of clinical endocrinologists Guidelines, 14(2), 2011.
  - <sup>3</sup> Habanova M., Haban M., Kobidova R *et al.* Analysis of biologically actives substances in *Vaccinium myrtillus* in selected natural localities of Slovak republic, Journal of central european agriculture, 14(3):1210-1219, 2013.
  - <sup>4</sup> Popescu R. M., Ionică F.E., Mogoșanu G.D., Osiceanu S.M., Berbecaru A., Turcu A., Neamțu J., Popescu F., Preliminary study on the hypoglycaemic effect of some plant tinctures in mice with experimentally adrenaline-induced hyperglycemia, Current Health Sciences Journal, 9:30-35, 2013.
  - <sup>5</sup> Tesch GH, Terrij A. Rodent models of streptozotocin induced diabetic nephropathy (Methods in Renal Research), Nephrology, 12(3): 261–266, 2007.
  - <sup>6</sup> Nair S.P., Shah N.C, Shah R.M., Alteration in enzymatic antioxidant defense in diabetes mellitus, Biomedical Research, 23 (3):402-404, 2012
  - <sup>7</sup> Popescu R.M., Berbecaru-lovan A., Mogoșanu G.D., Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic effect of some vegetal extracts, using mice with streptozotocin - experimentally induced diabetes, Current Health Sciences Journal, 2:52-58, 2014.
  - <sup>8</sup> Popescu R.M., Mogoșanu G.D, Brbecaru-lovan A., Osiceanu S.M., Neamțu J, Popescu F., Analysis of the antioxidant effect of *Acanthus longifolius*, Current Health Sciences Journal, 9:25-29, 2014.
  - <sup>9</sup> Waer HF, Helmy SA Cytological and Histochemical Studies in Rat Liver and Pancreas during Progression of Streptozotocin Induced Diabetes and Possible Protection of Certain Natural Antioxidants. J Nutr Food Sci 2:165, 2012.
  - <sup>10</sup> Zafar M.; Naeem-ul-Hassan S., Ahmed M., Kaimkhani Z.A., Altered Liver Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats, Int. J. Morphol., 27(3):719-725, 2009.