

agranulocitoza poate apărea rapid, este utilă determinarea periodică a leucocitelor pentru diagnosticarea precoce. Primele simptome ale agranulocitozei frecvent se pot manifesta prin dureri în gât și febră, din care cauză pacienții trebuie imediat să se adreseze la medic. O neutropenie ușoară poate fi un simptom al agranulocitozei incipiente, precum și al tirotoxicozei. Suspendarea preparatelor contribuie la dispariția agranulocitozei, care poate fi accelerată prin prescrierea factorului granulocitar colonial.

E necesar de menționat, că cea mai frecventă reacție adversă este erupția urtiformă, uneori hemoragică, care poate dispărea fără a suspenda tratamentul, iar uneori va fi necesară utilizarea H1-antihistaminicelor, glucocorticoizilor sau substituția antitirodianelor, deoarece hipersensibilitate încrucișată se constată rar. Un șir de alte reacții adverse, precum durerile și redoarea în articulații, parestezia, cefaleea, greața, voma, diareea, pigmentarea pielii, alopecia, febra medicamentoasă, leziunile hepatice și renale, creșterea activității enzimelor hepatice, deși nu sunt atât de frecvente pot avea loc la prezența anumitor factori predispozanți.

Școlarizarea pacienților în aceste momente, de regulă, dă efecte pozitive prin creșterea eficienței și diminuarea reacțiilor adverse.

În baza celor expuse și experienței acumulate putem conchide despre unele succese în domeniul problemelor abordate. În primul rând, am constata, că școlarizarea bolnavilor în aspectul cunoașterii patologiei tiroidiene a contribuit la creșterea adrsărilor precoce, ce denotă despre majorarea nivelului de conștientizare a populației. În al doilea rând, s-a majorat evident numărul pacienților ce respectă recomandările medicului referitor la controlul după evoluția bolii și de efectuare a examenului repetat în termenii necesari. În al treilea rând, datorită respectării criteriilor de monitorizare după efectul preparatelor s-a redus numărul de bolnavi cu reacții adverse, uneori grave.

În concluzie e necesar de menționat, că incidența și severitatea maladiilor glandei endocrine poate fi diminuată, inclusiv și prin efectuarea unei școlarizări eficiente ce va spori complianța pacienților la tratament și va reduce volumul cheltuielilor financiare. Acestea din urmă vor permite ca în cazul unor accidente, similare Cernobîlului, să se întreprindă măsuri profilactice ce vor contribui la păstrarea sănătății populației.

PROPRIETĂȚILE ANTIBACTERIENE ȘI ANTIFUNGICE ALE SOLUȚIEI BENZIL ALCOOLICE DE JUGLONĂ

Andrei Bacinschi

Catedra Farmacologie și Farmacologie clinică „Nicolae Testemițanu”
(Conducător științific – conferențiar universitar V. Gavriluța)

Summary

Antibacterial and antifungal properties of benzil-alcoholic solution of juglone

Studies in vitro demonstrate that benzil-alcoholic solution of juglone poses a pronounced antibacterial activity against gram-positive (*Staphylococcus aureus* (Wood-209), *Streptococcus faecalis*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) microorganisms and antifungal properties against *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium*, 2-4 times more intensive than standard benzyl-alcoholic solution. The drug „in vivo” leads to early elimination of inflammatory and necrotic proceses caused by staphylococcus and fungi. The efficacy of benzyl alchhoholic solution of juglone is determined in the most part by of presence of haftoquinonic derivate.

Rezumat

Soluția benzil alcoolică de Juglona „in vitro” manifestă proprietăți antibacteriene față de flora gram-pozitivă (*Staphylococcus aureus* (Wood-209), *Streptococcus faecalis*), flora gram-negativă (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*) și fungi (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*,

Aspergillus fumigatus, Penicillium) ce depășesc de 2-4 ori vehicolul soluției. Preparatul „in vivo” contribuie la înlăturarea mai precoce a proceselor inflamatoare și purulente provocate de infecția stafilococică și fungică. Eficacitatea soluției benzil alcoolice de juglonă este determinată în mare parte de prezența derivatului naftochinonic.

Actualitatea

Din cele mai vechi timpuri formele medicamentoase din diferite structuri ale nucului (*Juglans Regia L., Juglans Nigra etc.*) se utilizau cu diverse scopuri medicina populară. Din sursele antice se întâlnesc informații despre proprietățile curative ale infuziilor din frunze de nuc pentru tratamentul afecțiunilor purulente ale pielii și mucoaselor, infecțiilor inflamatorii ale ochilor. Sucul din coaja verde de nuc, amestecat cu miere de albine, se utiliza în tratamentul afecțiunilor purulente ale laringelui. În unele țări tincturile din frunze de nuc se utilizau în tratamentul formelor cutanate de tuberculoză și cancer [Benites J., et al., 2010].

În rezultatul cercetărilor efectuate s-a determinat că proprietățile curative ale infuziilor din frunze de nuc, în marea măsură, sunt datorate prezenței în ele a derivatului de naftochinonă – Juglonă. De asemenea au fost determinate și alte naftochinone mai puțin active. Ele toate îndeplinesc funcția de protecție a nucului față de invaziile insectelor, bacteriilor etc, sau creșterea în adiacență a plantelor non simbiotice [Imbaraj J.J. et al., 2004, Krolicka A. et al., 2008].

În literatura de specialitate se menționează că alcaloizii di nuc, și în primul rând juglona, pot manifesta efect antibacterian, antifungic, antiviral, antitumoral, antioxidant, tonizant, antiproliferativ, imunodepresiv sau imunostimulator (Reese S. et al, 2010, Zakharova O.D. et al, 2010, Benites J. Et al 2010, Krolicka A et al, 2008, Inbaraj J.J. et al, 2004, Борзов М. В. И др., 1958, Галецкий П. К., 1974, Гринев А. Н. И др., 1980).

Pentru prima dată juglona a fost obținută în 1856 din coaja verde de nuc. Obținerea juglonei din materia primă vegetală nu a permis asigurarea cantităților necesare de produs pentru un studiu farmacologic mai aprofundat. În literatură sunt descrise diverse încercări pentru obținerea juglonei pe cale sintetică. În 1949 L.N. Aizinberg a propus o metodă chimică de obținere a juglonei, însă complexitatea acestei metode, instabilitatea produsului obținut, reactivitatea lui înaltă, prezența amestecului de 5-hidroxi 1,4 naftochinonă și lipsa informației veridice au jucat rolul său negativ, juglona ne meritat fiind exclusă din lista celor mai efective preparate de atunci.

Actualmente colaboratorii Institutului de Chimie al AȘ din RM au elaborat o nouă metodă de sinteză a juglonei care permite prin cheltueli neînsemnate obținerea unui produs chimic pur în cantități satisfăcătoare. În baza acestui alcaloid au fost elaborate noi forme farmaceutice cum sunt soluția alcoolică cu denumirea de „nucină”, soluția benzil alcoolică de juglonă, gel cu juglonă.

Scopul studiului s-a redus la cercetarea „in vitro” și „in vivo” a proprietăților specifice (antibacteriene și antifungice) a soluției benzilalcoolice de Juglonă.

Materiale și metode

Studiile experimentale „in vitro” au fost efectuate în conformitate cu recomandările metodice de cercetare a remediilor chimioterapice după Хабриев P.Y.(2005). În studiu s-a folosit soluția benzil alcoolică de juglonă stabilizată (juglonă – 0,1, acid citric – 0,1, alcool benzilic ad 100 ml) și vehicolul (acid citric – 0,1, alcool benzilic ad 100 ml).

Cercetarea activității antimicrobiene a formelor medicamentoase a fost efectuată “in vitro” prin metoda diluărilor succesive în mediu de cultură – agar peptonat, iar a celor antifungice - prin metoda diluărilor succesive în mediu lichid de cultură (Bulion Saboro). Pentru studiul proprietăților antibacteriene au fost pregătite opt diluții (0,02 % ; 0,01% ; 0,006 % ; 0,003 %; 0,001 %; 0,00077 % ; 0,00038 %; 0,00019 %, 0,00009%), iar a celor antimicotice 11

diluții (0,05%; 0,025%; 0,0125%; 0,0062%; 0,0031%; 0,00155%; 0,00077%; 0,00038%; 0,00019%; 0,00009%; 0,000045%).

În calitate de culturi de referință au fost folosite tulpinile bacteriilor gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* (Wood-209), *Streptococcus faecalis*), bacteriilor gram-negative (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*) și fungilor (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium*).

Evaluarea rezultatelor a fost efectuată vizual. Activitatea bacteriostatică - concentrația minimă inhibitoare (CMI) a fost stabilită în cazul lipsei creșterii microorganismelor în mediul nutritiv lichid cu cea mai mică concentrație de preparat. Activitatea bactericidă - concentrația minimă bactericidă (CMB) a fost stabilită în baza lipsei creșterii microorganismelor după însămânțarea repetată pe geloză peptonată cu termostatarea ulterioară timp de 24 ore. Activitatea fungistatică - concentrația minimă inhibitoare (CMI) a fost stabilită în cazul lipsei creșterii fungilor în mediul nutritiv lichid. Activitatea fungicidă - concentrația minimă fungicidă (CMF) a fost stabilită în baza lipsei creșterii fungilor după însămânțarea repetată pe geloză Saburo cu termostatarea ulterioară timp de 7 zile la $t = 28^{\circ}\text{C}$.

Testarea „in vivo” a activității antibacteriene a soluțiilor benzil-alcoolică și vehicol a fost efectuată pe modele de infecții stafilococice și candidozice localizate la șoricei albi (E.H.Падейская, 1971). Cercetările au fost efectuate pe 42 șoricei albi cu masa de 14-17g.. Pentru modelarea infecției stafilococice locale a fost folosită cultura standard de *Staphylococcus aureus* (ATSS 25 932), iar a celei micotice – cultura standard de *Candida albicans*. Preventiv în regiunea abdominală a șoriceilor a fost înlăturat învelișul pilos pe o suprafață de 1 cm². Mai apoi a fost preparată suspensia stafilococică și candidozică în diluție de 900 mln de corpi microbieni/ml (doza de infectare necesară – nu mai puțin de 800 mln corpi microbieni/ml). Suspensia dată în volum de 0,1 ml a fost injectată în regiunea preventiv preparată a șoriceilor. Nivelul intensității de afectare a regiunilor infectate a fost stabilit condiționat în felul următor: gradul I de afectare – (+) se determină infiltrate purulente punctiforme de dimensiuni până la 2 mm.; gradul II de afectare – (++) se determină infiltrate purulente până la 5 mm.; gradul III de afectare - (++++) se determină infiltrate purulente până la 1 cm și procese necrotice; lipsa afectării a fost indicată cu semnul (-).

Șoriceii au fost repartizați în trei loturi egale, care includeau animale cu diverse grade de afectare. După repartizarea în loturi, zilnic la aceeași ora, la șoriceii din lotul I (lotul martor) (n = 6-8) fost supuși numai observărilor, fără utilizarea oricărui tratament la șoriceii din lotul II (n = 6-8) a fost aplicată soluția de vehicol, iar șoriceii din lotul III (n = 6-8) suprafața afectată a fost prelucrată soluția de juglonă. Animalele au fost supuse observărilor până la momentul lichidării totale a proceselor infectate și cicatrizarea plăgilor la șoriceii din lotul martor.

Eficacitatea tratamentului cu soluțiile studiate a fost apreciată după: compararea în dinamică a intensității afectărilor în loturile tratate și lotul martor (stabilirea indicelui de afectare); evidența animalelor decedate în caz de generalizare a infecției; timpul de dispariție totală a proceselor purulente.

Rezultate și discuții

Cercetările experimentale ne-au demonstrat, că soluția benzil alcoolică de juglonă manifesta acțiune bacteriostatică și bactericidă față de stafilococ în concentrații de 0,00009%, iar față de streptococ, colibacil și protei în concentrații de 0,00019%. În același timp vehicolul posedă efect antimicrobian față de tulpinile studiate în concentrații de 2 ori mai mari, fapt ce ne dovedește despre activitatea antibacteriană certă a juglonei, prezentă în soluția benzil alcoolică (tab.1).

Studiul proprietăților antifungice „in vitro” ne-au relevat, că a soluția benzil alcoolică de juglonă manifesta acțiune fungistatică și fungicidă față de *Candida albicans* în concentrații de 0,00038% în timp ce vehicolul doar în 0,00155%. În același timp efectul antimicotic al substanței cercetate era de 2 ori mai intens față de tulpinile de *Aspergillus* și *Penicillium* (tab.2).

Tabelul 1

Acțiunea antibacteriană „in vitro” a soluției benzilalcoolice de juglonă

Formele medicamentoase	Microorganismele testate							
	S. aureus (209)		Str. faecalis		E. coli (ATCC)		Pr. vulgaris	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Vehicolul (%)	<0,00019	0,00019	0,00038	0,00038	0,00038	0,00038	0,00038	0,00038
Soluția benzil alcoolică de juglonă de (%)	<0,00009	<0,00009	0,00019	0,00019	0,00019	0,00019	0,00019	0,00019

Tabelul 2

Acțiunea antifungică a soluției benzil alcoolice de juglonă „in vitro”

Formele medicamentoase	Culturile de fungi supuse testării							
	Candida albicans		Aspergillus niger		Asp. fumigatus		Penicillium	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
Vehicolul (%)	0,00155	0,00155	0,00038	0,00038	0,00038	0,00038	0,00038	0,00038
Soluție benzil alcoolică de juglonă (%)	0,00038	0,00038	0,00019	0,00019	0,00019	0,00019	0,00019	0,00019

Astfel, rezultatele obținute ne demonstrează, că juglona, ca component activ al soluției benzil alcoolice, manifestă activitate antibacteriană și antifungică concomitentă. Aceasta este relevantă de 2-4 ori mai intens decât componenții formatori ai formei medicamentoase (acid citric și alcool bezilic).

Rezultatele obținute în studiile „in vitro” ne-au permis să efectuăm testarea proprietăților antibacteriene și antifungice „in vivo” prin modelarea plăgilor infectate cu stafilococi și candidide. Peste 48 ore de la injectarea suspensiei stafilococice în regiunea dată au apărut infiltrate purulente și ulcerații de diverse dimensiuni.

La șoriciei din lotul martor procesele inflamatorii au persistat timp îndelungat (10–15 zile). Numai la a 9-a zi la unii șoriciei din lotul dat se determina micșorarea procesului inflamator și formarea crustei pe suprafața ulcerațiilor. Disparația totală a modificărilor locale la șoriciei din lotul dat s-a determinat la a 10-15 zi de observații (tab.3).

La animalele din lotul tratat cu soluție acid citric și benzil alcool (vehicol) la a 8-a zi de tratament se observa diminuarea proceselor inflamatorii. Cicatrizarea definitivă se constata la a $11,7 \pm 0,7$ zi de tratament.

La șoriciei tratați cu soluție benzil alcoolică de juglonă la a treia zi de tratament se determina micșorarea evidentă a infiltratelor purulente și ulcerațiilor, iar la a cincea zi semnele inflamatoare erau minime și avea loc epitelizarea ulcerațiilor cu formarea unei cruste ce proiema la suprafața pielii. Disparația completă a modificărilor locale în lotul dat s-a determinat la a 6-10 zi de tratament (tab.3).

După modelarea infecției fungice locale cu cultura standard de *Candida albicans* peste 48 ore de la injectarea suspensiei fungice în regiunea dată au apărut infiltrate micotice și ulcerații de diverse dimensiuni.

La șoriceii din lotul martor procesele inflamatoare au persistat timp îndelungat (15–18 zile). Numai la a 9-a zi la unii șoriceii din lotul dat se determina micșorarea procesului inflamator și formarea crustei pe suprafața ulcerațiilor. Dispariția modificărilor locale la șoriceii din lotul dat s-a determinat la a $16,8 \pm 1,2$ zi de observații.

La animalele tratate cu soluția de vehicol (ce conține acid citric și benzil alcool) diminuarea proceselor infectate și înlăturarea totală a lor a avut loc cu 1-2 zile mai precoce comparativ cu lotul martor (tab.3).

La șoriceii tratați cu soluție benzil alcoolică de juglonă la a 5-a zi de tratament se determina micșorarea evidentă a infiltratelor micotice și ulcerațiilor, iar la a 7-a zi semnele inflamatorii sunt minime și avea loc epitelizarea ulcerațiilor cu formarea unei cruste ce proiemină la suprafața pielii. Disparițiadepplină a modificărilor locale în lotul dat s-a determinat la a 7-10 zi de tratament.

Tabelul 3

Activitatea antibacteriană și antifungică „in vivo” a soluției benzil alcoolice de juglonă

Loturile de animale	Cicatrizarea plăgilor infectate cu Staphylococcus aureus (zile)	Cicatrizarea plăgilor infectate cu Candida albicans (zile)
1. Lotul martor (netratat)	$13,7 \pm 0,5$	$16,8 \pm 1,2$
2. Lotul tratat cu vehicol	$11,7 \pm 0,7$	$15,5 \pm 0,8$
3. Lotul tratat cu soluția benzil alcoolică de juglonă	$7,8 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,9$

Astfel, rezultatele cercetărilor experimentale ne-au demonstrat, că soluția benzil alcoolică de juglonă manifesta și „in vivo”proprietăți antibacteriene și antifungice marcate față de vehicol, fapt ce neconfirmă că acestea sunt determinate de prezența derivatului naftochinonic.

Date despre proprietățile antibacteriene și antifungice ale derivaților de naftochinonă au fost relatate de un șir de autori (Krolicka A et al, 2008, Галецкий П.К., 1974, Демирчоглян Б. Л.и др. 1971, Inbaraj J.J. et al, 2004.). S-a constatat că însăși inelul 1,4 naftochinonic manifestă proprietăți antimicrobiene, dar îndeosebi introducerea în structura lui a unor grupe (carbonilice, etanolamine, metoxilice, halogenilor etc.).

Una din întrebările principale constă în elucidarea mecanismelor posibile de acțiune pentru determinarea sensibilității bacteriilor și fungilor în dependență de țintele specifice. Unul din mecanismele cele mai posibile se reduce la interacțiunea cu grupele tiolice (SH) cu: inhibarea activității enzimelor (succinatdehidrogenazei) cu dereglarea fosforilării oxidative și sintezei de energie; afectarea proteinelor membranare și dereglarea funcțiilor membranelor celulare (de transport etc.). Inbaraj J.J și coaut (2004) au constatat că juglona poate interacționa cu glutatationul cu trecerea din GSH în GSSG. Totodată diminuarea nivelului glutatationului în celulele microbiene cu reducerea rezistenței la acțiunea radicalilor liberi.

Krolicka A și coaut. (2008) au demonstrat că derivații de naftochinonă pe culturile de Enterococcus faecalis își exercită efcetul antibacterian prin diminuarea includerii uridinei și reducerea semnificativă a sintezei ADN și proteinelor. De asemenea autorii au constata inhibarea lanțului respirator prin acceptul de electroni cu inhibarea sintezei ATP și oxidarea NAD și NADP.

Acțiune citotoxică asupra microbilor poate fi realizată prin formarea radicalilor liberi (oxigenul singlet, peroxizilor) (Inbaraj J.J. et al, 2004)

Acțiunea antifungică, posibil, este determinată de inhibarea respirației anaerobe, precum și de diminuarea sintezei de energie (Щербановский Л. Р., Шубина Л., 1975, Полоник С. Г. и др. 1986).

Concluzii

1. Soluția benzil alcoolică de juglonă „in vitro” posedă activitate pronunțată antimicrobiană (față de bacteriile gram-pozitive și gram-negative) și antifungică (față de candida, aspergillus și penicillium) în concentrații foarte mici.
2. Acțiunea antibacteriană și antifungică a soluției benzil alcoolice de juglonă este de 2-4 ori mai manifestă decât acțiunea vehicolului.
3. Soluția benzil alcoolică de juglonă „in vivo” contribuie la înlăturarea mai precoce a proceselor inflamatorii și purulente cauzate de infecția stafilococică și candidozică.
4. Proprietățile antibacteriene și antimicotice ale soluției benzil alcoolice de juglonă sunt în mare parte datorate prezenței în componența sa a derivatului 5-hidroxi-1,4-naftochinonă.

Bibliografie

1. Benites J., et al. An in vitro comparative study with furyl-1,4-quinones endowed with anticancer activities. Invest New Drugs. 2010 mar 17.
2. Imbaraj J.J. et al. Cytotoxic action of juglone and plimbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. Chem Res Toxicol. 2004 Jan; 17 (1): 55-62.
3. Krolicka A. et al., Antibacterial and antioxidant activity of the secondary metabolites from in vitro cultures of *Drosera aliciae*. Biotechnol Appl Biochem. 2008, sep 9
4. Reese S. et al. The pin 1 inhibitor juglone attenuates kidney fibrogenesis via Pin 1-independent mechanism in the unilateral ureteral occlusion model. Fibrogenesis Tissue Repair. 2010, Jan 4, 3,1.
5. Борзов М. В., Айзенберг Л. Н., Межевалова А. Г. Юглон и его применение в медицине и ветеринарии. // Бюллетень научно-технической информации. № 5.– Кишинев, 1958.
6. Вичканова С. А., Изосимова С. Б., Адгина В. В. и др. Перспективы поиска антимикробных средств среди хинонов растительного происхождения. // Растительные ресурсы.– 1979.– № 2.– С. 167-177.
7. Галецкий П. К. К методике изучения антимикробной активности производных 1,4-нафтохинона и юглона. // Ускоренные методы диагностики инфекционных болезней.– Кишинев, 1974.– С. 68-69.
8. Гринев А. Н., Урецкая Г. Я., Саркисова Л. С. и др. 6-толуоил-1,2-нафтохиноны – синтез, реакции и противовирусная активность. // Хим.-фармац. журн.– 1980.– т. 14, № 10.– С. 30-33.
9. Демирчоглян Б. Л., Котелев В. В., Разумовский П. Н. и др. Противогрибковые свойства некоторых хинонов. // Химия юглона.– Кишинев, 1971.– С. 98-104.
10. Полоник С. Г., Толкач А. М., Уварова Н. И. и др. Синтез и противогрибковая активность ацетилированных гликозидов 1,4-нафтохинонов. // Хим.-фармац. журн.– 1986.– т. 20, № 2.– С. 158-160.
11. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва, 2005, 501 с.
12. Щербановский Л. Р., Шубина Л. С. Бензо-, нафто- и антрахиноны цветковых растений как антимикробные вещества. // Растительные ресурсы.– 1975.– № 3.– С 445-451.