

STUDIUL PLANTELOR MEDICINALE

CZU: 615.322.074:[582.734+582.998]

STUDII PRECLINICE IN VITRO ȘI IN VIVO AL EXTRACTELOR DIN
AGRIMONIA EUPATORIA L. ȘI CICHORIUM INTYBUS L.PRECLINICAL IN VITRO AND IN VIVO STUDIES OF EXTRACTS FROM AGRIMONIA
EUPATORIA L. AND CICHORIUM INTYBUS L.Cojocaru-Toma Maria^{1,2}¹Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, USMF "Nicolae Testemițanu", Republica Moldova²Centrul Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF "Nicolae Testemițanu", Republica Moldova

Summary. Hepatitis is a major problem for public health at both global level and for the Republic of Moldova, and the evaluation of medicinal plants that improve liver function remains important from medical-social and economic points of view. Preclinical evaluation of the plant extracts is essential in our research. *In vitro* tests on hepatocyte cells cultures were performed to evaluate the effect of *Agrimoniae herba* (*Agrimonia eupatoria* L.) and *Cichorii herba* (*Cichorium intybus* L.) extracts on liver cell metabolism in the doses of 100, 200, 600 and 1000 mg/kg by MTT technique (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Viability of liver cells to the action of plant extracts denotes the fact that the doses of 100 – 600 mg obtained from *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba* show higher cell viability and do not affect liver cells, respectively, which can be used in further studies.

Keywords: medicinal plants, plant products, hepatoprotectants.

Introducere

Hepatitele virale și non-virale, atât la adulți, cât și la copii, au fost și continuă să fie o problemă medico-socială și economică. Hepatita se manifestă asimptomatic și în multe cazuri, se depistează tardiv, când ficatul este deja afectat, iar povara hepatitelor virale este majoră la nivel mondial, regional și național. Conform datelor OMS, anual, în diferite regiuni geografice sunt înregistrate peste 780 mii decese ca urmare a hepatitei virale B și 500 mii, urmare a hepatitei virale C [24]. Astfel, afecțiunile hepatice crează grave probleme de sănătate, influențează capacitatea de muncă și calitatea vieții, iar studiul medicamentelor și fitopreparatelor cu acțiune hepatoprotectoare rămâne o direcție prioritară, pentru elaborarea formelor medicamentoase noi.

Scopul lucrării

Ne-am propus studiul plantelor medicinale și a produselor vegetale din flora Republicii Moldova și din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF „Nicolae Testemițanu” și cercetări experimentale prin studii preclinice *in vitro* și *in vivo*.

Material și metode

Cercetările experimentale au fost efectuate în cadrul subdiviziunilor USMF "Nicolae Testemițanu": produsele vegetale au fost recoltate din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale, pe întreaga perioadă de înflorire, ținând cont de natura produselor vegetale și recomandărilor farmaceutice; studiul chimic s-a realizat în ca-

drul Catedrei de Farmacognozie și botanică farmaceutică; toxicitatea acută – în cadrul Laboratorului evaluare preclinică și clinică a medicamentului, Centrul în Domeniul Medicamentului; testul pentru viabilitate și citotoxicitate, tehnica MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)[16] s-a efectuat în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi; analizele biochimice în cadrul Laboratorului de biochimie.

Rezultate

Hepatitele constituie o problemă majoră pentru sănătatea publică atât la nivel global, cât și pentru Republica Moldova, iar evaluarea produselor vegetale care îmbunătățesc funcția ficatului rămâne importantă din puncte de vedere medico-social și economic.

Cicoare (*Cichorium intybus* L.), fam. Asteraceae. Părțile aeriene de cicoare (*Cichorii herba*) conțin cicorină, arginină, acid cicoric și principii amare. Întreaga plantă conține un latex, al cărui constituent major este inulina. Pe lângă inulină, se conțin substanțe tanante, uleiuri volatile, pectine, rășine. Planta servește și ca sursă de vitamine: A, C, E, K, P, PP. Flavonoidele constituie cca 3%: luteolină, quercetină, riboflavină. În părțile aeriene domină: cicorina, arginina, colina, se întâlnesc de asemenea și microelemente: Fe, P, Ca. În părțile subterane predomină substanțele triterpenice amare, fructoza, taninuri și ulei volatile [1; 13]. Principiile active din cicoare stimulează digestia, detoxifică organismul, scade colesterolul și glicemia. Prin faptul că sunt anorexigene și laxative, cicoarea este indicată în obezitate [20]. Preparatele din cicoare se recomandă în cazul

afecțiunilor digestive: gastrite, hepatite, colesicite, spasme hepato-biliare, diabet, constipații, hemoroizi, ateroscleroză [17; 23]. De asemenea, cicoarea este eficientă în perioada de convalescență, poate fi administrată sub formă de infuzie, sirop, decoct și comprimate [10].

Turiță (*Agrimonia eupatoria* L.), fam. Rosaceae. În părțile aeriene de turiță (*Agrimoniae herba*) au fost identificate substanțe tanante, uleiuri volatile, vitamina K, acizi organici și flavonoide, dintre care: quercetrina, kaempferolul, luteolina și apigenina [3; 7; 18]. Turița cunoscută din antichitate, posedă efect puternic curativ în patologii gastrointestinale, afecțiuni ale căilor biliare, prin conținutul de taninuri și flavonoide [11; 22]. Menționăm că turița este un bun regenerant, administrată sub formă de infuzie și decoct [12]. Poate fi utilizată în patologii hepatice și în combinație cu alte plante medicinale. Polifenolii existenți în produsele menționate au un efect antiinflamator, antioxidant protector împotriva stresului oxidativ [21].

Produsele vegetale *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* au fost recoltate din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF „Nicolae Testemițanu” conform recomandărilor farmaceutice, iar extractele au fost obținute prin extracție repetată a produselor vegetale pulverizate: *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*, cu un amestec etanol:apă (60%), timp de o jumătate de oră la fiecare etapă de extracție, până la epuizarea produselor vegetale, cu concentrarea soluțiilor extractive obținute la temperatura de 40°C, cu ajutorul unui evaporator rotativ. Conținutul de polifenoli și acțiunea antioxidantă s-au realizat prin metode spectrofotometrice UV/VIS [4]. Părțile aeriene de turiță și de cicoare manifestă remarcabile proprietăți antioxidante: *Agrimoniae herba* (IC₅₀ = 45,56 μg/ml), *Cichorii herba* (IC₅₀ = 173,08 μg/ml), realizată prin testul DPPH, cu o corelare în conținutul total de polifenoli pentru turiță de 6,07% și, respectiv, cicoare – 2,88%, exprimat în acid galic [6; 14].

Toxicitatea acută a fost determinată prin metoda dozelor fixe, cu stabilirea clasei toxice, prin administrare intra-gastrală și intraperitoneală, conform TG 423 (Acute Toxic Class Method), recomandată de Organizația Economică pentru Cooperare și Dezvoltare și după metoda Kerber, pe 132 de șoricei albi de laborator: 66 masculi, 66 femele [15]. Studiul toxicității acute realizat în cadrul Laboratorului de evaluare preclinică și clinică a medicamentelor a Centrului în Domeniul Medicamentului ne-a permis să stabilim că la administrarea dozelor (200; 1000; 2000; 4000; 6000 mg/kg) extractele din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* se prezintă practic inofensive (DL 50% >5000 mg/kg) cu clasa de toxicitate 5, fapt ce poate servi ca premiză pentru continuarea studiilor preclinice și clinice de determinare a inofensivității și eficacității a extractelor studiate [5].

Pentru evaluarea acțiunii extractelor din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* asupra viabilității celulelor hepatice izolate de la animale de laborator, s-a utilizat tehnica MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [8; 16]. Hepatocitele au fost extrase de la șobolani albi de laborator conform protocolului de izolare, în două

etape în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi [9]. Ulterior, au fost determinate *in vitro* viabilitatea și citotoxicitatea celulară a hepatocitelor după expunerea acestora la reagentul MTT și extractelor obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* în concentrații de 100 mg, 200 mg, 600 mg și 1000 mg/kg. Viabilitatea celulară a hepatocitelor tratate cu extract de *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* în dozele de 100 mg și 200 mg sunt similare și constituie $92,07 \pm 1,44\%$ pentru *Agrimoniae herba* și respectiv $73,01 \pm 1,49$ pentru *Cichorii herba*, față de lotul martor; doza de 600 mg prezintă $77,27 \pm 2,38\%$ pentru *Agrimoniae herba* și respectiv $57,23 \pm 1,38\%$ pentru *Cichorii herba*. Cea mai mică viabilitate celulară s-a atestat la concentrația de 1000 mg fiind de $41,60 \pm 1,98\%$ la *Cichorii herba* și $49,98 \pm 3,53\%$ pentru *Agrimoniae herba*, considerată și doză cu cea mai înaltă acțiune citotoxică. Astfel, dozele de 100 – 600 mg obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* manifestă viabilitate celulară, nu afectează celulele hepatice și pot fi utilizate în studii ulterioare (tabelul 1).

Tabelul 1. Viabilitatea celulară studiată pe hepatocite izolate a extractelor obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*

Doza	Viabilitate celulară a extractului din <i>Agrimoniae herba</i> (%)	Viabilitate celulară a extractului din <i>Cichorii herba</i> (%)
100 mg/kg	$92,07 \pm 1,44$	$73,01 \pm 1,49$
200 mg/kg	$92,78 \pm 1,75$	$75,76 \pm 1,61$
600 mg/kg	$77,27 \pm 2,38$	$57,23 \pm 1,38$
1000 mg/kg	$49,98 \pm 3,53$	$41,60 \pm 1,98$

Studiile au continuat pe model de hepatită medicamentoasă, indusă șobolanilor albi de laborator prin administrarea de *Paracetamol* în doză de 600 mg/kg. În sânge s-au determinat indicii hematologici și biochimici de bază, precum și markerii stresului oxidativ și sistemul antioxidant [19]. Extractele obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* s-au administrat enteral prin gavaj 7 zile consecutiv în doze de 400 mg/kg după modelarea hepatitei. Hepatita medicamentoasă (lotul cu *Paracetamol* în doză de 600 mg/kg și netratat) induce creșterea alaninaminotransferazei (ALAT) și aspartataminotransferazei (ASAT) – de 2,5 ori, γ -glutamyltranspeptidazei (γ -GTP) – de 1,7 ori, fosfatazei alcaline (FA) și pseudocolinesterazei (PCE). Constatăm, că extractele de *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* influențează pozitiv asupra indicilor biochimici de bază sanguini, ce se manifestă prin tendința de normalizare a enzimelor studiate: ALT, AST, γ -GTP, FA, PCE, restabilirea parțială a markerilor stresului oxidativ și sistemului antioxidant, menținerea la valori normale a indicilor ce caracterizează metabolismul bazal: ureea, creatinina, colesterolul și trigliceridele. Astfel, medicația hepatitei medicamentoase cu extractele de *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* în doze de 400 mg/kg contribuie la micșorarea și normalizarea devierilor indicilor hematologici și biochimici, fapt ce poate servi ca premiză pentru continuarea studiilor preclinice și clinice a extractelor studiate.

Concluzii

1. Determinarea toxicității acute denotă o toxicitate redusă atât la administrarea enterală, cât și parenterală: (DL50% este >5000 mg/kg pentru extractele de *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba*), estimată conform metodei TG 423 (Acute Toxic Class Method), ce caracterizează extractele studiate ca fiind inofensive, cu clasa de toxicitate 5.

2. Evaluarea citotoxicității extractelor obținute din *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* asupra viabilității celulelor hepatice izolate de la animale de laborator, prin testul

de viabilitate, tehnica MTT, prezintă că dozele de 100-600 mg/kg manifestă viabilitate celulară și nu afectează celulele hepatice.

3. Medicația hepatitei medicamentoase cu extractele de *Agrimoniae herba* și *Cichorii herba* în doze de 400 mg/kg contribuie la micșorarea și normalizarea devierilor indicilor hematologici și biochimici, prin tendința de normalizare a enzimelor studiate, iar studiul fitochimic și biologic al plantelor medicinale din colecția Centrului Științific de Cultivare a Plantelor Medicinale USMF „Nicolae Testemițanu” rămâne una din direcțiile prioritare de cercetare.

Bibliografie

1. Abbas Z., Saggi S., Sakeran M. Phytochemical, antioxidant and mineral composition of hydroalcoholic extract of Chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves, Saudi J Biol Sci 2015; 22(3), p. 322–326.
2. Amarowicz R., Pegg B., Barl B. et al. Antioxidant activity of extracts of phenolic compounds from selected plant species. Biologically Active Phytochemicals in Food, 2003; 16, p.124–128.
3. Cojocaru-Toma M. Identification and assay of the flavonoids in medicinal plants with hepatoprotective action, J Modern Phytomorphology, 2015; (8), p. 61– 64.
4. Ciobanu N., Cojocaru-Toma M. Ciobanu C., Benea A. Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity of some species cultivated in the Republic of Moldova, Eurasian J Anal Chem, 2019, p. 441– 447.
5. Cojocaru-Toma M., Parii S., Nicolai E. et al. Determination of acute toxicity for extracts of *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*, Mold J Health Sci, 2018; 16 (2), p. 35–43.
6. Cojocaru-Toma M., Nistoreanu A., Ciobanu N., Crișan G. Study of the antioxidant action of some medicinal plants from the collection of CȘCPM USMF, “Nicolae Testemițanu” by using the DPPH test (romanian). Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale, 2015; (1), p. 208 – 213.
7. Cojocaru-Toma M., Ancuceanu R., Soloviov M., Babileva A. Spectrophotometric analysis of flavonoids in herbal products and extracts from *Agrimoniae herba* and *Cichorii herba*. The Romanian National Congress of Pharmacy – 17th edition, Bucharest. Filodiritto Editore-Proceedings, 2018, p.58– 63.
8. Severgnini M., Sherman J., Sehgal A. et al. A rapid two step method for isolation of functional primary mouse hepatocytes: cell characterization and asialoglycoprotein receptor based assay development, Cytotechnology, 2012; 64(2), p. 187–95.
9. Jian M., Cobzac V., Vartic V., Nacu V. Hepatocytes isolation from adult rats for liver recellularization, Mold J Health Sci, 2019; 62(1), p. 13–16.
10. Renee A. *Cichorium intybus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. Complementary and Alternative Medicine, 2013; (15), p. 579–595.
11. Ivanova D., Vancova D., Nashar M. *Agrimonia eupatoria* tea consumption in relation to markers of inflammation, oxidative status and lipid metabolism in healthy subjects, J Arch Physiol Biochem, 2016; 119(1), p. 32–37.
12. Mirjana Z., Muruzovi C. et al. Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities. Journal of food and drug analysis, 2016; 24, p. 539–547.
13. Nwafor I., Shale K., Achilonu M. Chemical composition and nutritive benefits of Chicory as an ideal complementary and/or alternative livestock feed supplement, Sc. World J, 2017, Art. N. 7343928.
14. Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. Food Science and Technology, 1995 (28), p. 25–30.
15. Handbook for Good Laboratory Practice (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development. World Health Organization, 2009, p. 328 p.
16. Freimoser F., Jakob C. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities, Appl Environ Microbiology, 1999, 65(8), p. 372–379.
17. Hassan H., Yousef M. et al. Ameliorating effect of chicory *Cichorium intybus* L.-supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats, Food and Chemical Toxicology, 2010, p. 12–43.
18. Mirjana Z., Muruzovi C. et al. Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. Journal of food and drug analysis. 2016 (24), p. 539–547.
19. Rusu M., Tămaș M., Roman I. Produse fitoterapeutice testate în toxicoze hepatice experimentale, Toderco, 2017, p. 54– 68, p. 130–134.
20. Shad M., Nawaz H., Rehman T., Ikram N. Determination of some biochemicals, phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Cichorium intybus* L.: A comparative study, J Anim Plant Sci, 2013; 23(4), p. 160 –166.
21. Yoon S., Koh E., Kim C. et al. *Agrimonia eupatoria* protects against chronic ethanolinduced liver injury in rats, Food Chem Toxicol., 2012; 50(7), p. 235–241.
22. Kang S., Lee C., Koo H. et al. Hepatoprotective effects of aqueous extract from aerial part of Agrimony, Korean J Pharmacognosy, 2006, 37(1), p. 28–32.
23. Hassan H., Yousef M. Ameliorating effect of Chicory (*Cichorium intybus* L.)-supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats, Food Chem Toxicol., 2010; 48(8-9), p. 213–219.
24. Program Național de Combatere a Hepatitelor virale B, C li D pentru anii 2017–2021 (https://gov.md/sites/default/files/document/attachments/intr15_102.pdf), accesat la 04.11.20.