
Efectele unor extracte hidroalcoolice fitoterapeutice pe model experimental de hepatită cronică la șoareci

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand Ioana Bedecean

Conducător de doctorat Prof.univ. dr. Ioan Marcus



INTRODUCERE

Studiile privind afecțiunile hepatice ținesc înțelegerea tuturor mecanismelor enzimatică și acțiunilor factorilor patogeni la nivel hepatic. Ficatul reprezintă principalul organ de metabolizare a substanțelor cu caracter nociv asupra organismului. Pe lângă înțelegerea mecanismelor moleculare, cercetările vizează identificarea unor produși hepatoprotectori, care să reducă acțiunea radicalilor liberi și a speciilor reactive de oxigen la nivel hepatic.

Identificarea unor compuși naturali cu rol hepatoprotector este de un real folos în terapia adjuvantă în afecțiunile hepatice, iar extractele fitoterapeutice reprezintă o sursă bogată în asemenea compuși.

Înțelegerea biosintezei și a mecanismelor de acțiune a compușilor biologic activi din plante pentru organismul animal este o oportunitate de a procura remedii naturale, ușor accesibile și ieftine.

Principiile active din plante sunt influențate în mod direct de condițiile de creștere a plantelor. Factorii care influențează compoziția chimică sunt factorii ambientali diferiți în funcție de regiunile geografice unde sunt cultivate plantele. Este necesară identificarea compușilor biologic activi și acțiunea lor asupra organismului.

Fitoterapia în medicina veterinară nu are la momentul actual o aplicabilitate la scară mare, dar trebuie luată în considerare. Creșterea numărului de animale de companie și îmbunătățirea condițiilor de viață ale acestora a dus implicit și la dezvoltarea terapiilor alternative în aplicarea tratamentelor. Asigurarea protecției hepatice cu ajutorul unor compuși naturali, care ar putea fi adăugați în hrana animalelor ar putea ajuta la îmbunătățirea funcțiilor metabolice, extrapolându-se terapiile și în creșterile extensive pentru un randament ridicat al animalelor de fermă.

Necesitatea modelelor de hepatită cronică pe animale vine din incidența crescută a bolilor hepatice întâlnite la om. Alcoolul, bolile metabolice și factorii infecțioși virali sunt principalele cauze ale patologiei cronice hepatice, care, de cele mai multe ori, evoluează spre carcinom hepatocelular. În ultimul deceniu, boala ficatului gras non-alcoolic a devenit printre cele mai răspândite afecțiuni hepatice în țările dezvoltate afectând peste o treime din populație.

Practica utilizării terapiei tradiționale pe bază de plante câștigă în prezent atenție la nivel mondial în ambele sisteme de sănătate: umană și animală.

Cuvinte cheie: hepatită cronică, fitoterapie, oregano, rozmarin

STRUCTURA LUCRĂRII

Lucrarea intitulată "Efectele unor extracte hidroalcoolice fitoterapeutice pe model experimental de hepatită cronică la șoareci" conține 116 pagini și este redactată conform normelor în vigoare în două părți.

Prima parte cuprinde 28 de pagini, structurate în 4 capitole și sintetizează cadrul general actual al cunoașterii legat de istoricul și principiile fitoterapiei, structura biochimică a extractului hidroalcoolic de *Origanum vulgare*, compoziția biochimică a extractului hidroalcoolic de *Rosmarinus officinalis*, precum și protocolul de inducere al hepatitei cronice la șoareci.

Partea a II-a, extinsă pe 54 de pagini, cuprinde cercetările personale realizate în perioada 2011 – 2015. Fiecare capitol este structurat în subcapitole ce prezintă scopul și obiectivele, materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute cu discuții asupra noutății acestora comparativ cu alte studii efectuate și concluziile parțiale aduse în urma efectuării studiului. Rezultatele cercetării sunt ilustrate într-un număr de 40 de figuri și sintetizate în 17 tabele.

REZULTATELE CERCETĂRII

Capitolul 7, intitulat "Protocolul de inducere a hepatitei cronice" cuprinde studii asupra determinării unei doze optime de tetraclorură de carbon în vederea inducerii hepatitei cronice la șoareci Swiss și observarea acțiunii tetraclorurii de carbon administrate pe cale orală.

Pentru acest studiu, materialul biologic a constat în 48 de șoareci din linia Swiss, masculi și femele, în vârstă de 2 luni. Animalele au fost împărțite în 4 loturi a câte 12 indivizi, un lot control și 3 loturi care au primit tetraclorură de carbon în doze diferite 0,5 ml/kg, 1 ml/kg și 2 ml/kg, de 3 ori pe săptămână, timp de 8 săptămâni. La 48 de ore de la ultima administrare, câte 4 șoareci au fost sacrificați în săptămânile 2, 4, 6 și 8, au fost efectuate determinări hematologice și examen histopatologic din biopsii recoltate de la nivel hepatic.

Nu s-au constatat modificări hematologice, neidentificându-se modificări ale numărului leucocitelor totale, eritrocitelor și trombocitelor la nici unul din loturile studiate comparativ cu lotul control.

În urma examinării anatomopatologice și histopatologice a ficatului au fost identificate modificări macroscopice de steatoză difuză la nivelul ficatului, leziuni

inconstante la indivizi, la lotul tratat cu 0,5ml/kg. Nu au fost constatate modificări macroscopice ale mucoasei gastrice. Microscopic, la 4 săptămâni se observă steatoză în zona perilobulară la toate dozele utilizate, hepatocitele prezentând 2-6 vacuole mici de grăsime și nuclei picnotici, hiperchromi. La 6 săptămâni se observă afectarea întregii arhitectonici hepatice, prezența infiltratului inflamator predominant de neutrofile și mononucleare. La 8 săptămâni s-a constatat creșterea numărului de celule Kupffer și necroză, în special la dozele de 1ml/kg și 2ml/kg, la cea mai mare doză observându-se și mineralizări atipice, cel mai probabil distrofice în urma necrozei. La toate loturile tratate se observă o scădere a numărului total de hepatocite, comparativ cu lotul control, diferență nesemnificativă statistic.

În urma experimentului s-a constatat că cea mai eficientă doză de tetraclorură de carbon ce induce hepatită cronică prin administrare orală la șoareci este reprezentată de doza de 1ml/kg. Doza de 0,5ml/kg duce la apariția unei fibroze într-un timp mai îndelungat, iar doza de 2ml/kg determină leziuni atipice, reprezentate de mineralizări distrofice în urma necrozei. Nu s-a observat apariția ascitei pe parcursul experimentului.

Capitolul 8, intitulat "Evaluarea efectului hepatoprotectiv al extractului de *Origanum vulgare*" a avut ca scop stabilirea dozei letale medii a extractului de oregano (în vederea stabilirii toxicității) și investigarea efectului hepatoprotector al acestui extract.

Pentru evaluarea toxicității extractului s-a folosit tinctură de *Origanum Vulgare* alcool 70° procurat de la Catedra de Farmacognozie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hașigănu", Cluj-Napoca.

Animalele de experiență au fost reprezentate de 55 de șoareci din linia Swiss, masculi și female împărțiți aleatoriu, animalele fiind împărțite în 11 loturi a câte 5 șoareci/lot, dintre care un grup control și un grup martor ce a primit soluție salină. Toate animalele, în afara grupului control au primit o cantitate de 1 ml soluție finală, la 6 loturi administrându-se intraperitoneal, iar la 3 loturi prin administrare orală.

În urma investigării toxicității acute, realizate pe 24h nu s-au observat modificări ale greutății animalelor. Examenul clinic a relevat tahicardie, agitație, toaletaj intens la animalele inoculate intraperitoneal. La administrarea extractului *per os* nu a fost înregistrată mortalitate la nici unul din indivizii testați.

Doza letală medie a extractului hidroalcoolic de *Origanum vulgare* a fost determinată ca fiind 67,5 mg/kg, administrată intraperitoneal. Această doză a fost calculată folosind metoda "probit".

Pentru evaluarea efectului hepatoprotector al extractului de *Origanum vulgare* s-au folosit 78 șoareci din linia Swiss, masculi și femele, împărțiți în 13 loturi a câte 6 șoareci.

În studiul de față pentru inducerea hepatitei s-a folosit doza de 1ml/kg CCl₄, iar pentru evaluarea efectului hepatoprotector al extractului de *Origanum vulgare* s-au folosit trei doze terapeutice 7 mg/kg, 3,5mg/kg, respectiv 1mg/kg, pentru a se observa și efectul dozodependent. Soluțiile terapeutice au fost administrate de 3 ori pe săptămână în zile alternative administrării CCl₄. Sacrificarea indivizilor și recoltarea probelor au avut loc în săptămânile 4, 6, 8 ale experimentului. Au fost efectuate examen hematologic și biochimic sanguin și examen histopatologic din țesut hepatic.

Din punct de vedere hematologic, la 4 săptămâni se constată valori ale leucocitelor în limite normale la toate loturile tratate cu extract de *Origanum vulgare*, comparativ cu lotul 2 care a primit 1 ml/kg CCl₄, care prezintă leucopenie (5,14±1,19). Păstrarea valorilor leucocitare în limite normale poate fi un indicator al efectelor imunostimulatoare ale extractului. Eritocitar, se constată la lotul tratat cu 3,5 mg/kg extract de oregano o scădere a valorilor (RBC: 6,14±0,28, HGB: 95,5±5,3, HCT: 31,79±0,99), comparativ cu celelalte loturi, putând vorbi de o anemie ușoară. La toate loturile se înregistrează valori crescute ale trombocitelor, neîncadrându-se în valorile de referință ale speciei. Există diferențe statistice (p<0.05) între lotul 11, tratat cu extract în doză de 1mg/kg (831±230,4) și lotul 2, netratat, (415,73±311,05).

La 6 săptămâni se constată o scădere a valorilor trombocitelor la loturile tratate cu 7mg/kg (340,75±11,72) și 3,5 mg (323,17±226,18), în comparație cu lotul netratat.

La 8 săptămâni se înregistrează o scădere a valorilor leucocitare la loturile tratate cu 3,5mg/kg și 1mg/kg, comparativ cu valorile normale. Nu există însă diferențe statistic semnificative. Se constată o normalizare a valorilor trombocitare la lotul tratat cu 7mg de extract terapeutic.

Valorile enzimelor hepatice, alaninaminotransferaza, aspartataminotransferaza și gamaglutamiltransferaza, înregistrează o creștere semnificativă la 6 săptămâni, la toate loturile tratate, urmând ca acestea să scadă, la 8 săptămâni revenind în limite normale, indiferent de doza de extract primită. Aceeași modificare numerică se înregistrează și în cazul proteinelor totale și al albuminelor, valorile fiind crescute la 6 săptămâni la toate loturile și scad la 8 săptămâni, indiferent de doza de extract administrată.

Din punct de vedere histopatologic, se constată o varietate considerabilă de leziuni inflamatorii, vasculare și necrotice. La loturile tratate cu extract hidroalcoolic de *Origanum vulgare* în doză de 1mg/kg și 3,5mg/kg, tabloul histopatologic este dominat de necroză hepatică, fibroză portală și steatoză microveziculară; de asemenea, s-a observat prezența infiltratului inflamator predominant de mononucleare. Aceste modificări scad în severitate la sacrificările de la 6 și 8 săptămâni. Doza cea mai eficientă s-a dovedit a fi cea de 7mg/kg, iar leziunile mai severe au fost înregistrate la 6 săptămâni de administrare. La 8 săptămâni, au scăzut numărul mitozelor atipice, a

scăzut în intensitate fibroplazia și necroza hepatică, iar polimorfismul celular și nuclear a fost slab spre moderat.

În concluzie, putem afirma că extractul hidroalcoolic de *Origanum vulgare* are efecte hepatoprotectoare în modelul de hepatită cronică la șoareci, acest efect fiind obținut prin acțiunile antioxidative și antiinflamatoare ale compușilor biologici din extract. Proprietățile compușilor devin sinergice, potențându-se activitatea lor individuală.

Efectele extractului sunt dozodependente, doza de 1 mg/kg având cea mai mică eficiență, iar la doza de 7 mg/kg înregistrându-se cele mai bune efecte.

Capitolul 9, intitulat "Evaluarea efectului hepatoprotector al extractului de *Rosmarinus officinalis*", a urmărit pe de o parte testarea toxicității extractului, observându-se influența temperaturii de evaporare asupra compușilor activi din extractul hidroalcoolic de *Rosmarinus officinalis*, iar pe de altă parte evaluarea eficienței hepatoprotectoare a acestuia.

În vederea realizării primului obiectiv, s-au utilizat ca material biologic 30 de șoareci din linia Swiss, împărțiți în 6 loturi, la care s-a administrat oral extract fitoterapeutic în doze de 100, 250 și 500 mg/kg. Acest extract a fost evaporat la o temperatură de 40°C, și a fost administrat la 3 loturi intraperitoneal, iar la 3 loturi s-a administrat pe cale orală. În urma experimentului s-a constatat că extractul hidroalcoolic nu este toxic.

Pentru evaluarea efectului hepatoprotector al extractului de *Rosmarinus officinalis*, 54 de șoareci Swiss au primit o doză de 1ml/kg CCL₄, apoi au fost împărțiți în loturi a câte 6 indivizi. 3 loturi au primit extract în doză de 500mg/kg și au fost sacrificate la 4, 6 și 8 săptămâni. Alte 3 loturi au primit 250mg/kg de rozmarin și au fost sacrificate la 4, 6 și 8 săptămâni; 3 loturi au primit extract în doză de 100mg/kg, sacrificate la același interval ca și loturile menționate anterior.

Administrarea atât a tetraclorurii cât și a extractului s-a efectuat în zile diferite, de 3 ori pe săptămână, în fiecare săptămână a studiului. În momentul sacrificării au fost recoltate probe de sânge în vederea realizării examenelor hematologic și biochimic și probe de țesut hepatic, pentru examenul histopatologic.

Din punct de vedere hematologic, se înregistrează o scădere a valorilor leucocitare la doza de 500mg/kg, la 4 săptămâni. Leucopenia se constată și la doza de 100 de mg/kg, la 6 și 8 săptămâni, iar la 250mg/kg, la toate loturile leucopenia este constantată pe parcursul experimentului. Valorile eritrocitare înregistrează o scădere la sacrificarea la o lună de administrare în dozele de 250 și 500 de mg/kg, la restul loturilor păstrându-se în parametri fiziologici. S-a înregistrat trombocitoză, valorile plachetelor sanguine fiind crescute pe tot parcursul studiului, indiferent de doza de extract primită sau de momentul sacrificării.

În ceea ce privește examenul biochimic al sângelui, extractul de *Rosmarinus officinalis* a dovedit efecte puțin hepatoprotectoare, valorile transaminazelor serice (ALAT, ASAT) fiind crescute la 6 și la 8 săptămâni la administrarea în doze de 500mg/kg și 250mg/kg; s-a înregistrat o creștere a gamaglutamiltransferazei la loturile tratate cu extract în doză de 500mg/kg și sacrificate la 6 și 8 săptămâni și la lotul tratat cu 250mg și sacrificat la 8 săptămâni. S-a observat o creștere a valorilor albuminelor serice pe tot parcursul studiului, la toate dozele și la sacrificările efectuate la 6 și 8 săptămâni. Aceeași modificare s-a înregistrat și în cazul parametrilor renali: urea și creatinina serice.

În urma efectuării examenului histopatologic, au fost observate modificări patologice variate ca intensitate și distribuție hepatică în funcție de doza de extract administrată și de momentul sacrificării. Astfel, cele mai severe leziuni au fost înregistrate la lotul la care s-a administrat extract în doză de 500mg/kg, iar sacrificarea s-a efectuat la 8 săptămâni, și anume: polimorfism celular și nuclear accentuat, prezența mitozelor multiple și atipice, fibroplazie severă cu formarea de punți fibroase porto-portale, prezența a numeroase canalicule biliare de neoformație și scăderea numărului de hepatocite.

În concluzie, extractul hidroalcoolic de *Rosmarinus officinalis*, la dozele de 250mg/kg și 100 mg/kg, a dovedit un efect slab hepatoprotector, acțiunea hepatoprotectoare datorându-se conținutului de 1,8-cineol. Am putea chiar să emitem ipoteza conform căreia la 8 săptămâni potențază efectele tetraclorurii de carbon, în urma evidențierii leziunilor histologice.

Substanțele active din extractul hidroalcoolic de *Rosmarinus officinalis* prezintă proprietăți puțin sinergice și polivalente.

Concluzii și recomandări

Hepatita indusă prin administrare de tetraclorură de carbon pe cale orală la șoarece reprezintă un model viabil de inducere a hepatitei toxice experimentale prezentând aspecte similare cu cele descrise la șobolan. Se recomandă doza de 1ml/kg tetraclorura de carbon în administrarea per os.

Extractul hidroalcoolic de *Origanum vulgare* prezintă potențial toxic identificându-se o doză letală medie de 67,5 mg/kg.

Extractul hidroalcoolic de *Origanum vulgare* a avut un efect hepatoprotector observându-se o scădere a activității transaminazelor, examenele histologice au confirmat efectul hepatoprotectiv, mai evident în cazul dozei maxime administrate, doza terapeutică de 7 mg/ kg.

Extractul hidroalcoolic de *Rosmarinus officinalis* nu prezintă toxicitate.

Extractul a dovedit un efect hepatoprotector semnificativ, tratamentul a redus nivelul hepatocitolizei. Examane histologice au relevat o intensitate redusă a leziunilor prezente la doza maximă de 500 mg/ kg masă corporală, cu prezența fenomenelor de regenerare. Diferențele în activitatea transaminazelor la loturile tratate cu doze diferite indică un efect dozodependent.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Un element caracteristic tezei este utilizarea șoarecelui ca model pentru studiul hepatitei toxice experimentale, majoritatea studiilor fiind realizate pe șobolan. Rezultatele tezei arată că șoarecele poate reprezenta o alternativă viabilă, acesta având avantajul unui necesar mai mic de compus fitoterapeutic, care este în general laborios de preparat.

Administrarea *per os* a CCl₄ la șoarece reprezintă o noutate, evitându-se efectele iritative locale ale administrării intraperitoneale, pe calea naturală de pătrundere asimilându-se majoritatea toxicelor hepatice. Administrarea orală face ca toxicul să ajungă la ficat pe cale portală, ceea ce concentrează efectul toxic la nivelul ficatului, reducând din efectele toxice sistemice.

Studiul investighează efectul hepatoprotector al extractelor de *Rosmarinus officinalis* și *Origanum vulgare*, provenite din plante cultivate în condițiile geoclimatice ale Transilvaniei, alegerea acestora pentru studiu s-a realizat pe baza compoziției fitochimice, compușii identificați fiind în principal flavonoide, cunoscute pentru efectul lor antioxidant și hepatoprotector.

Aceste investigații se pot constitui într-un punct de plecare pentru obținerea de suplimente nutritive cu efect hepatoprotector cu utilitate pentru medicina omului și veterinară.