RAPORT PRELIMINAR ÎN CADRUL CONTRACTULUI DE CERCETARE ȘI CONSULTANȚĂ

încheiat între S.C. Promedivet SRL ȘI USAMV Cluj-Napoca

Pentru evaluarea *in vitro* a biodisponibilității şi a potențialului imunoactiv al unor fitopreparate produse de S.C. Promedivet SRL, în prima etapă de testare a compușilor cu biodisponibilitate ridicată obținute din plante s-a efectuat evaluarea citotoxicității conform protocolului descris în cele ce urmează.

TESTAREA EFECTULUI CITOTOXIC AL PRODUSELOR SELECTATE PROMEDIVET SRL

Cercetările efectuate pentru stabilirea efectelor unor extracte vegetale asupra sistemului imun se înscriu în cadrul general al unor studii detaliate, începute în anii '70, urmărind descoperirea, caracterizarea şi utilizarea unor compuşi din plante ce conţin elemente imunomodulatoare (imunostimulatoare sau antiinflamatoare), care să asigure o alternativă terapeutică eficace, mai apropiată de biologic decât medicamentele de sinteză.

Invstigaţiile de acest fel au la origine utilizarea empirică a diferitelor plante, sau componente ale lor, în medicina tradiţională, al cărei început se pierde în negura veacurilor. Efectele lor pozitive au asigurat perenitatea preparatelor magistrale până în momentul în care evoluţia civilizaţiei umane a atras după sine dezvoltarea mijloacelor de prelucrare sau de extracţie a principiilor activi. Unele dintre aceste preparate (ceaiuri, decocturi, oţeturi aromate, prişniţe, etc.) au fost preluate şi chiar incluse în farmacopei, fără a suferi vreo modificare secole de-a rândul (Bezenger-Beauquesne şi col., 1990; Bezenger-Beauquesne, 1993). În timp, numărul lor s-a redus, fiind preferate extractele purificate, substanţele active, acolo unde a fost posibilă obţinerea lor. Altele au fost eliminate, demonstrându-li-se eficacitatea terapeutică redusă.

Interesul afectat în ultimul timp preparatelor de extracţie este în conexiune cu problemele majore pe care utilizarea lor le-ar putea rezolva (Clark, 1996; Racz şi col., 1977). Asocierea lor cu preparatele folosite în protocoalele terapeutice clasice ar putea influenţa favorabil capacitatea nespecifică de apărare a organismului, prin efectul imunostimulator complex pe care îl exercită (Devlin şi col., 1991). Aplicarea lor în medicina veterinară ar fi utilă cu atât mai mult, în postura

unor "corectori" ai stărilor de stres şi ca adjuvanţi ai diferitelor vaccinuri, în creşterea rezistenţei faţă de diferite infecţii, pentru restaurarea parţială sau totală a capacităţii de apărare la organisme cu imunodeficite înnăscute. Nu trebuie neglijate nici efectele antiinflamatoare sau desensibilizante pe care unele extracte le pot exercita.

Cu toate că are o tradiţie îndelungată, utilizarea plantelor şi a extractelor obţinute din acestea (Stoian-Ionescu, Savopol , 1977), este departe de a fi un subiect epuizat. Interesul pe care medicina şi biochimia îl acordă acestui domeniu este în continuă creştere şi are ca rezultat introducerea în practică de noi preparate, care dobândesc o importanţă tot mai mare în cadrul terapeuticii moderne.

Materiale şi metode. S-au utilizat linia celulara HFL-1- s-au utilizat 10 dilutii (100µl doza initiala urmat de dilutii seriate (1/10-1/5120) care sa permită conturarea potențialului citotoxic.

Dintre produsele obținute de către Promedivet SRL au fost testate pentru evaluarea efectului citotoxic următoarele: Herba Top Entero Mamif, Herba Top Pneumo Mam, Tinct Herba prim, Tinct herba vital in propilenglicol, Tinctura rumdigestin herba, Trichom mamifer, Tinct herba top broncho, Herba top digest, Tinct herba sol in propilenglicol, Herba top entero pui, Coccidioza mamifer, Tinct herba top trichomonas pasari, Tinct herba top coccidia pasari, Herba top imuno, Herba top pneumo pui.

Testarile au fost efectuate pe placi de 96 de godeuri, concentratia de celule a liniei HFL-1 a fost de $1x10^5$. După 24 de ore de incubare, cultura celulară a fost tratată cu diluţii succesive ale produselor selectate, respectiv după 24 de ore de expunere la compuşii din plante s-a determinat viabilitatea celulară prin testul MTT.

Testul MTT are la baza detectarea reducerii unui compus chimic, denumit MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] de către dehidrogenaza mitocondrială, cu formarea formazanului, un produs de culoare albastră. Procesul reflectă funcţionarea normală a mitocondriilor şi implicit viabilitatea celulară (Yousefzadi şi col., 2011). Dupa îndepărtarea mediului de cultură, celulele au fost tratate cu 100 µl soluţie MTT (0,5 mg MTT/ ml/tampon /HBSS) şi incubate timp de 2 h la 37°C. Ulterior, s-a eliminat reactivul MTT şi s-au repartizat în fiecare godeu câte 100µl dimetilsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich), care are rolul de a solubiliza particulele de formazan, după care s-a realizat citirea spectrofotometrică a

densităţilor optice cu un cititor de microplăci pentru lungimea de undă de 450 nm (Sumal PE2, Carl Zeiss, Jena.

Rezultatele obţinute la testul MTT (densităţi optice pentru fiecare diluţie şi respectiv produs vegetal) au fost prelucrate sub formă de valoare medie ± deviaţie standard şi prezentate ulterior ca procent de viabilitate (%) obţinut prin raportarea valorii medii a densităţilor optice înregistrate pentru fiecare concentraţie testată la densitatea optică medie determinată pentru martor (celulele netratate, cultivate în aceleaşi condiţii standard):

% viabilitate =(DO medie probă/DO medie martor) x 100

Intensitatea exprimării potenţialului citotoxic s-a apreciat prin compararea statistică a procentelor de viabilitate obţinute pentru fiecare produs vegetal, respectiv fiecare diluţie, la 100% (% de viabilitate al martorului).

Rezultate şi discuţii. Marea majoritate a studiilor asupra efectelor extractelor vegetale sunt reprezentate de studii de citotoxicitate, în scopul utilizării acestor extracte în terapia cancerului (Farkhondeh şi col., 2013, Kinghorn, 2005, Wink şi col., 2005, Hashemi şi col., 2011, Sahranavard şi col., 2009, Freshney, 1994, Mosmann, 1983).

Există studii care demonstrează că extractele vegetale au efecte selective asupra celulelor HeLa şi de rabdomiosarcom comparativ cu celulele normale (Ad'hiah şi col., 2013), similar altor lucrari din literatură legate de efectul selectiv tumoricid al produselor naturale, fără lezarea celulelor (Griffin şi col., 2007). In acest context, Weber (2009) a demonstrat că metaboliţii secundari flavonoidele din *Scutellaria* nu sunt doar citostatici dar şi citotoxici faţă de diferite linii celulare provenite de la om şi inhibă *in vitro* creşterea celulară iar *in vivo* inhibă creşterea tumorilor, dar cel mai important nu se observă deloc sau sunt foarte reduse efectele negative ale acestor flavonoide faţă de celulele epiteliale sau din sângele periferic respective celulele mieloide.

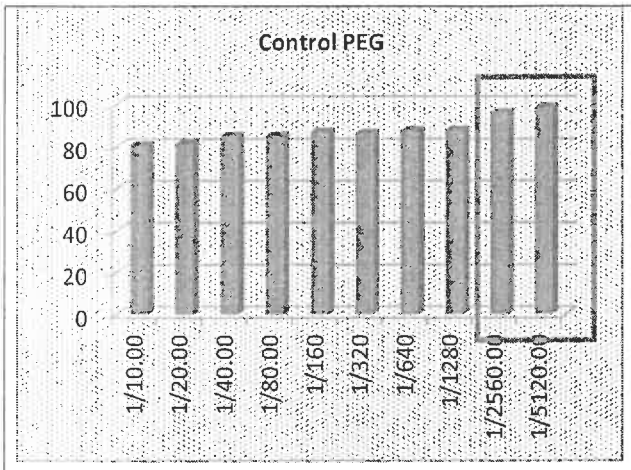
Produsele testate nu au prezentat efect citotoxic semnificativ în afară de 2 destinate tratamentului trichomonozei la mamifere si la pasari: Tinctura Herba Top Trichomonas păsări şi Trichomonas mamifer, restul produselor mai ales în dilutii mai mari au prezentat efecect favorabil asupra viabilităţii celulare, majoritatea diluţiilor au determinat procente de viabilitate mai mari de 95-100%, ceea ce reflectă absenţa potenţialului citotoxic. La diluţiile 1/5120 s-au

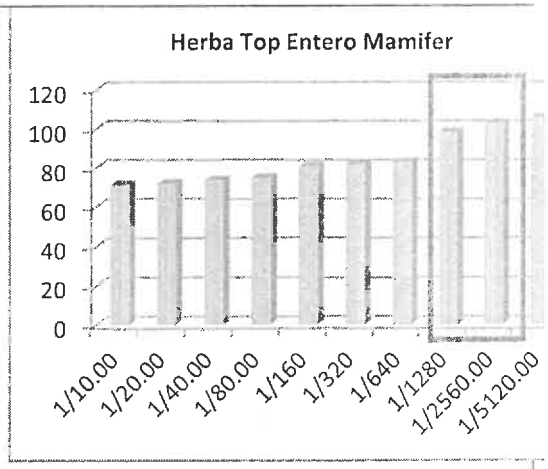
înregistrat şi efect de stimulare asupra metabolismului celular (Tinctura rumdigestin herba, Tinct Herba prim, Herba Top Entero Mamif, Tinct herba top broncho, Trichomonas mamifer herba top entero pui, Herba top imuno).

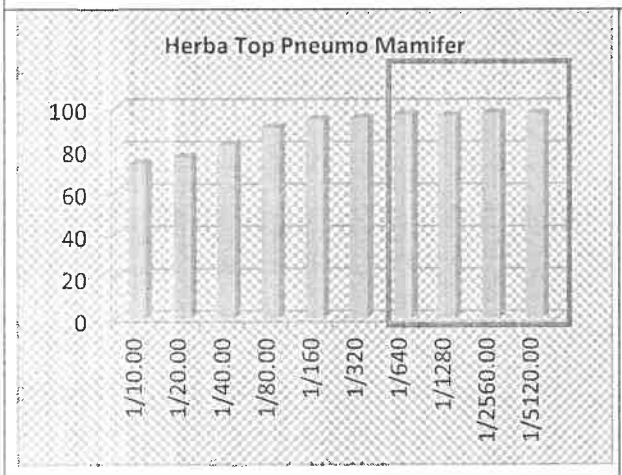
Rezultatele legate de testarea efectului citotoxic al propilenglicolului ca martor vehicul pentru principiile active din plante confirmă datele din literatură (Morshed şi col., 1998), conform cărora propilenglicolul dezvoltă un efect citotoxic redus asupra celulelor din tubii uriniferi atunci când este folosit ca vehicul pentru medicamente în concentraţii de peste 50 mM.

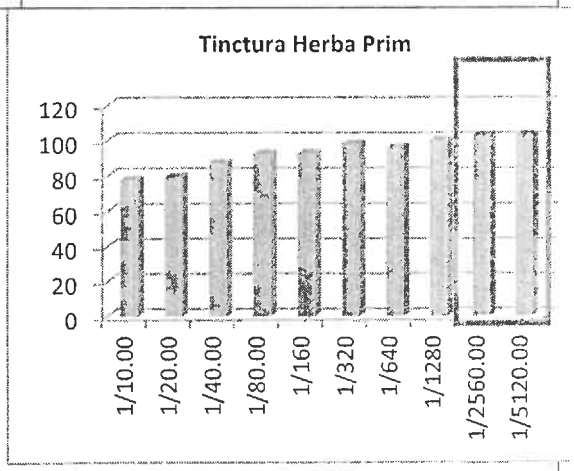
Datorită amestecului de principii active din cele două produse testate este dificil de spus care dintre componente exercită efectele toxice – o testare individual a fiecărui component în parte ar putea fi utilă în orientarea ulterioară a posologiei.

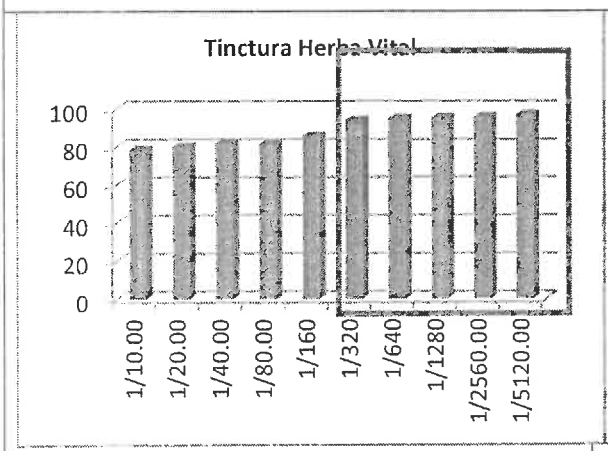
Efectele stimulatoare a creşterii celulare observate la majoritate compuşilor pare similar unui efcet homeopat sugerând posibilitatea utilizării acestora în alte direcţii, de ex. Imunostimulare în doze extrem de reduse.

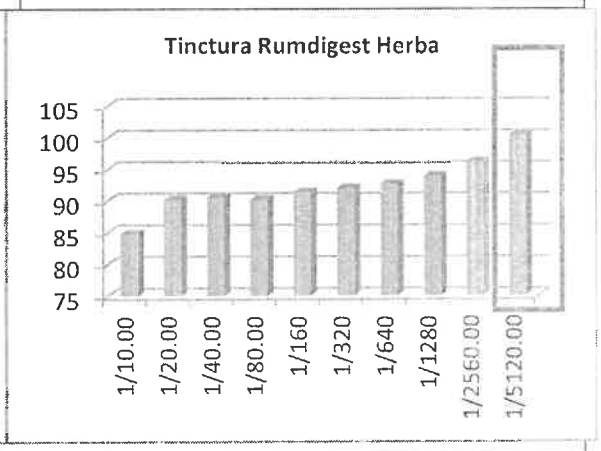

Control PEG
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

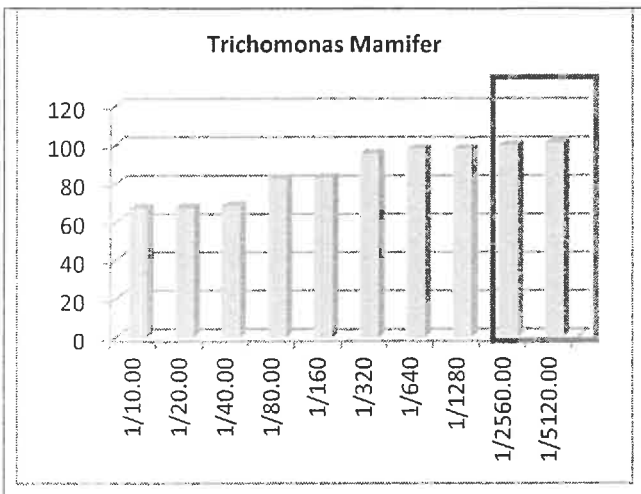

Herba Top Entero Mamifer
120
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

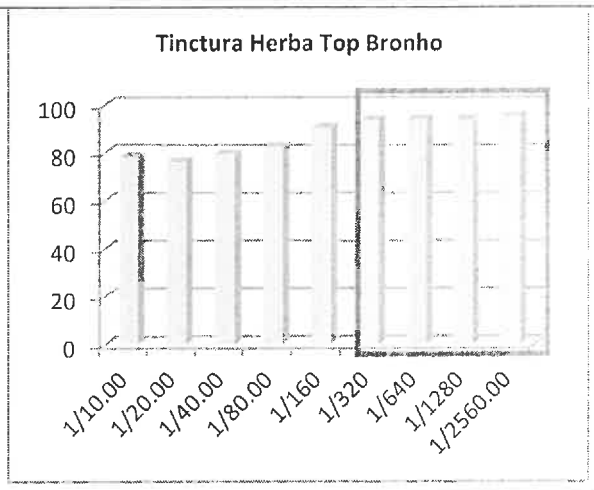

Herba Top Pneumo Mamifer
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

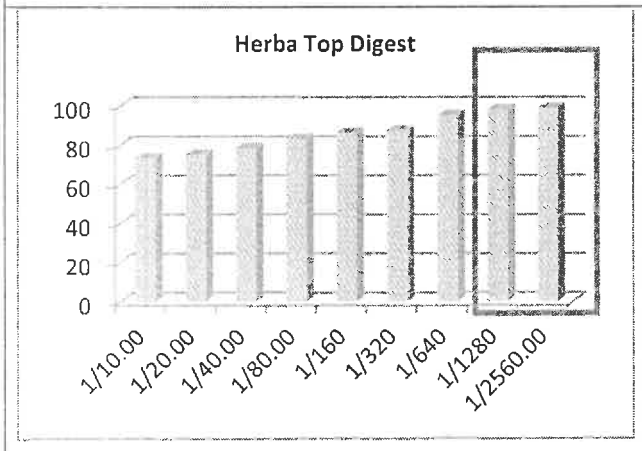

Tinctura Herba Prim
120
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

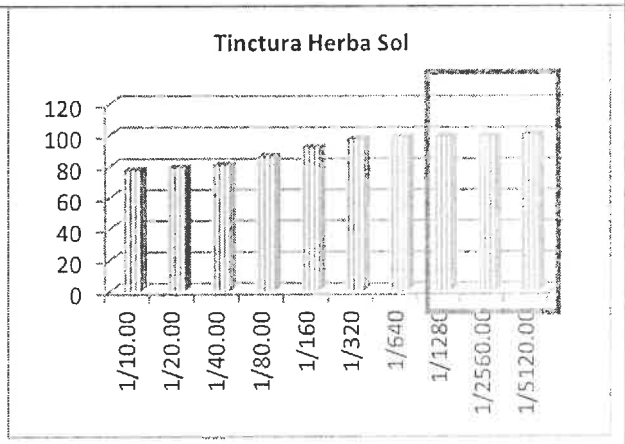

Tinctura Herba Vital
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

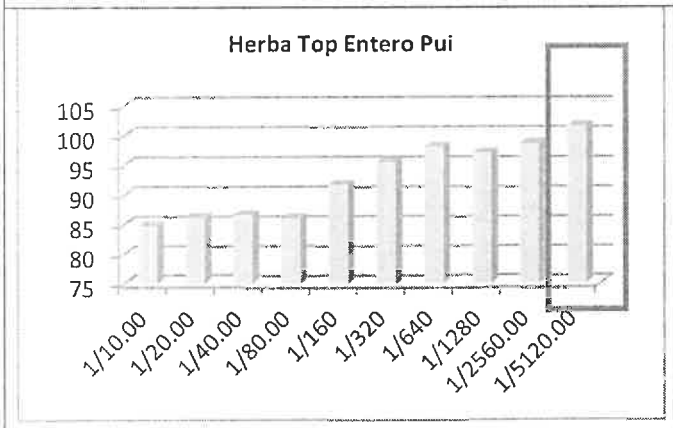

Tinctura Rumdigest Herba
105
100
95
90
85
80
75
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

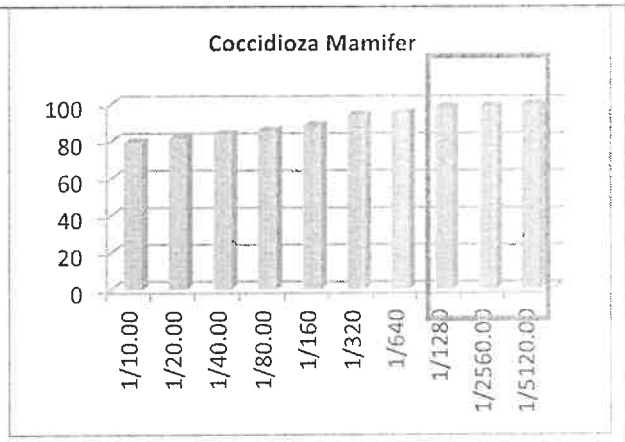

Trichomonas Mamifer
120
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

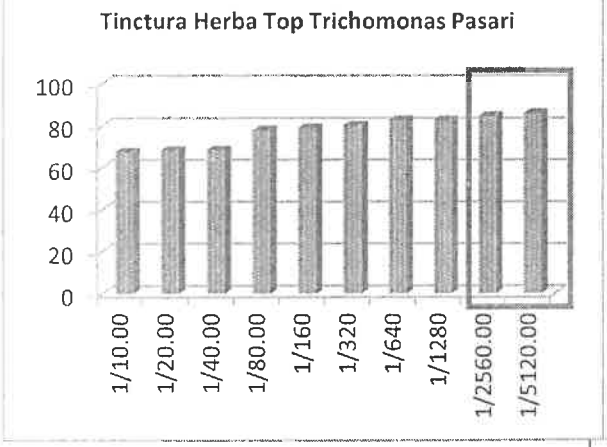

Tinctura Herba Top Bronho
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00

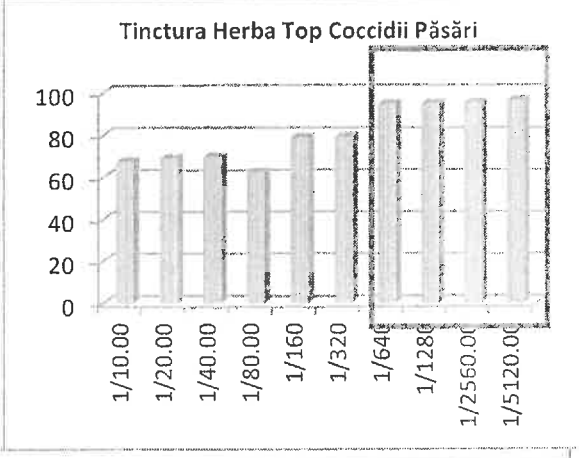

Herba Top Digest
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00

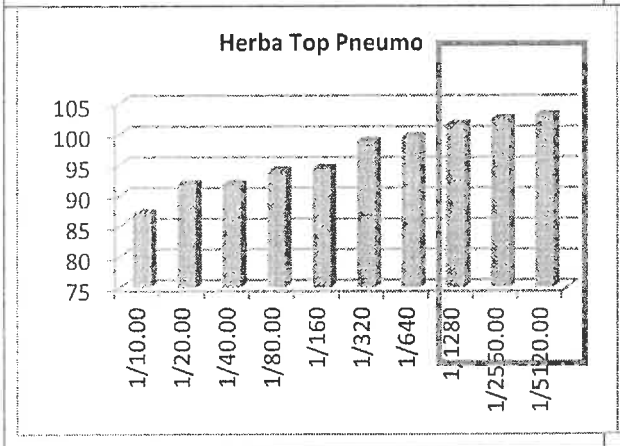

Tinctura Herba Sol
120
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

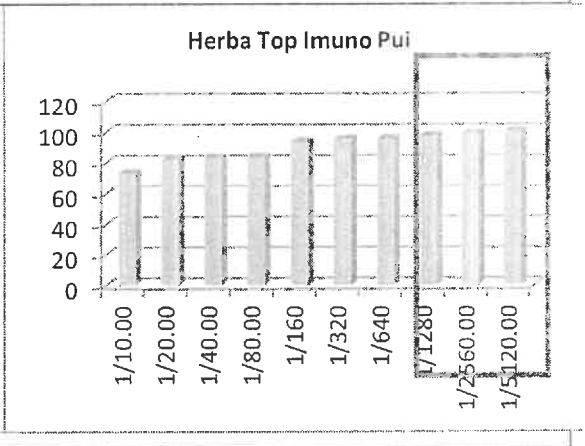

Herba Top Entero Pui
105
100
95
90
85
80
75
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00


Coccidioza Mamifer
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00


Tinctura Herba Top Trichomonas Pasari
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00


Tinctura Herba Top Coccidii Păsări
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00


Herba Top Pneumo
105
100
95
90
85
80
75
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00


Herba Top Imuno Pui
120
100
80
60
40
20
0
1/10.00
1/20.00
1/40.00
1/80.00
1/160
1/320
1/640
1/1280
1/2560.00
1/5120.00

Bibliografie

1. Yousefzadi M, Mirjalili MH, Alnajar N, Zeinali A, Parsa M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of Dorema ammoniacum D. Don. fruit from Iran. J. Serb. Chem. Soc. 2011; 76: 1-7.
2. Bezange – Beauquesne, L. et al. – 1990 - Les plantes medicinales des regions temperee, Malonie, Ed. Paris.
3. Bezanger – Beauquesne, L. – 1993 – Nouveautes en phytotherapie, Plantes medicinales at phytotherapie, 26 (3), 234 – 264.
4. Racz K., Atilla, E., Peter, M. - 1977 – Extracte farmaceutice vegetale, 69-114.
5. Clark A.M. - 1996 - Natural products as a resource for new drugs, Pharm.res., 13:1133-44.
6. Devlin, J.P., Carter, C., Homon, C.A. – 1991 – High Capacity Screening Natural Products as Immune regulators, Economic and Medicinal Plant Research, vol. V, Academic Press, London.
7. Stoian-Ionescu, S.T., Savopol, E. - 1977 - Extracte farmaceutice vegetale, Ed.medicală, Bucureşti.
8. Farkhondeh Nemati, Abbas Ali Dehpouri, Bahman Eslami, Vahid Mahdavi, Sepideh Cytotoxic Properties of Some Medicinal Plant Extracts from Mazandaran, Iran, Mirzanejad 1 Iranian Red Crescent Medical Journal. 2013 November; 15(11): e8871.
9. Kinghorn A. Plant Secondary Metabolites as Potential Anticancer Agents and Cancer Chemopreventives. *Molecules.* 2000;5(3):285–8.
10. Wink M., Alfermann A. W., Franke R., Wetterauer B., Distl M., Windhovel J., Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resources.* 2005;3(2):90–100.
11. Hashemi SA, Abediankenari S, Ghasemi M, Azadbakht M, Yousefzadeh Y, Dehpour AA. The Effect of Fig Tree Latex (Ficus carica) on Stomach Cancer Line. *Iran Red Crescent Med J.* 2011;13(4):272–5.
12. Sahranavard S., Naghibi F., Mosaddegh M., Davari E., CheahYew H., NoorRain A. Cytotoxic activity of some medicinal plants from Iran. *J Ethnopharmacol.* 2009;111:657–66.
13. Freshney R. *Culture of animal cells: a manual of basic technique.*New York: Wiley; 1994.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983; 65(1–2):55–63.
15. Griffin, C., Sharda, N., Sood, D., Nair, J., Pandey, S., 2007. Selective cytotoxicity of pancratistin-related natural Amaryllidaceae alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. Cancer Cell Int. 7, 10–11.
16. Weber, M.L., 2009. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. Cancer Treat. Rev. 35, 57–68.
17. Ad'hiah A. H., Al-Bederi O. N.H., Al-Sammarrae K.W. Cytotoxic effects of *Agrimonia eupatoria* L. against cancer cell lines in vitro Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences (2013) 14, 87–92
18. Morshed KM, Jain SK, McMartin KE. Propylene glycol-mediated cell injury in a primary culture of human proximal tubule cells. Toxicol Sci. 1998;46(2):410-7.

	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
CTRL PEG	0.525	0.529	0.555	0.555	0.566	0.562	0.571	0.572	0.625	0.642
Viabilitatea%	80.67	81.30	85.30	85.30	86.99	86.37	87.76	87.91	96.06	98.67
Herba Top Entero Mamif	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.465	0.47	0.481	0.489	0.527	0.536	0.541	0.642	0.67	0.69
Viabilitatea%	71.47	72.23	73.92	75.15	80.99	82.38	83.15	98.67	102.97	106.05
Herba Top Pneumo Mam	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.477	0.496	0.533	0.587	0.612	0.616	0.627	0.624	0.632	0.631
Viabilitatea%	73.31	76.23	81.92	90.22	94.06	94.67	96.36	95.90	97.13	96.98
Tinct Herba prim	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.505	0.518	0.566	0.602	0.603	0.637	0.622	0.651	0.67	0.671
Viabilitatea%	77.61	79.61	86.99	92.52	92.67	97.90	95.59	100.05	102.97	103.13
Tinct herba vital in propilenglicol	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.512	0.521	0.534	0.53	0.557	0.611	0.618	0.62	0.622	0.631
Viabilitatea%	78.69	80.07	82.07	81.45	85.60	93.90	94.98	95.29	95.59	96.98
Tinctura rumdigestin herba	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.552	0.587	0.589	0.592	0.595	0.599	0.603	0.611	0.631	0.654
Viabilitatea%	84.84	90.22	90.52	90.24	91.44	92.06	92.67	93.90	96.19	100.51
Trichom mamifer	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.437	0.439	0.445	0.537	0.54	0.621	0.638	0.638	0.651	0.659
Viabilitatea%	67.16189	67.46926	68.39139	82.53074	82.9918	95.44057	98.05328	98.05328	100.0512	101.2807
Tinct herba top	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120

broncho										
OD 450	0.511	0.498	0.518	0.539	0.59	0.611	0.612	0.611	0.621	0.625
Viabilitatea%	78.53484	76.53689	79.61066	82.83811	90.67623	93.90369	94.05738	93.90369	95.44057	104.1067
Herba top digest	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.478	0.49	0.511	0.542	0.562	0.569	0.621	0.64	0.645	0.65
Viabilitatea%	73.46311	75.30738	78.53484	83.29918	86.37295	87.44877	95.44057	98.36066	99.13	100.1026
Tinct herba sol in propilenglicol	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.502	0.511	0.524	0.56	0.597	0.631	0.638	0.642	0.642	0.651
Viabilitatea%	77.15164	78.53484	80.53279	86.06557	91.75205	96.97746	98.05328	98.66803	98.66803	100.0512
Herba top entero pui	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.552	0.561	0.564	0.56	0.597	0.621	0.638	0.632	0.642	0.661
Viabilitatea%	84.83607	86.21926	86.68033	86.06557	91.75205	95.44057	98.05328	97.13115	98.66803	101.5881
Coccidioza mamifer	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.517	0.529	0.545	0.557	0.574	0.611	0.618	0.638	0.641	0.649
Viabilitatea%	79.45697	81.30123	83.76025	85.60451	88.21721	93.90369	94.97951	98.05328	98.51434	99.74385
Tinct herba top trichomonas pasari	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.439	0.444	0.445	0.507	0.514	0.521	0.538	0.538	0.551	0.559
Viabilitatea%	67.46926	68.2377	68.39139	77.92008	78.9959	80.07172	82.68443	82.68443	84.68238	85.91189
Tinct herba top coccid. pasari	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.444	0.449	0.455	0.407	0.514	0.516	0.618	0.619	0.621	0.629
Viabilitatea%	67.68293	69.00615	69.92828	62.55123	78.9959	79.30328	94.97951	95.1332	95.44057	96.67008
Herba top imuno	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.567	0.598	0.598	0.612	0.615	0.643	0.648	0.661	0.667	0.671

Viabilitatea%	87.14139	91.90574	91.90574	94.05738	94.51844	98.82172	99.59016	101.5881	102.5102	103.125
Herba top pneumo pui	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
OD 450	0.478	0.532	0.542	0.544	0.61	0.621	0.622	0.634	0.643	0.655
Viabilitatea%	73.46311	81.7623	83.29918	83.60656	93.75	95.44057	95.59426	97.43852	98.82172	100.666