

Revista Farmaceutică a Moldovei

Fondată în anul 1993

ISSN 1812-5077



RFM, vol-45, Nr. 1, 2021



MANAGEMENT FARMACEUTIC
ȘI FARMACIE SOCIALĂ
*PHARMACEUTICAL MANAGEMENT
AND SOCIAL PHARMACY*

CHIMIE FARMACEUTICĂ
ȘI CONTROLUL MEDICAMENTULUI
*PHARMACEUTICAL CHEMISTRY
AND CONTROL OF DRUG*

TEHNOLOGIE FARMACEUTICĂ
PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

FARMACOLOGIE ȘI FARMACIE CLINICĂ
PHARMACOLOGY AND CLINICAL PHARMACY

STUDIUL PLANTELOR MEDICINALE
THE STUDY OF MEDICINAL PLANTS

ANIVERSĂRI
ANNIVERSARY



Revista Farmaceutică a Moldovei

ISSN 1812-5077



Fondată în anul 1993

RFM, vol-45, Nr. 1, 2021

PUBLICAȚIE ȘTIINȚIFICO-PRACTICĂ

Revista Asociației Farmaciștilor din Republica Moldova

The Journal of the Association of Pharmacists of Republic of Moldova

Журнал Ассоциации Фармацевтов Республики Молдова

COLEGIUL DE REDACȚIE

REDACTOR ȘEF:

SAFTA Vladimir, dr. hab. șt. farm., profesor universitar, Catedra de farmacie socială „Vasile Procopișin”, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

REDACTOR ȘEF-ADJUNCT:

ADAUJI Stela, dr. șt. farm., conferențiar universitar, șef Catedră de farmacie socială „Vasile Procopișin”, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

SECRETAR/ENGLISH CONSULTANT:

CHEPTANARI-BÎRTA Nicoleta, asistent universitar, Catedra de farmacie socială „Vasile Procopișin”, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

MEMBRII COLEGIULUI DE REDACȚIE

BRUMĂREL Mihail, dr. șt. farm., conferențiar universitar, Catedra de farmacie socială „Vasile Procopișin”, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

CARATA Ana, dr. farm., profesor universitar, București, România

CIOBANU Nicolae, dr. șt. farm., conferențiar universitar, decanul Facultății de Farmacie, șef Catedră de tehnologie a medicamentelor, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

COJOCARU-TOMA Maria, dr. șt. farm., conferențiar universitar, Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

CORNEICIUC Aurel, președintele Asociația Farmaciștilor din mun. Chișinău

CRÎȘAN Gianina Cristina, dr. farm., profesor universitar, decanul Facultății de Farmacie, șef Disciplină Botanică farmaceutică, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, România

DIUG Eugen, dr. hab. șt. farm., profesor universitar, Catedra de tehnologie a medicamentelor, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

GOLYAK Natalia, dr. șt. farm., conferențiar universitar, șef Catedră Tehnologie farmaceutică, Universitatea de Stat de Medicină din Belarus

GONCIAR Veaceslav, dr. hab. șt. med., profesor universitar, șef Catedră de farmacologie și farmacie clinică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

GURINA Natalia, dr. hab. șt. biol., profesor universitar, decanul Facultății de Farmacie, Universitatea de Stat de Medicină din Belarus

LUPU Mihail, dr. șt. farm., conferențiar universitar, Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale

MUNTEAN Daniela-Lucia, dr. farm., profesor universitar, decanul Facultății de Farmacie, șef Disciplină Chimie analitică și Analiza medicamentului, Universitatea de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie „George Emil Palade” din Târgu Mureș, România

NEGREȘ Simona, dr. farm., profesor universitar, șef Disciplină Farmacologie și Farmacie Clinică, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, România

NISTREANU Anatolie, dr. șt. farm., profesor universitar, Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

PROFIRE Lenuța, dr. farm., profesor universitar, decanul Facultății de Farmacie, șef Disciplină Chimie farmaceutică, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași, România

SOROCEANU Valentina, dr. farm., profesor universitar, șef Disciplină Management, Marketing și Legislație Farmaceutică, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, România

SURIKOVA Iryna, dr. șt. farm., Catedra de Farmacie socială, Universitatea Națională de Farmacie din Harkov, Ucraina

TAEREL Adriana-Elena, dr. farm., profesor universitar, Disciplină Management, Marketing și Legislație Farmaceutică, prodecan Cooperare Europeană și Internațională Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, România

UNCU Livia, dr. șt. farm., conferențiar universitar, Catedra de chimie farmaceutică și toxicologică, prodecanul Facultății de Farmacie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

VALICA Vladimir, dr. hab. șt. farm., profesor universitar, șef Catedră de chimie farmaceutică și toxicologică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

ZGÎRCU Ion, Președintele Asociației Farmaciștilor din Republica Moldova

CUPRINS

CONTENT

MANAGEMENT FARMACEUTIC ȘI FARMACIE SOCIALĂ	4	PHARMACEUTICAL MANAGEMENT AND SOCIAL PHARMACY
Stela Adauji, Vladimir Safta Esența abordării sistemice și evidențierea problemelor sistemului farmaceutic	4	Stela Adauji, Vladimir Safta The essence of the systemic approach and the highlighting of pharmaceutical system problems
CHIMIE FARMACEUTICĂ ȘI CONTROLUL MEDICAMENTULUI	8	PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND CONTROL OF DRUG
Maria Drumea, Vladimir Valica, Livia Uncu, Fliur Macaev Nitrotriazon – un nou derivat nesaturat al 1,2,4 - triazolului cu acțiune antifungică. Relație structură – activitate	8	Maria Drumea, Vladimir Valica, Livia Uncu, Fliur Macaev Nitrotriazon – a new unsaturated derivative of 1,2,4-triazole with antifungal action. Structure- activity relationship
Natalia Sucman, Livia Uncu, Valeriu Crudu, Nelly Ciobanu, Alexandru Codreanu, Vladimir Valica, Fliur Macaev Studiul activității antituberculoase a particulelor de ciclodextrine încărcate cu juglonă	12	Natalia Sucman, Livia Uncu, Valeriu Crudu, Nelly Ciobanu, Alexandru Codreanu, Vladimir Valica, Fliur Macaev Study of antituberculosis activity of the cyclodextrins particles loaded with juglone
Valeria Grigoriev, Vladimir Valica, Radu Cazacu, Vasile Cazacu, Liliana Rusnac Perspective de cercetare și fabricație a biosimi- larului somatropina în Republica Moldova	16	Valeria Grigoriev, Vladimir Valica, Radu Cazacu, Vasile Cazacu, Liliana Rusnac Perspectives of RHGH biosimilar research and manufacturing in Republic of Moldova
Ecaterina Mazur, Vladimir Valica, Simona Negreș, Elena Donici, Sergiu Parii, Livia Uncu Evaluarea comparativă a biodisponibilității pre- paratelor perorale cu conținut de potasiu și spi- ronolactonă	21	Ecaterina Mazur, Vladimir Valica, Simona Negreș, Elena Donici, Sergiu Parii, Livia Uncu Comparative evaluation of the bioavailability for oral medicines with potassium and spironolactone
TEHNOLOGIE FARMACEUTICĂ	27	PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY
S. Tincu, F. Macaev, D. S. Dezmirean, N.Eremia, A. Znacovan, A. Botnaru Influența unor factori externi asupra compoziției și eficienței terapeutice a propolisului	27	S. Tincu, F. Macaev, D. S. Dezmirean, N.Eremia, A. Znacovan, A. Botnaru Influence of external factors on the composition and therapeutic efficiency of propolis
Katya Alhalabi, Abdalah Halabi, Alexandru Znacovan Formularea și studiul comprimatelor retard cu teofilină	30	Katya Alhalabi, Abdalah Halabi, Alexandru Znacovan Formulation and study of theophiline delayed tablets
FARMACOLOGIE ȘI FARMACIE CLINICĂ	33	PHARMACOLOGY AND CLINICAL PHARMACY
Georgel Bacinschi, Veaceslav Gonciar, Elena Bodrug Particularitățile farmacodinamice, farmacogenetice și farmacocinetice ale carvedilolului	33	Georgel Bacinschi, Veaceslav Gonciar, Elena Bodrug Pharmacodynamic, pharmacogenetic and pharmacokinetic properties of carvedilol
Andrei Bacinschi, Veaceslav Gonciar, Corina Scutari Aspecte ale utilizării blocantelor receptorilor angiotensinici în glaucom	38	Andrei Bacinschi, Veaceslav Gonciar, Corina Scutari Aspects of the utilisation of angiotensin receptor blockers in glaucoma

STUDIUL PLANTELOR MEDICINALE 42		THE STUDY OF MEDICINAL PLANTS	
Sviatlana Sheuchuk, Natalia Gurina Activitatea gastroprotectivă a părților aeriene de <i>Epilobium angustifolium</i>	42	Sviatlana Sheuchuk, Natalia Gurina Gastroprotective activity of <i>Epilobium</i> <i>angustifolium</i> herb	42
Angelica Ohindovschi, Maria Cojocaru-Toma, Tatiana Calalb Compoziția chimică a speciilor <i>Galium verum</i> L. și <i>G. mollugo</i> L.	46	Angelica Ohindovschi, Maria Cojocaru-Toma, Tatiana Calalb Chemical composition of <i>Galium verum</i> L. and <i>G.</i> <i>mollugo</i> L.	46
Natalia Golyak, Svetlana Malchenkova Profilul de disoluție in vitro al matricelor transdermale emplastruri cu ibuprofen utilizând metoda Padel	52	Natalia Golyak, Svetlana Malchenkova In vitro dissolution profile of transdermal matrix ibuprofen patches using Paddle method	52
Anna Benea Efectele farmacologice ale compușilor chimici din specia <i>Hypericum</i> <i>perforatum</i> L.	55	Anna Benea Pharmacological effects of chemical compounds of <i>Hypericum</i> <i>perforatum</i> L.	55
Viktoryia Tsiarletsкая, Lukashou Raman Dinamica acumulării compușilor fenolici în rădăcini, frunze și flori de Păpădie	58	Viktoryia Tsiarletsкая, Lukashou Raman Dynamics of the accumulation of phenolic compounds in <i>Taraxacum officinale</i> roots, leaves and flowers	58
Dzianis Novash, Raman Lukashou Activitatea antioxidantă a extractelor din părți aeriene de <i>Echinacea purpurie</i> , în funcție de compoziția extragentului	62	Dzianis Novash, Raman Lukashou Antioxidant activity of purple <i>Coneflower</i> herb extracts, depending on the composition of the extragent	62
Ilya Soltan, Raman Lukashou Capacitatea penetrantă a flavolignanilor din <i>Silybum Marianum</i> in vitro	67	Ilya Soltan, Raman Lukashou The penetrating ability of <i>Silybum Marianum</i> flavolignans in vitro	67
Karolina Karchevskaya, Raman Lukashou Determinarea cantitativă a flavonoidelor din părți aeriene de Coadă șoricelului	72	Karolina Karchevskaya, Raman Lukashou Flavonoids quantification of Yarrow herb	72
Nadezhda Krautsova-Kukhmar, Natallia Shakavets, Olga Mushkina, Tatyana Kidyasova Fitoterapia în tratamentul gingivitei	75	Nadezhda Krautsova-Kukhmar, Natallia Shakavets, Olga Mushkina, Tatyana Kidyasova Phytotherapy in treatment of gingivitis	75
Adina Organ, Vladilena Ghîrbu, Cojocaru-Toma Maria, Veaceslav Kulcițki Potențialul terapeutic și efecte preventive ale metabolitelor triterpenice secundare majoritare din <i>Lavandula angustifolia</i>	79	Adina Organ, Vladilena Ghîrbu, Cojocaru-Toma Maria, Veaceslav Kulcițki Therapeutic potential and preventive effects of major triterpenic secondary metabolites from <i>Lavandula angustifolia</i>	79
Anna Benea Compoziția chimică a speciilor genului <i>Hypericum</i> L.	82	Anna Benea Chemical composition of species of the genus <i>Hypericum</i> L.	82
ANIVERSĂRI 85		ANNIVERSARY	
Eugen Diug - profesor, savant, pedagog și farmacist ilustru	85	Eugen Diug - profesor, scientist, pedagogue and illustrious pharmacist	85

Articolele publicate în Revistă
reflectă punctele de vedere ale autorilor și coautorilor,
care sunt responsabili pentru conținutul și redactarea lor

MANAGEMENT FARMACEUTIC ȘI FARMACIE SOCIALĂ

CZU: 615(478)

ESENȚA ABORDĂRII SISTEMICE
ȘI EVIDENȚIEREA PROBLEMELOR
SISTEMULUI FARMACEUTIC

THE ESSENCE OF THE SYSTEMIC
APPROACH AND THE HIGHLIGHTING OF
PHARMACEUTICAL SYSTEM PROBLEMS

Stela Adauji, Vladimir Safta

Catedra de farmacie socială „Vasile Procopișin”,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

Autor corespondent: stela.adauji@usmf.md

Summary. The article presents the synthesis of the basic characteristics of the systemic methodology and highlights the place, essence and practical applicability of the systemic approach. Based on the principles of the systemic approach, a number of problems faced today by the pharmaceutical system of the Republic of Moldova have been highlighted. The highlighted issues can serve as strategic research directions in order to strengthen the functionality of the pharmaceutical sector aimed at obtaining benefits for human health.

Keywords: system, systemic approach, pharmaceutical system, problems.

Rezumat. În articol se prezintă sinteza caracteristicilor de bază ale metodologiei sistemice și se evidențiază locul, esența și aplicabilitatea practică a abordării sistemice. În temeiul principiilor abordării sistemice au fost scoase în evidență un șir de probleme cu care se confruntă astăzi sistemul farmaceutic al Republicii Moldova. Problemele evidențiate pot servi ca direcții strategice de cercetare în scopul fortificării funcționalității sectorului farmaceutic orientate spre obținerea beneficiilor pentru sănătatea omului.

Cuvinte cheie: sistem, abordare sistemică, sistem farmaceutic, probleme.

INTRODUCERE

Încă în a.1994, liderii managementului pe atunci M. Meskon, M. Albert și F. Hedouri considerau că în baza abordării sistemice vor fi sintetizate noi cunoștințe și teorii, care se vor elabora și se vor manifesta în viitor [9]. Ținând cont de domeniile în cercetarea cărora astăzi se aplică abordarea sistemică, se poate afirma cu certitudine că acel viitor, la care se refereau cei trei autori menționați mai sus, a sosit. Atingerea acelor pronosticuri se datorează, că tot mai mulți cercetători contemporani conștientizează că orice obiect de studiu care reprezintă sistem sau parte componentă, element al unui sistem, poate și trebuie să se bazeze pe abordarea sistemică.

SCOPUL LUCRĂRII

Analiza sistemică a esenței abordării sistemice, principalelor ei caracteristici și, în temeiul principiilor acestei metodologii a științei – evidențierea unor probleme ale sistemului farmaceutic al Republicii Moldova.

MATERIAL ȘI METODE

Drept material a servit literatura de specialitate, legislația farmaceutică a Republicii Moldova și conținutul sistemului farmaceutic, iar în calitate de metode au fost

utilizate cea de content-analiză, analiza istorică, analiza logică, decompoziția, analiza funcționalității.

REZULTATE

Fondatori ai teoriei generale a sistemelor (TGS) și a abordării sistemice sunt considerați Al. Al. Bogdanov (1873-1928), care a pus temelia teoriei generale a organizării ca știință despre reorganizarea structurală a sistemelor și Karl Ludwig von Bertalanffy (1901-1972), biolog austriac, care, în a. 1920, pentru prima dată în istoria științei a inițiat cercetarea „*studiul organismelor ca sisteme*”. La dezvoltarea TGS și a conceptului abordării sistemice și-au adus aportul un șir de savanți (aa. 30-90 ai sec XX), inclusiv: A. Bogdanov, G. Saimon, P. Druker, N. Viner, A. Ceandler, I. Blauberg, E. Iudin, A. Sala, R. Feijin, V. Sadovski, C. Churchman, P. Kaliu, P. Glușcov *et al.* În Republica Moldova, cercetări cu aplicarea principiilor abordării sistemice au fost realizate pentru prima dată de către V.I. Kant și V.I. Procopișin (1973), V.N. Safta (1980, 1998) [5, 10, 12, 16, 22, 23].

În figura 1 se demonstrează locul abordării sistemice și a altor noțiuni utilizate în cercetări ce se realizează cu aplicarea metodologiei sistemice [2, 3, 8, 11, 21, 22].



Figura 1. Locul abordării sistemice (sistemismului) în metodologia sistemică

După cum se observă din această schemă, abordarea sistemică, de rând cu alte noțiuni caracteristice metodologiei sistemice, este parte componentă a acestei metodologii. Trebuie menționat faptul că metodologia sistemică conține două părți componente de bază, și anume: TGS și *Filozofia sistemelor*. Afară de aceasta, în cercetarea sistemelor se folosesc pe larg astfel de noțiuni ca: *Analiza sistemică*, *Principiul sistemicității*, *Analiza factorială*, *Cercetare sistemică*, *Analiza sistemică-funcțională* și altele. Aceasta se referă la teorie. Cât privește aplicabilitatea practică, toate aceste noțiuni, inclusiv *Metodologia sistemică*, *TGS*, *Filozofia sistemelor* și altele, sunt înglobate sau chiar substituite de noțiunea **ABORDARE SISTEMICĂ** sau **SISTEMISM**.

Evident că teoria nu poate fi ignorată. TGS este necesară pentru formarea bazelor teoretice generale ale cunoașterii sistemice și a metodologiei sistemice. Astfel, TGS include următoarele 4 componente de bază [4]:

- *Ontologia sistemică* – teoria generală a construcției, funcționării și dezvoltării sistemelor;
- *Gnoseologia sistemică* – teoria generală a cunoașterii sistemelor;
- *Praxiologia sistemică* – teoria generală a organizării sistemelor;
- *Metasistemologia* – metodologia dezvoltării TGS și a transpunerii rezultatelor ei în diverse domenii ale științei și practicii

Reieșind din cele 4 componente de bază ale TGS, esența abordării sistemice constă în *descrierea și controlul* complexității sistemului, fapt ce poate fi realizat datorită forței cognitive ale celor 4 postulate ale sistemismului și anume:

- *Postulatul pertinentei*: valențele oricărui fenomen, oricărei relații, eveniment sau obiect se definesc prin raportarea la intențiile implicite sau explicite ale analistului;
- *Postulatul globalității*: recomandă a considera întotdeauna obiectul sau realitatea ce trebuie cunoscute ca părți integrante și active în cadrul unui ansamblu mai cuprinzător;
- *Postulatul teleologic*: presupune a interpreta obiectul nu prin el însuși, ci prin comportamentul său;

- *Postulatul agregativității*: conform căruia orice prezentare, explicație sau analiză este partizană, (*adică este susținută de cineva*) fiind necesară, în consecință, examinarea unor soluții susceptibile de a dirija selectarea agregatelor considerate pertinente și excluderea iluziei că este posibilă analiza exhaustivă a elementelor considerate [1].

Ținând cont de aspectele menționate, se conturează următoarea definiție a abordării sistemice: „**Abordare sistemică – direcție a filozofiei și a metodologiei științei, a cunoașterii științifice speciale și a practicii corespunzătoare, la temelia cărei se află cercetarea obiectelor ca sisteme**” [16, 15, 24, 21, 18]. Ce fel de sisteme? – diverse: *sociale, naturale, politice, mecanice, economice, de sănătate, de gândire, electronice* etc, etc.

Definiția abordării sistemice sugerează cercetătorului unui sistem sau a unei părți componente ale unui sistem să abordeze următoarele 8 aspecte:

- *aspectul elemento-sistemic și al sistemo-complexității*: care sunt elementele sistemului și complexitatea lor;
- *aspectul sistemo-structural*: se reduce la evidențierea relațiilor din interiorul sistemului;
- *aspectul scopului sistemic*: stabilește necesitatea argumentării științifice a scopului general și a sarcinilor ce rezultă din el;
- *aspectul sistemo-funcțional*: pune în evidență funcțiile sistemului și orientarea lor la scopul final;
- *aspectul resurselor sistemice*: de ce resurse are nevoie sistemul pentru asigurarea bunei funcționalități;
- *aspectul sistemo-integrațional*: determină totalitatea capacităților calitative care asigură integritatea sistemului;
- *aspectul sistemo-comunicațional*: care permite evidențierea relațiilor externe ale sistemului;
- *aspectul sistemo-istoric*: permite precizarea condițiilor de formare a sistemului, etapele dezvoltării lui, starea actuală, precum și perspectiva dezvoltării [14, 17, 20, 23].

Pot fi abordate toate aceste 8 aspecte, dar poate fi supus cercetării doar un aspect sau câteva, aceasta depinde de scopul pe care și l-a pus cercetătorul.

Având în vedere cele menționate până acum, putem

afirma că o cercetare bazată pe AS se caracterizează prin următoarele 4 particularități [4, 8]:

- complexitatea obiectelor de studiu;
- dificultăți de structurizare și formalizate a obiectului de studiu;
- accent pe sinteză, pe reflectarea obiectului complex;
- rezolvarea problemelor sistemului în baza analizei multioptionale.

Așa dar, în ce constă inovația abordării sistemice în raport cu metodele tradiționale ale cunoașterii?

În *primul rând* noțiunile și principiile abordării sistemice evidențiază o realitate mai amplă în comparație cu metodele tradiționale.

În *al 2-lea rând*, abordarea sistemică conține o nouă schemă care lămurește realitatea, la baza cărei stă căutarea de mecanisme ce explică integritatea obiectelor și a tipologiei relațiilor între părțile componente.

Și în *al 3-lea rând*, este posibilă demonstrarea integrității obiectelor, a structurii și dinamicii lor [6].

În ultimele decenii abordarea sistemică tot mai des se aplică în cercetarea farmaceutică.

Direcțiile domeniului farmaceutic, cercetarea căror se bazează pe abordarea sistemică sunt:

1. *Medicamentul și consumatorul lui.* E notoriu faptul, că organismul uman este cel mai complicat sistem biologic. Aplicarea medicamentului ca factor extern asupra acestui sistem, îl transformă în mod inevitabil în obiect al cercetării cu aplicarea abordării sistemice.
2. *Sistemul farmaceutic* ca parte componentă a sistemului de sănătate.
3. *Legislația farmaceutică* ca parte componentă a sistemului de drept.
4. *Organizația/întreprinderea farmaceutică.*
5. *Resursele umane în domeniul farmaceutic.*
6. *Securitatea farmaceutică.*
7. *Determinarea necesarului de medicamente.*

Abordarea sistemică ca metodologie se bazează pe un șir de principii (la moment – peste 30) [7, 12, 13, 19]. În prezenta cercetare, pentru evidențierea problemelor sistemului farmaceutic al RM, au fost enumerate doar acele principii, care la viziunea autorilor, sunt cele mai actuale pentru analiza sistemului farmaceutic al Republicii Moldova. Acestea sunt principiile: *Scopului final; Integrității; Optimizării; Funcționalității; Unicității; Dualității; Decentralizării; Informatizării; Legalității; Profesionalismului și al Organizării.*

Principiul scopului final. Scopul final al sistemului de sănătate, parte componentă a cărui este sistemul farmaceutic, este expus în documente de politici și este formulat astfel: „Crearea condițiilor optime pentru realizarea maximă a potențialului de sănătate al fiecărui individ pe parcursul întregii vieți și atingerea unor standarde adecvate de calitate a vieții populației”.

Totodată, scopul sistemului farmaceutic, formulat în Politica de Stat a Medicamentului, nu este orientat spre realizarea scopului final al sistemului de sănătate. Conducându-ne de cerința privind absența contradicțiilor în cadrul sistemului, scopul final al sistemului farmaceutic poa-

te fi: „Contribuții la realizarea scopului final al sistemului de sănătate prin asigurarea procesului de medicație a fiecărui individ cu medicamente și alte produse medico-farmaceutice necesare, eficiente, inofensive, de calitate conformă și accesibile.” Principiul scopului final este interdependent cu principiul dualității, deoarece sistemul farmaceutic, fiind subsistem al sistemului de sănătate, totodată este un sistem ce constă din mai multe subsisteme și fiecare din aceste subsisteme își are scopul său, la fel orientat spre scopul final al sistemului farmaceutic, iar în consecință – și al sistemului ierarhic superior – sistemul de sănătate.

Principiul unicității și cel al integrității. În RM aceste principii ar putea fi numite principiile lui PROCOPȘIN. De ce? Fiindcă profesorul Vasile Procopișin pentru prima dată în istoria farmaciei a folosit și a descris aceste principii, aplicându-le în amplasarea farmaciilor în localitățile rurale din Republica Moldova. Reglementările la acest capitol sunt:

1. Farmacia este o întreprindere farmaceutică – parte componentă a sistemului de sănătate (Art. 19 al Legii 1456/1993 și pct. 3.6 al Politicii de Stat în domeniul Medicamentului (PSM) HP 1352/2002).
2. Activitatea farmaceutică – domeniu științifico-practic al ocrotirii sănătății... (Art. 1 al Legii 1456/1993).

Dar aceasta nu trebuie să fie doar o declarație. În realitate, în ultimii ani, a dispărut colaborarea medic – farmacist, întreprindere farmaceutică – instituție medico-sanitară, activitatea căror trebuie să fie orientată spre obținerea beneficiilor de sănătate pentru pacient.

Principiul ierarhizării. Acest principiu presupune necesitatea respectării relațiilor de subordonare în cadrul unui nivel ierarhic: AMDM – Subordonată MSMPS, iar MSMPS – Guvernului (figura 2).

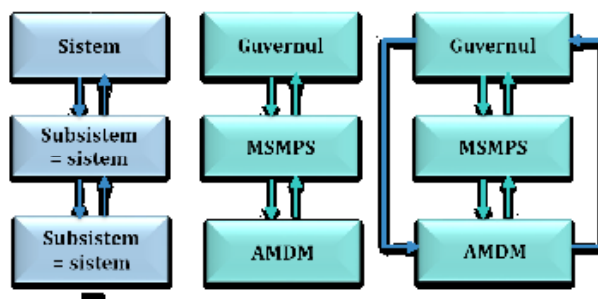


Figura 2. Principiul ierarhizării

Care este situația de facto în acest domeniu? Începând cu 6 aprilie 2017, prin Legea nr.63, AMDM este subordonată direct Guvernului. În această situație s-au intensificat disfuncționalitățile din cadrul sistemului farmaceutic:

- în acte normative farmaceutice tot mai des apare „comerțul”;
- legile 236 și 240 din 16.12.2020 sunt niște norme împotriva sănătății;
- concurență neloială acceptată tacit de organismele competente etc.

Principiul decentralizării este unul interdisciplinar.

Totodată este și o normă constituțională (Art. 109, alin.(1), CRM) și un principiu al conducerii și unul al democrației, precum și de organizare și funcționare a administrației publice. Aici trebuie de menționat faptul existenței unei neconformități cu PSM: absența rețelei farmaceutice de stat. Deci, nu e rețea – nu e decentralizare. Astăzi există o centralizare excesivă a coordonării cu sistemul farmaceutic. Existența acestei probleme generează multiple încălcări ale legislației, ineficiența controlului farmaceutic etc.

În temeiul altor principii ale abordării sistemice, cum ar fi: *al funcționalității, legalității, profesionalismului, optimizării, informatizării etc.*, suplimentar, au mai fost puse în evidență încă un șir de probleme ale sistemului farmaceutic al Republicii Moldova, inclusiv:

- implicarea personalului necalificat în activitatea farmaceutică;
- concurență neloială pe piața farmaceutică;
- ignorarea dezvoltării farmaciei clinice;
- reglementare neconformă/insuficientă a unor domenii;
- blocarea promovării GPP;
- ignorarea medicației individualizate (parțial);
- ineficiența controlului farmaceutic (cazuri);
- asigurarea informațională insuficientă a SF;
- minimizarea rolului AFRM în activitatea practică;
- pasivitatea activității AFRM;
- absența statisticii farmaceutice;
- ignorarea principiilor eticii și deontologiei profesionale;
- ignorarea normelor privind asigurarea transparenței decizionale;
- informatizarea insuficientă a societății.

Mai sunt și alte neconformități, cum ar fi: ignorarea principiului dezvoltării strategice (la moment strategia dezvoltării sistemului farmaceutic este absentă), cazuri de ignorare a conceptului utilizării raționale a medicamentelor etc.

CONCLUZIE

Abordarea sistemică este acea metodologie a cercetării farmaceutice care asigură: punerea în evidență a realității; consolidarea și eficientizarea funcționalității sistemului farmaceutic; buna calitate a produselor, proceselor și serviciilor; înlăturarea situațiilor de risc, eșec, șoc a sistemului; dezvoltarea ulterioară corectă, orientată spre realizarea eficientă a scopului final al sistemului farmaceutic și a celui ierarhic superior – al sănătății.

BIBLIOGRAFIE

1. Dumitrașcu V. Abordarea sistemică – instrument al managementului complexității. Economie teoretică și practică, Iași. <http://store.ectap.ro/articole/41.pdf>
2. Muntean S.N. Eficientizarea managementului resurselor umane... Teză de doctorat, Sibiu, 2014, Rezumat, 39 p.
3. Perez F. Abordarea conceptuală din perspectivă sistemică și procesual-organică a crizei, conflictului și securității. Buletinul Universității de Apărare „Carol I”, septembrie, 2014.
4. Алексеев П. В., Чернавский Д.С., Винограй Э. Г. Что такое системный подход. Зачем он нужен. Студенческий научный форум – 2017. <https://scienceforum.ru/2017/article/2017031116>.
5. Блауберг И.В., Юдин Э.Г. Системный подход. <https://www.booksite.ru/fulltext/1/001/008/102/642.htm>.
6. Буланова М.Б. Системный подход. Социологический словарь/ отв.ред. Г.В. Осипов, Л.Н. Москвичев. М., 2014, с.421. <http://ponjatija.ru/node/10801>.
7. Зубов Н. Сущность и принципы системного подхода. http://masters.donntu.org/2007/feht/hudoshin/library/ar_6.htm
8. Качала В.В. Основы теории систем и системного анализа. Учебное пособие для вузов. М., «Горячая линия», Телеком, 2007.
9. Мескон М., Алберт М., Хедоури Ф. Основы менеджмента. М., Дело, 1994, 701 с.
10. Полещук И.А. Системный подход и понятие системы. Философские науки. 2014. <https://cyberleninka.ru/article/n/sistemnyy-podhod-i-ponyatie-sistemy/viewer>
11. Шагалова Т.В. Системный подход к управлению качеством на основе TQM. <http://edriju.ru/article/08-10-2018>

SURSE ELECTRONICE

12. Abordarea sistemelor. Principii. <https://ik-ptz.ru/ro/diktanty-po-russkomu-yazyku--2-klass/sistemnyi-podhod-osnovnyvaetsya-na-etapy-i-principy-sistemnogo-podhoda-v.html>
13. Abordarea sistemică a managementului organizației. <https://www.qreferat.com/referate/management/ABORDAREA-SISTEMICA-A-MANAGEMENTE936.php>
14. Abordarea sistemică ce este. <http://fap.scrieunblog.com/articles/abordarea-sistemic-a-ce-este.html>
15. Conceptul de abordare sistemică. <https://www.qdidactic.com/didactica-scoala/geografie/ecologie/conceptul-de-abordare-sistemic541.php>
16. Metodologia sistemică. Esența și destinația practică a abordării sistemice. <https://administrare.info/management/8957-metodologia-sistemic%C4%83-esen%C5%A3a-%C5%9Fi-destina%C5%A3ia-practic%C4%83-a-abord%C4%83rii-sistemic>
17. Дорренбахер К. Дж. Развитие системного подхода. <http://epizodsspace.airbase.ru/bibl/spaceage/19.htm>
18. Значение словосочетания "системный подход". <https://kartaslov.ru/%D0%B7%D0%BD%D0%B0%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5-%D1%81%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B0/%D1%81%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%BD%D1%8B%D0%B9+%D0%BF%D0%BE%D0%B4%D1%85%D0%BE%D0%B4>
19. Основные принципы системного подхода. <https://studfile.net/preview/1667715/page/7/>
20. Системный подход – наука. https://science.wikia.org/wiki/%D0%A1%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D0%BF%D0%BE%D0%B4%D1%85%D0%BE%D0%B4
21. Системный подход в философии. <https://iphlib.ru/library/collection/newphilenc/document/HASH6743a0d-47bb13eeacfee67>
22. Системный подход и его развитие. <https://zaochnik.com/spravochnik/ekonomika/teorija-organizatsii/sistemnyj-podhod/>
23. Системный подход. Wikipedia. <https://ru.wikipedia.org/wiki>
24. Системный подход. Теория. (Гуманитарный портал). <https://gtmarket.ru/concepts/7095>

CHIMIE FARMACEUTICĂ ȘI CONTROLUL MEDICAMENTULUI

CZU: 615.282.015.11

**NITROTRIAZON – UN NOU DERIVAT
NESATURAT AL 1,2,4 - TRIAZOLULUI
CU ACȚIUNE ANTIFUNGICĂ.
RELAȚIE STRUCTURĂ – ACTIVITATE**

**NITROTRIAZON – A NEW UNSATURATED
DERIVATIVE OF 1,2,4-TRIAZOLE WITH
ANTIFUNGAL ACTION.
STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP**

Maria Drumea^{1,2}, Vladimir Valica^{1,2}, Livia Uncu^{1,2} Fliur Macaev^{1,3}

¹Centrul Științific al Medicamentului,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;
²Catedra de Chimie farmaceutică și toxicologică,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;
³Laboratorul Sinteză Organică,
Institutul de Chimie, Chișinău, Republica Moldova

Autor corespondent: livia.uncu@usmf.md

Summary. Fungal infections are an important chapter of infectious pathology, their incidence increasing considerably due to the widespread use of antibiotics, cytostatics and immunosuppressants.

The study of the structure-activity relationship showed that the presence of 2,4-Cl-C₆H₄ as R1 substituent and 4-NO₂-C₆H₄ as R2 substituent is beneficial for antifungal activity. Nitrotriazon also possesses antibacterial activity, so the 1,2,4-triazole portion can influence physicochemical parameters, such as hydrogen binding, fat solubility, polarity, can influence pharmacodynamics, pharmacokinetics and toxicity. 1,2,4-Triazoles act as pharmacophores by interacting with high affinity biological receptors due to their dipole character, hydrogen binding capacity, rigidity and solubility. Hybridization of 1,2,4-triazole derivatives with other pharmacophores has a high potential to develop new drugs.

Key words: Nitrotriazon, 1,2,4-triazole, antifungal, structure-activity

Rezumat. Infecțiile fungice reprezintă un capitol important al patologiei infecțioase, incidența acestora crescând considerabil ca urmare a utilizării pe scară largă a antibioticelor, citostaticelor și imunosupresoarelor. Studiul relației structură-activitate a demonstrat că prezența a 2,4-Cl-C₆H₄ ca substituent R1 și 4-NO₂-C₆H₄ ca substituent R2 este benefică pentru activitatea antifungică. Nitrotriazonul posedă și activitate antibacteriană, astfel porțiunea 1,2,4-triazol poate influența parametrii fizico-chimici, cum ar fi legarea hidrogenului, liposolubilitatea, polaritatea, pot influența farmacodinamica, farmacocinetica și toxicitatea. 1,2,4-triazolii acționează ca farmacofori prin interacțiunea cu receptorii biologici cu afinitate ridicată datorită caracterului lor dipol, capacității de legare a hidrogenului, rigidității și solubilității. Hibridizarea derivaților 1,2,4-triazolului cu alți farmacofori prezintă un potențial ridicat de a dezvolta noi medicamente.

Cuvinte cheie: Nitrotriazon, 1,2,4-triazol, antifungic, structură- activitate

INTRODUCERE

Infecțiile fungice reprezintă un capitol important al patologiei infecțioase, incidența acestora crescând considerabil ca urmare a utilizării pe scară largă a antibioticelor, corticosteroizilor, citostaticelor și a medicamentelor imunosupresoare. Aceste infecții sunt, în prezent, o problemă din ce în ce mai frecventă și mai dificil de gestionat, mai ales în secțiile de terapie intensivă, fiind grevate de o serie

de dificultăți de diagnostic, de tratament și de o rată de mortalitate foarte ridicată [1].

Din punct de vedere clinic, candidoza și aspergiloza reprezintă 80%-90% din infecțiile fungice sistemice la pacienții imunocompromiși. În timp ce cercetarea antifungică este în principal axată pe infecții fungice sistemice, dermatomicozele sunt printre cele mai răspândite și comune infecții fungice umane superficiale și cutanate [2].

Mai mult de 90% din decesele raportate asociate fungice rezultă din specii aparținând a trei genuri: *Cryptococcus*, *Candida* și *Aspergillus*, însă există rapoarte tot mai mari de infecții cu agenți patogeni rari / emergenți, inclusiv *Candida non-albicans species*, ciuperci oportuniste asemănătoare drojdiei (de exemplu, *Trichosporon* și *Rhodotorula spp.*), *non-fumigatus Aspergillus spp.*, zigomicete și mucegaiuri hialine (de exemplu, *Fusarium* și *Scedosporium spp.*). Ciuperci dimorfice precum *Blasatomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* și *Sporothrix schenckii* au fost, de asemenea, asociate cu infecții fungice grave la gazda imunocompromisă [3, 4].

Agenții antifungici de triazol, joacă un rol important în tratamentul infecțiilor fungice sistemice datorită spectrului larg și profilului de siguranță îmbunătățit [5]. Având în vedere că terapia pe termen lung cu azoli are ca rezultat - rezistența, este nevoie de noi agenți antifungici cu mai puține efecte adverse pentru a trata aceste infecții fungice care amenință viața [2, 6], ceea ce i-a impulsat pe cercetători de a dezvolta noi triazoli cu spectru larg, cu impact ridicat, ușurință de administrare și toxicitate scăzută pentru a învinge rezistența [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Majoritatea medicamentelor conțin derivați de compuși heterociclici ca componente active. Printre acestea, un loc special este ocupat de compușii heterociclici cu cinci membri conținând azot, în special 1,2,4-triazolii. Antifungicele din clasa triazolilor au un spectru mult mai larg de aplicații în comparație cu imidazolii, ceea ce face ca această clasă de azoli să fie obiectivul principal al numeroase entități farmaceutice [8].

Azoli și derivații lor s-au dovedit a fi medicamentele alese pentru tratamentul infecțiilor fungice sistemice precum Candidoză, Cryptococoză și Aspergiloză, datorită spectrului lor larg și potențialului ridicat. Cu toate acestea, activitatea împotriva *Zygomycetes*, *Fusarium* și *Scedosporium spp.* este mai limitată. Azolii au activitate fungistatică împotriva *Candida* și activitate fungicidă împotriva *Aspergillus*, cu toate acestea, concentrația necesară pentru a inhiba creșterea depinde de natura speciilor infectante [3, 9].

Heterociclii au o importanță deosebită în descoperirea medicamentului, deoarece heteroatomii prezenți în ei fac legături de hidrogen cu receptorii prezenți în organism și, astfel, acțiunile lor farmacologice sunt semnificative. Triazolul, cunoscut și sub denumirea de pirodiazol, este unul dintre clasele de compuși heterociclici organici care conține un inel cu cinci membri di-nesaturați compus din trei atomi de azot și doi atomi de carbon în poziții care nu sunt adiacente având formula moleculară $C_2H_3N_3$. Cei doi izomeri de triazol sunt 1,2,4-triazolul și 1,2,3-triazolul, care au un număr de cinci membri, inel de doi atomi de carbon și trei atomi de azot [10].

1,2,4-triazolul acționează ca izoster al amidei, esterului și acidului carboxilic. Poate fi derivat format din pirazol prin substituția unui atom de carbon în poziția 4 cu atom de azot. 1,2,4-triazolul există în două forme tautomere: 1H-1,2,4-triazol este mai stabil decât 4H-1,2,4-triazol [7, 10].

Medicamentele antifungice triazole acționează puternic prin inhibarea activității enzimei care depinde de citocromul P450, lanosterolul 14- α -demetilază (CYP51), care este enzima cheie în biosinteza ergosterolului ciupercilor, componentă semnificativă a membranei celulare fungice, care menține fluiditatea membranei, având rolul unei bariere de permeabilitate [7, 11].

1,2,4-triazolii acționează ca farmacofori importanți prin interacțiunea cu receptorii biologici cu afinitate ridicată datorită caracterului lor dipol, capacității de legare a hidrogenului, rigidității și solubilității. Acest motiv face parte integrantă dintr-o varietate de medicamente disponibile în terapia clinică, inclusiv antifungice, anxiolitice, anticonvulsivante și hipnotice, antiplachetare, antidepresive, anticancer, antivirale, anticonvulsivante și altele [7]. Derivații de 1,2,4-triazol au o gamă largă de activități farmacologice diferite, care depind în principal de natura substituenților [12]. S-a dovedit că compușii de triazol care conțin unul sau mai multe inele 1,2,4-triazol conțin unele dintre cele mai puternice proprietăți antifungice [13].

În acest studiu este cercetat un nou derivat de 1,2,4-triazol: 1-(2,4-diclorofenil)-3-(4-nitrofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)prop-2-en-1-one (Nitrotriazon, $C_{17}H_{10}Cl_2N_4O_3$), sintetizat în Laboratorul de sinteză organică a Institutului de chimie. Nitrotriazonul are masa molară $M=389$ g/mol, și formula de structură prezentată în (Figura 1).

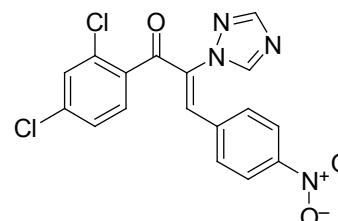


Figura 1. Formula de structură a Nitrotriazonului

Opt derivați de triazol, printre care și Nitrotriazonul, au fost evaluați pentru activitatea antimicrobiană (Figura 2). Toți compușii testați au prezentat o bună capacitate de inhibare a bacteriilor și ciupercilor. Studiul relațiilor structură - activitate a Nitrotriazonului, a demonstrat că prezența 2,4-Cl-C₆H₄ ca substituent R₁ și 4-NO₂-C₆H₄ ca substituent R₂ este benefică pentru activitatea antifungică. Înlocuirea Me₂CHCH₂ (2h) cu 2,4-Cl-C₆H₃ și 4-NO₂-C₆H₄ în R₂ cu 3,5 (Bu) 2-4-OH-C₆H₂ a condus la compusul 2g cu activitate scăzută. Activitatea a scăzut mai mult cu prezența grupării 2-naftil ca substituent R₁ și grupării 4-dimetilaminofenil ca substituent R₂ (2d), în timp ce prezența

grupării fenil ca R₁ și 3-hidroxi fenil ca substituent R₂ este dăunătoare pentru activitatea antifungică.

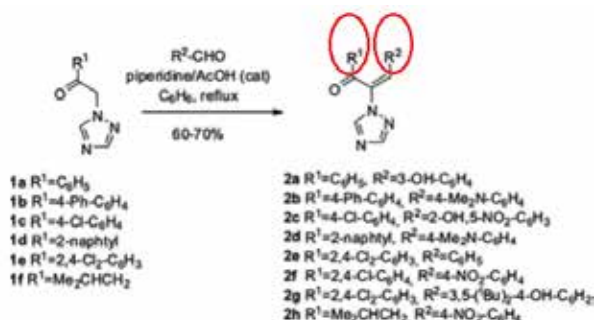


Figura 2. Sinteza generală a compușilor derivați de 1,2,4-triazol

Nitrotriazonul, derivat de 1,2,4-triazol, posedă și activitate antibacteriană, astfel porțiunea 1,2,4-triazol poate influența parametri fizico-chimici importanți, cum ar fi legarea hidrogenului, liposolubilitatea, polaritatea, pot influența farmacodinamica, farmacocinetica și toxicitatea. De menționat, că porțiunea 1,2,4-triazol, îmbunătățește activitatea principalului farmacofor antibacterian într-o moleculă hibridă.

Studiul relațiilor structură – activitate a arătat că prezența Me₂CHCH₂ ca substituenți R₁ și 4-NO₂-C₆H₄ (2h) este benefică pentru activitatea antibacteriană. Înlocuirea Me₂CHCH₂ (2h) cu 4-Cl-C₆H₄, a condus la o activitate scăzută. Introducerea al celui de-al doilea atom de clor în R₁, precum și înlocuirea 4-NO₂-C₆H₄ în R₂ prin substituent voluminos 3,5 (Bu) 2-4-OH-C₆H₂ a scăzut activitatea mai mult întrucât prezența grupării 2-naftil ca substituent R₁ și gruparea 4 -dimetilamino-fenil ca substituent R₂ (2d) a fost defavorabilă pentru activitatea antibacteriană. Se pare că electronul grupului de retragere ca substituent R₂ (4-NO₂) are o influență pozitivă asupra activității antibacteriene (2h, 2f, 2c) în timp ce prezența donării de electroni a grupului (NMe₂) ca substituent R₂ joacă un rol negativ [14].

Derivații de triazol sunt considerați ca o nouă clasă de candidați eficienți anti-TB. Astfel, moleculele care conțin fragment de triazol pot prezenta activități anti-TB promițătoare in vitro și in vivo și pot preveni medicamentul rezistent într-o anumită măsură [15]. Derivații de 1,2,4-triazol posedă și o activitate anticanceroasă promițătoare in vitro și in vivo, astfel Nitrotriazonul derivat de 1,2,4-triazol, dezvăluie un potențial în dezvoltarea de noi agenți anticanceroși [16].

O serie de compuși 1-substituiți ai 1,2,4-triazolului au fost proiectați și sintetizați de Sun et al și au fost testați împotriva a 6 ciuperci patogene umane. Compusul din (Figura 3), a arătat o activitate ridicată față de Candida albicans, Candida parapsilosis și Candida krusei în comparație cu fluconazolul. [17].

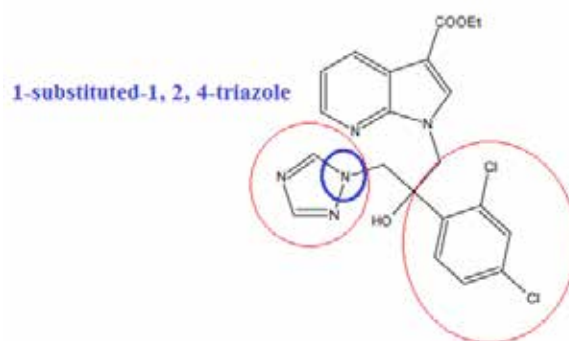


Figura 3. Compus 1H-substituit al 1,2,4-triazolului

Heterociclii care conțin sulfuri reprezintă un grup important de compuși cu sulf, care sunt promițători pentru utilizare în aplicații practice. Printre aceste heterocicluri, sistemele de inele 1,2,4-triazol substituite de mercapto și de tio A-C (Figura 4) au fost bine studiate și până în prezent au fost raportate o varietate de activități biologice pentru un număr mare de derivați ai acestora, cum ar fi proprietăți antibacteriene, antifungice, antituberculare, antimicobacteriene, anticancer, diuretice și hipoglicemice [18].

CONCLUZII

Studiul relațiilor structură – activitate a Nitrotriazonului, a demonstrat că prezența 2,4-Cl-C₆H₄ ca substituent R₁ și 4-NO₂-C₆H₄ ca substituent R₂ este benefică pentru activitatea antifungică.

Nitrotriazonul, posedă și activitate antibacteriană, astfel porțiunea 1,2,4-triazol poate influența parametrii fizico-chimici importanți, cum ar fi legarea hidrogenului, liposolubilitatea, polaritatea, pot influența farmacodinamica, farmacocinetica și toxicitatea.

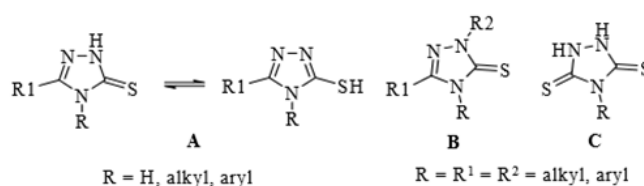


Figura 4. Sisteme de inele 1,2,4-triazol substituite de mercapto și tio

Derivații de 1,2,4-triazol posedă și o activitate anticanceroasă promițătoare in vitro și in vivo, astfel derivații de 1,2,4-triazol, dezvăluie un potențial în dezvoltarea de noi agenți anticanceroși. Moleculele care conțin fragment de triazol pot prezenta și activități anti-TB promițătoare și pot preveni medicamentul rezistent într-o anumită măsură.

Infecțiile fungice sunt mereu în creștere, deoarece numărul pacienților cu sisteme imunitare compromise continuă să crească. Nevoia de antifungice mai sigure și mai eficiente a dus la căutarea de noi clase de medicamente și la modificări la cele existente, cu scopul de a-și îmbunătăți spectrele antifungice și potența

BIBLIOGRAFIE

1. Corneli O, Călin M. Antibiotice antifungice: clasificare, mecanisme de acțiune și mecanisme de rezistență. *MEDICHUB MEDIA*. 2016
2. Geronikaki A, Fesatidou M, Kartsev V, Macaev F. Synthesis and biological evaluation of potent antifungal agents. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(21):2684-2733.
3. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):457-465.
4. Espinel-Ingroff A. In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol*. 1998;36(1):198-202.
5. Altıntop MD, Kaplancıklı ZA, Çiftçi GA, Demirel R. Synthesis and biological evaluation of thiazoline derivatives as new antimicrobial and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 74: 264-277.
6. Ablordeppey SY, Fan P, Ablordeppey JH, Mardenborough L. Systemic antifungal agents against AIDS-related opportunistic infections: current status and emerging drugs in development. *Curr Med Chem*. 1999;6(12):1151-1196
7. Aggarwal R, Sumran G. An insight on medicinal attributes of 1,2,4-triazoles [published online ahead of print, 2020 Jul 27]. *Eur J Med Chem*. 2020; 205:112652.
8. Pasqualotto AC, Denning DW. New and emerging treatments for fungal infections. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61 Suppl 1:i19-i30.
9. Marichal P, Vanden Bossche H. Mechanisms of resistance to azole antifungals. *Acta Biochim Pol*. 1995;42(4):509-516.
10. Kaur P, Chawla A. 1,2,4-triazole: A review of pharmacological activities. *Int. Res. J. Pharm*. 2017;8(7):10-29.
11. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;5(7):a019752. Published 2014 Nov 10.
12. Popiołek Ł, Kosikowska U, Dobosz M, Malm A. Synthesis and Antimicrobial Properties of New Thiosemicarbazide, 1,2,4-Triazole, and 1,3,4-Thiadiazole Derivatives of Sulfanylacetic Acid. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*. 2012; 187:468-481
13. Peyton LR, Gallagher S, Hashemzadeh M. Triazole antifungals: a review. *Drugs Today (Barc)*. 2015;51(12):705-718.
14. Stingaci E, Zveaghinteva M, Pogrebnoi S, Lupascu L, Valica V, Uncu L, et al. New vinyl-1,2,4-triazole derivatives as antimicrobial agents: Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2020;30(17):127368
15. Zhang S, Xu Z, Gao C, Ren QC, et al. Triazole derivatives and their anti-tubercular activity. Vol. 138, *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS; 2017. p. 501-13.
16. Xiaoyue W, Yongqin Z, Junhao Z and Xinyue L. "Recent Development of 1,2,4-triazole-containing Compounds as Anticancer Agents". *Current Topics in Medicinal Chemistry* (2020) 20: 1441.
17. Banerjee S, Ganguly S, Sen KK. A Review on 1, 2, 4 - Triazoles. *J. Adv. Pharm. Edu. & Res*. 2013, 3(3). 102-115.
18. Shaker RM, The chemistry of mercapto- and thione-substituted 1,2,4-triazoles and their utility in heterocyclic synthesis. *General Papers ARKIVOC* 2006 (9) 59-112.

CZU: 615.281.9:547.655.6

STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTITUBERCULOASE A PARTICULELOR DE CICLODEXTRINE ÎNCĂRCATE CU JUGLONĂ

STUDY OF ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF THE CYCLODEXTRINS PARTICLES LOADED WITH JUGLONE

Natalia Sucman^{1,2}, Livia Uncu², Valeriu Crudu³, Nelly Ciobanu³,
Alexandru Codreanu³ Vladimir Valica², Fliur Macaev^{1,2}

¹Laboratorul Sinteză Organică, Institutul de Chimie, Chișinău, Republica Moldova;

²Centrul Științific al Medicamentului,

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;

³Laboratorul Microbiologia și Morfologia tuberculozei,

IMSP Institutul de Ftiziopneumopogie „Chiril Draganiuc”, Chișinău, Republica Moldova

Autor corespondent: livia.uncu@usmf.md

Rezumat. Această lucrare este dedicată obținerii particulelor de ciclodextrine încărcate cu Juglonă în calitate de compus antimicobacterian. Au fost descrise metoda de preparare și morfologia particulelor obținute. Sunt prezentate datele privind activitatea antimicobacteriană a sistemelor obținute. S-a detectat, că sistemele de particule de ciclodextrine încărcate cu Juglonă sunt la fel de eficiente ca Juglona pură aplicată în doze mai mari.

Cuvinte cheie: Juglone; β -ciclodextrină; (2-Hidroxiopropil) $-\beta$ -ciclodextrină; Sare de sodiu sulfobutil- β -ciclodextrină

Abstract. This paper is dedicated to obtaining of cyclodextrins particles loaded with Juglone as antimycobacterial compound. Method of preparation and morphology of the obtained particles have been described. The antimycobacterial activity data of the obtained systems is presented. It has been detected that cyclodextrins particulate systems loaded with Juglone are as effective as pure Juglone applied in higher dosages.

Keywords: Juglone; β -cyclodextrin; (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin; Sulfobutyl-beta-Cyclodextrin sodium salt.

INTRODUCERE

Tratamentul antituberculos, considerat ca una din metodele principale de prevenire a răspândirii infecției, tot mai des în ultima perioadă nu se soldează cu rezultate așteptate și unul din motivele de bază a ineficienței terapeutice este rezistența *M.tuberculosis* față de preparatele antituberculoase. Extinderea nivelului rezistenței primare și acumularea unui număr tot mai mare de tulpini de *M.tuberculosis* rezistente la preparatele antituberculoase a devenit o problemă majoră în controlul acestei infecții la etapa actuală. Urmare a acestui fenomen este creșterea numărului de eșecuri terapeutice și a numărului de bolnavi cronici. Este o problemă destul de alarmantă, deoarece în viitor pot apărea tot mai frecvent forme de tuberculoză incurabilă, ori, alte preparate antituberculoase noi nu se elaborează prea des [9].

Rezistența *M.tuberculosis* față de preparatele antituberculoase strategice, utilizate pe larg la etapa actuală în tratamentul acestei infecții a atins cifre extrem de periculoase. După datele studiului național de supraveghere

a rezistenței medicamentoase (2020), realizat de către Laboratorul Național de Referință în microbiologia tuberculozei al Institutului de Ftiziopneumologie “Chiril Draganiuc”, demonstrează un nivel extrem de mare a tuberculozei multirezistente (TBMDR) la preparatele strategice utilizate în tratamentul tuberculozei (Izoniazidă și Rifampicină). TB MDR a fost determinată la 24.9% din pacienții cu tuberculoză pulmonară caz nou examinați, iar printre cazurile cu re-tratamente – 54,3%. Un nivel înalt al rezistenței micobacteriilor tuberculozei față de remediile specifice se observă nu numai în regiunile cu incidență sporită a acestei infecții, dar și în țările, unde incidența tuberculozei este joasă. Organizația Mondială a Sănătății a declarat tuberculoza o urgență globală, iar fenomenul în cauză de o importanță primordială și recomandă ca cercetările efectuate în domeniul elaborării unor *remedii noi*, mai efective în tratamentul cazurilor de tuberculoză cu rezistență multiplă la medicamente, să fie apreciate ca *direcție de studiu prioritar*.

Tratamentul diferitor forme de tuberculoză este unul complex, cu utilizarea preparatelor din diverse grupe

farmacoterapeutice. Studiarea unor substanțe noi cu activitate antituberculoasă și elaborarea unor noi remedii, care ar putea largi arsenalul preparatelor antituberculoase și influența esențial la eficacitatea tratamentului cazurilor de tuberculoză multirezistentă, este de o importanță majoră, atât din punct de vedere științific, cât și pentru domeniul sănătății publice.

Studiarea activității antituberculoase a unor substanțe noi sintetizate – particule de ciclodextrină încărcate cu juglonă – cu perspectiva elaborării unor noi remedii, este o direcție de cercetare promițătoare, care ar aduce contribuții noi la eficientizarea tratamentului cazurilor de tuberculoză multirezistentă.

Juglona (5-hidroxi-1,4-naftochinona) **1** este o substanță organică naturală din clasa naftochinonei, care se prezintă sub formă de glucozid 1,4,5-trihidroxinaftalinului în frunze, rădăcini, coji, fructe (pericarp) și scoarță de plante din familia *Juglandaceae*. Juglona are acțiune antimicrobiană, antifungică, antimicobacteriană, antihelmintică, antiproliferativă. Această substanță este și un agent nespecific pentru tratamentul bolilor de piele provocate de infecții stafilococice și streptococice, a bolii parodontale și a tuberculozei cutanate [1-6].

Ciclodextrinele sunt o clasă de oligozaharide ciclice, compuse din resturi de D-glucopiranoză legate prin legături α -1,4-glicozidice. Forma moleculei de ciclodextrină seamănă cu un con trunchiat gol, unde cavitatea interioară este hidrofobă, iar suprafața exterioară este hidrofilă. Datorită acestui fapt, ciclodextrinele sunt capabile să formeze clatrați (complexe de incluziune) cu diverse substanțe biologice active. Astfel de clatrați se caracterizează prin solubilitate ridicată, stabilitate și toxicitate scăzută.

Scopul acestei lucrări este de a obține complexe de juglonă cu β -ciclodextrină, cu hidroxipropil- β -ciclodextrină, cu sare de sodiu a sulfobutil- β -ciclodextrinei și de a studia activitatea lor anti-tuberculoasă.

MATERIALE ȘI METODELE DE CERCETARE

Juglona **1** a fost obținută din materie primă autohtonă, și anume din frunze de nuc (*Juglans regia* L.), prin extracție cu cloroform, cu separarea ulterioară de alte componente ale extractului prin cromatografie pe coloană. În calitate de al doilea component pentru studiu s-a utilizat β -ciclodextrină sau derivații ei: hidroxipropil- β -ciclodextrină (producător - CycloLab R&D Ltd., Ungaria) și sarea de sodiu al sulfobutil- β -ciclodextrinei (producător - Cy-Dex Inc., SUA).

Complexele de incluziune au fost obținute prin metoda de macinare, cu adaos de apă și prin metoda coevaporării conform metodei descrise în literatură [7].

Raportul molar al componentelor din sistemele juglonă - β -ciclodextrină **2**, juglonă - hidroxipropil- β -ciclodextrină **3**, juglonă - sare de sodiu a sulfobutil- β -ciclodextrinei **4** a

fost 1: 1, în timp ce în sistemele juglonă - β -ciclodextrină **5**, juglonă - hidroxipropil- β -ciclodextrină **6**, juglonă - sare de sodiu a sulfobutil- β -ciclodextrinei **7** a fost 1: 2.

La utilizarea metodei de măcinare, s-au adăugat la mojar porțiuni cântărite de ciclodextrină și juglonă (0,03 mmol de fiecare substanță), apoi s-a adăugat apă distilată, într-o cantitate suficientă pentru a forma o pastă. Amestecul rezultat a fost măcinat într-un mojar cu pistil timp de 90 de minute: primele 60 de minute cu adăugarea periodică de apă distilată (pentru a asigura consistența unei paste), ultimele 30 de minute amestecul a fost triturat până la uscare pentru a forma o pulbere fină. Sistemele rezultate au fost depozitate în flacoane închise ermetic pentru a preveni absorbția umezelii atmosferice.

Substanțele incluse în studiu au fost testate prin metoda fenotipică de testare a sensibilității la *M. tuberculosis* pe medii nutritive solide și lichide. A fost utilizată metoda concentrațiilor absolute pe mediile de cultură Lowenstein-Jensen (LJ) și metoda proporțiilor (mediul Middlebrook 7H9). Activitatea bactericidă și bacteriostatică a fost determinată utilizând tulpina de referință H₃₇Rv, precum și tulpini de *M. tuberculosis* „sălbatică”, izolate de la bolnavi de tuberculoză pulmonară aflați la tratament în clinica Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”. Investigațiile în cauză au fost realizate în Laboratorul Național de Referință în microbiologia tuberculozei. S-a determinat concentrația minimă de inhibiție (CMI) „in vitro” a substanțelor sintetizate către *M. tuberculosis*.

Pregătirea suspensiei de *M. tuberculosis* complex.

Au fost utilizate tulpinile de referință H₃₇Rv, precum și tulpini de *M. tuberculosis* „sălbatică”, izolate de la pacienți cu tuberculoză pulmonară cu termenul de izolare până la 2 săptămâni. Suspensia micobacteriană a fost pregătită pe apă distilată sterilă după standardul de turbiditate de 5.0 UFC.

Studiarea activității antituberculoase bactericide a substanțelor sintetizate.

Pentru studiarea activității antituberculoase bactericide, substanțele sintetizate în acest studiu au fost dizolvate inițial în dimetilsulfoxid (DMSO). Diluțiile ulterioare au fost efectuate pe apă distilată sterilă. Au fost pregătite soluțiile preparatelor studiate cu următoarele concentrații: 500 μ g/ml, 100 μ g/ml și 50 μ g/ml. Au fost utilizate 3 expoziții – 60 minute, 240 minute și 24 ore. Suspensia de *M. tuberculosis* complex (0.2 ml) a fost inoculată cu 2.0 ml soluția de substanțe studiate la diferite concentrații și pentru diferite expoziții. După fiecare expoziție se centrifuga 10 min. la 3000 rotații, după care se vărsa supernatantul și la sediment se adăuga 1.0 ml apă distilată sterilă. Concentrațiile și expozițiile utilizate pentru studiarea activității antituberculoase bactericide a substanțelor sintetizate sunt redată în tabelul 1.

Tabelul 1. Studiarea activității antituberculoase bactericide a substanțelor sintetizate

Tulpină <i>M.tuberculosis</i>	$H_{37}Rv^*$			<i>M.tuberculosis^{**}</i>		
Concentrație substanță	Expoziție			Expoziție		
500 $\mu\text{g/ml}$	60 minute	240 minute	24 ore	60 minute	240 minute	24 ore
100 $\mu\text{g/ml}$	60 minute	240 minute	24 ore	60 minute	240 minute	24 ore
50 $\mu\text{g/ml}$	60 minute	240 minute	24 ore	60 minute	240 minute	24 ore

Control 1- Suspensie *M.tuberculosis complex* 0.2 ml+2.0ml apă sterilă;

*Tulpină de referință - $H_{37}Rv$;

**Tulpină sălbatică *M.tuberculosis*, izolată de la pacienți TB.

Pentru determinarea activității bactericide, substanțele au fost inoculate pe medii lichide în condițiile expuse în tabel și incubate în sistemul BACTEC MGIT 960 și pe medii solide Lowenstein-Jensen.

Studiarea activității antituberculoase bacteriostatice a substanțelor sintetizate

Pentru studierea activității bacteriostatice față de *M. tuberculosis* inițial au fost pregătite mediile nutritive lichide și solide cu 3 concentrații de substanțe sintetizate: 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ și 50 $\mu\text{g/ml}$.

Inocularea.

Pentru însămânțare sa-a fost utilizat câte 0,2 ml suspensie $H_{37}Rv$ și suspensie tulpină sălbatică cu turbiditate 5 UFC la fiecare concentrație a substanței studiate (200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ și 50 $\mu\text{g/ml}$). În calitate de control a fost utilizat: tubul cu mediu de cultură fără substanță (placebo), tubul cu mediu LJ cu o concentrație de 40 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicină și mediu lichid Middlebrook 7H9 cu concentrație de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicină.

Citirea rezultatelor.

Controlul tuburilor inoculate s-a efectuat în sistemul automat BACTEC MGIT 960 la fiecare 60 minute de incubare și pe mediile solide la fiecare a 7a zi de incubare la termostat.

Controlul eficacității testării.

În calitate de control a fost utilizat tubul placebo și tubul cu concentrații de Rifampicina de 40 $\mu\text{g/ml}$ pentru mediile solide și de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ pentru mediile lichide.

REZULTATE

Analiza fizico-chimică

Pentru studierea activității bactericide au fost efectuate mai multe experiențe la date diferite în dinamică. Astfel, au fost montate 11 testări, utilizând la fiecare testare tulpina de referință $H_{37}Rv$ și de la 2 până la 5 tulpini sălbatice la fiecare concentrație. Fiecare substanță a fost testată la trei concentrații și trei expoziții diferite. Astfel,

au fost efectuate 384 testări la diferite concentrații și expoziții pe medii lichide (BACTEC MGIT) și medii solide (LJ). Rezultatele testărilor au demonstrat, ca substanțele cercetate nu posedă **activitate bacterică** în concentrații de la 50 $\mu\text{g/ml}$ până 500 $\mu\text{g/ml}$ și expoziție de la 1 oră până la 24 ore.

Totodată, testarea activității bacteriostatice a demonstrat alte rezultate. La analiza creșterii pe medii lichide (BACTEC MGIT), utilizând programa BD EpiCenter™ TB-eXIST, s-a constatat, că o parte din substanțe au demonstrat **activitate bacteriostatică** inhibitorie la toate concentrațiile și expozițiile utilizate a substanțelor testate. Această activitate se exprimă prin stoparea creșterii coloniilor de microorganisme în cazul acestor substanțe, față de testele control.

Studiarea activității bacteriostatice „*in vitro*” a noilor agenți antimicrobieni din Juglone 1 pe medii solide LJ s-a efectuat prin metoda concentrațiilor absolute. Astfel, au fost testate 7 substanțe a câte trei concentrații fiecare (50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ și 200 $\mu\text{g/ml}$). Rezultatele testării au fost evaluate după 2 luni de incubare la 37°C. Toate substanțele cercetate au demonstrat acțiune bacteriostatică în concentrație de 200 $\mu\text{g/ml}$ pe mediu solid LJ față de tulpina de referință $H_{37}Rv$ și tulpinile sălbatice de *M.tuberculosis* luate în studiu.

Rezultatele studierii activității antituberculoase bacteriostatice a substanțelor sintetizate 2-7 sunt demonstrate în tabelul 2.

În tabel sunt date abreviațiile substanțelor studiate și concentrația minimă inhibitorie (CMI) la care sa constatat activitate bacteriostatică ($\mu\text{m/ml}$).

DISCUȚII

Rezultatele obținute în acest studiu argumentează necesitatea cercetării permanente a componentelor produselor medicamentoase mai efective, care să posedă o activitate biologică înaltă, au o arie largă de utilizare și toxicitate joasă.

Studiarea activității bactericide „*in vitro*” a noilor agenți antimicrobieni din Juglone 1 pe medii solide și li-

chide în majoritatea cazurilor nu au demonstrat careva acțiune bactericidă față de tulpina de referință H₃₇Rv sau față de tulpinile sălbatice de *M.tuberculosis*.

În același timp, toate aceste substanțe sintetizate 1-7

au demonstrat *activitate bacteriostatică inhibitorie* în concentrații de 200 μg/ml față de tulpina de referință și tulpini sălbatice de micobacterii, pe medii de cultură lichide și solide.

Tabelul 2. Rezultatele studierii activității antituberculoase bacteriostatice a substanțelor sintetizate din Juglone 1

Substanța	Raportul componentelor	Conținutul juglonei în probă de 200 μg	CMI μm/mL
1	Juglone	200	1.15
2	Juglone- hidroxipropil-β-ciclodextrină (1:1)	20.3	0.117
3	Juglone - β- ciclodextrină (1:1)	26.8	0.153
4	Juglone - sare de sodiu a sulifobutil -β- ciclodextrinei (1:1)	15.5	0.089
5	Juglone- hidroxipropil-β-ciclodextrină (1:2)	15.3	0.088
6	Juglone - β-- ciclodextrină (1:2)	10.69	0.061
7	Juglone - sare de sodiu a sulifobutil -β- ciclodextrinei (1:2)	7.47	0.043

Astfel, sunt necesare cercetări ulterioare pentru determina concentrațiile inhibitorii mai joase a noilor agenți antimicrobieni 6 și 7. De asemenea este necesar de studiat și toxicitatea substanțelor voi, studiate în acest studiu.

CONCLUZII

Majoritatea compușilor din Juglone manifesta activitate bacteriostatica față de *M.tuberculosis* in concentrație de 0.089-0.043 μm/ml.

Datele experimentale obținute indica la perspectiva studierii în continuare a substanțelor cu activitate antituberculoasa din Juglone 1 pentru elaborarea unor noi remedii medicamentoase împotriva tuberculozei.

Lucrarea a fost realizată în cadrul proiectelor cu cifru 20.80009.5007.17 și 20.80009.8007.14 ale Agenției Naționale pentru Cercetare și Dezvoltare din Moldova (ANCD).

BIBLIOGRAFIE

- Jунгиету Г.И., Влад Л.А. Юглон и родственные 1,4-нафтохиноны. Кишинев: Штиинца, 1978.
- Jiayi Wang, Yuhuan Cheng, Rina Wu, Donghua Jiang, Bing Bai, Dehong Tan, Tingcai Yan, Xiyun Sun, Qi Zhang, Zhaoxia Wu Antibacterial Activity of Juglone against *Staphylococcus aureus*: From Apparent to Proteomic. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 965-977.
- Bhasin D., Chettiar S.N., Etter J. P., Mok M., Li P.K. Anti-cancer activity and SAR studies of substituted 1,4-naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21, 4662-4669.
- Clark A.M., Jurgens T.A., Hufford C.D. Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*, 1990, 4(1), 1-14.
- Zmantar T., Miladi H., Kouidhi B., Chaabouni Y., Slama R.B, Bakhrouf A., Mahdouani K., Chaieb K. Use of juglone as antibacterial and potential efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 101, 44-49
- Tran T., Saheba E., Arcerio A. V., Chavez V., Li Q.-Y., Martinez L. E., Primm T. P. Quinones as antimycobacterial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12,4809.
- Ivancic, A.; Macaev, F.; Aksakal, F.; Boldescu, V.; Pogrebnoi, S.; Duca, Gh. Preparation of alginate-chitosan-cyclodextrin micro- and nanoparticles loaded with anti-tuberculosis compounds. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016, 7, 1208-1218.
- Uncu A. Evaluation of the latest achievements in the discovery of new molecules and drugs regimens for the treatment of tuberculosis. In: Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції "ЛІКИ – ЛЮДИНІ. СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ФАРМАКОТЕРАПІЇ І ПРИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ". Харків, НФаУ, 2020, Том 1, с. 27-35. ISSN 2412-0456.

CZU: [612.433'65+615.357.014](478)

PERSPECTIVE DE CERCETARE ȘI FABRICAȚIE
A BIOSIMILARULUI SOMATROPINA
ÎN REPUBLICA MOLDOVA

PERSPECTIVES OF RHGH BIOSIMILAR
RESEARCH AND MANUFACTURING
IN REPUBLIC OF MOLDOVA

Valeria Grigoriev¹, Vladimir Valica¹, Radu Cazacu², Vasile Cazacu², Liliana Rusnac¹

¹ Centrul Științific al Medicamentului,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;
² Catedra de farmacologie și farmacie clinică,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;

Autor corespondent: vladimir.valica@usmf.md

Rezumat. În Moldova nu există precedent în producerea biosimilarelor. Elucidarea structurii biochimice și clonarea genei hormonului de creștere uman (hGH) au dus la dezvoltarea farmaceutică a rhGH la mijlocul anilor 1980 în SUA. Odată cu expirarea perioadei de protecție a brevetului pentru hGH de referință, a apărut oportunitatea dezvoltării produselor medicamentoase biosimilare. Proiectul de inovare și transfer tehnologic „Procedeu de cultivare a materiei prime pe bază de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere” a demarat în ianuarie 2021, în cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Centrul Științific al Medicamentului din Republica Moldova. Proiectul este finanțat de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare din Moldova, iar cofinanțator este Întreprinderea Farmaceutică Balkan Pharmaceuticals. Scopul proiectului este transferul tehnologic al procedurii de cultivare a vectorului *Pichia pastoris* cu expresia hGH: crearea băncii de celule de lucru, prepararea inoculului și creșterea culturii *Pichia pastoris*, precum și elaborarea documentației aferente acestor activități. Fabricarea autohtonă a rhGH oferă un avantaj farmaco-economic deosebit față de concurentul existent astăzi pe piața Republicii Moldova - Saizen® pulbere pentru soluție injectabilă, Ares Trading SA, Elveția (producător Merck Serono SPA, Italia).

Cuvinte cheie: biosimilar, rhGH, transfer tehnologic, cultura *Pichia pastoris*, bancă de celule de lucru.

Summary. In Moldova there is no precedent in biosimilars production. Elucidation of the biochemical structure and cloning of the hGH gene led to the pharmaceutical development of rhGH in the mid-1980s in the USA. With the expiry of patent protection period of the reference hGH, the opportunity arose for the development of biosimilar medicinal products. The project for innovation and technology transfer “Cultivation process of raw material based on *Pichia pastoris* with the expression of growth hormone” has started in January 2021, within the State University of Medicine and Pharmacy “Nicolae Testemitanu”, the Scientific Center of Medicine from Republic of Moldova. The project is funded by the National Agency for Research and Development from Moldova and co-financier is the Pharmaceutical Enterprise Balkan Pharmaceuticals. The overall goal of the project is the technology transfer of cultivation process of the vector *Pichia pastoris* with the expression of hGH: creation of working cell bank, preparation of inoculum and growth of *Pichia pastoris* culture, and elaboration of documentation related to these activities. The local manufacture of the rhGH offers an incomparable pharmaco-economic advantage over the competitor existing today on the market of Republic of Moldova - Saizen® powder for injection solution, Ares Trading SA, Switzerland (manufacturer Merck Serono S.P.A., Italy).

Keywords: biosimilar, rhGH, technological transfer, *Pichia pastoris* culture, working cell bank.

INTRODUCTION

The EMA defines a biosimilar as “a biological medicinal product that contains a version of the active substance of an already authorized original biological medicinal product (reference medicinal product) in the European Economic Area (EEA). Similarity to the reference medicinal product in terms of quality characteristics, biological activity, safety and efficacy based on a comprehensive comparability exercise needs to be established”. The pioneer of this drug class is Omnitrope® (Somatropin) and it was approved by the European Medicines Agency (EMA)

in 2006. Since 2006, several general and product-specific biosimilar guidelines were developed by the EMA and it is mandatory to mention that EU was the first region in the world to develop a legal, regulatory, and scientific framework for approving biosimilar medicines. In comparison the first biosimilar was approved in the USA only in 2015. To date, EMA has recommended the approval of 77 biosimilars within the product classes of: 1) human growth hormone; 2) granulocyte colony-stimulating factor; 3) erythropoiesis stimulating agent; 4) insulin; 5) follicle-stimulating hormone (FSH); 6) parathyroid hormone; 7) tu-

mour necrosis factor (TNF)-inhibitor; and 8) monoclonal antibodies [1].

Pharmaceutical enterprises worldwide have at least three good reasons to move to a biologics-oriented industry. Firstly, the distinctive capability of biologics to bind with target sites that are difficult to achieve or even inaccessible to small molecule drugs which is mainly due to protein-protein interactions that involve flat surfaces with fewer charged regions. Secondly, another attractive feature of biologics consists in its most auspicious commercial potential [2]. It is estimated that around \$194 billion worth sales of biologics are at risk in the period between 2017 and 2022. This anticipates the beginning of another patent cliff era of blockbuster biologic drug products being challenged by biosimilars. Thirdly, the overall economic return assured by biologics is significantly higher than that of small molecule drugs.

The expiration of the term of patent protection (generally this period is 20 years from the date of filing the relevant patent application) of the original biosimilar products is a key factor in the decision of companies to develop biosimilars [3]. Most innovators also depend on supplementary protection certificates (SPCs), that represents the intellectual property right that serves as a five years' extension to the patent right, and data exclusivity to extend the term of protection. The European Commission recently issued a proposal to amend the rules on SPCs to include "Waiver of export production" to third parties for patented products, in order to promote the competitiveness of generic and biosimilar industries in global markets. This change may encourage the expansion of the market and the export of locally manufactures biosimilars [4].

Because it is by definition easier to reproduce than to generate a product *de novo*, biosimilar has a higher chance of conquering the market and denotes fewer pharmacoeconomic risks than the reference biological products. In addition, investments in original biologic products are incomparably higher than in the case of biosimilar products, with a much lower chance of success [5]. Reports from the research and development departments of pharmaceutical companies show that about 95% of all drug projects never reach the market. The investments needed to develop and market a biosimilar is considerably larger than the amount between \$ 1 million and \$ 4 million attributable to generic drugs [6]. Between 7 and 8 years at a cost of between 100 and 250 million dollars is needed to develop a biosimilar. However, IMS Health estimates that the use of biosimilars has resulted in savings of up to € 100 billion in the United States (US) and the five major European Union (EU) countries by 2020.

DISCUSSIONS

Biologics manufacture involves a fundamentally different approach from traditional chemical synthesis. Involving living systems makes nearly impossible following an exact science as chemistry. The design of complex multistep processes utilizing mammalian and microbial cell cultures brings to life the paradigm of the biologic manu-

facturing process "The process is the product". Conventional preparation process of biologics assumes sequential steps like desired gene isolation, insertion into vector, expression of host cell, cell culture, cell bank creation and characterization, production of protein, purification of protein, analysis and finally formulation. The biosimilar development process unfolds based on several strategic considerations [7]:

- (1) Defining the target—This involves detecting any variability in the reference target molecule and any corresponding changes in qualitative properties of the drug.
- (2) Development based on target—The engineering process of the biosimilar is designed to match the criteria of the reference, including factors like choice of cell line, biological processes, and others.
- (3) Similarity confirmation of the biosimilar—Degree of biosimilarity with the reference assessed via physical, chemical, and biological analyses of the biosimilar.
- (4) Regulatory authorization—Co-operating with relevant regulatory authorities to determine the minimum amount of clinical information required for biosimilarity approval.
- (5) Clinical assessment—Conducting clinical trials to confirm biosimilarity and compiling any other information required for commercialization of the biosimilar.

Biosimilars face a more stringent regulatory assessment than generics, including the need for clinical trials, which significantly increases costs and timelines to market entry of biosimilars. Establishing appropriate standards for biosimilarity remains one of the main and the most prolific topics for scientific, legislative, and regulatory debate. There are five generally accepted starting points fundamental to the assessment of biosimilar products:

- (1) we cannot try on the generics template for biosimilars, therefore the approach should be individual and specific to this drug class;
- (2) similarity should be assessed in terms of quality, safety, efficacy;
- (3) a step-wise comparability approach that proves the similarity of the similar to reference product in terms of quality is a prerequisite for the reduction of nonclinical and clinical data submitted;
- (4) the assessment of each biosimilar is based on a case-by-case approach;
- (5) the importance of pharmacovigilance is stressed.

At first sight, the process of assessing the biosimilarity of products is similar to that of assessing bioequivalence for generic medicinal products. If the development of a generic focuses on the demonstration of bioequivalence, then in order to demonstrate biosimilarity, a series of comparability studies are carried out aiming at juxtaposition of each characteristic of the biosimilar medicinal product with that of the reference medicinal product. The process includes endpoint selection; biosimilarity criteria; study design; statistical methods for data analysis [8]. Biosimilar

products are obtained from living cells or organisms with mixed, complicated structures that are difficult, if not impossible, to fully characterize. Thus, standard methods for assessing the bioequivalence of generic small molecule medicinal products cannot be properly and directly applied to assess biosimilarity.

The studies performed for demonstrating pharmaceutical quality must provide detailed data on: structural characterization and other physicochemical properties; purity (traces of residues resulting from the manufacturing process must be controlled and must not exceed acceptable levels); biological activity; excipients and raw materials; concentration and pharmaceutical form; control of the manufacturing process (in order to ensure compliance of the active substance and the finished medicinal product within the accepted intervals for the technical specifications); the stability of the active substance and the finished medicinal product during the shelf life, under the defined storage conditions [15]. It is known that biosimilar products are sensitive to environmental factors, such as light and temperature, and a minor change or variation in any critical stage of the manufacturing process could lead to a drastic change in clinical outcomes.

Factors influencing the number and types of clinical trials to be performed include: molecule complexity and available comparability data, availability of a final efficacy pharmacodynamic evaluation criterion, safety profile of the reference drug or pharmacological class, potential for immunogenicity, the possibility of extrapolation to other indications.

In case the originally authorized medicinal product has more than one indication, the efficacy and safety of biosimilar must be justified or demonstrated separately for each of the therapeutic indications [14]. At least one comparative trial (efficacy and safety) in a "sensitive" population with relevant clinical endpoints should be held. It is possible the extrapolation to other indications of the reference product, not studied during the development of biosimilar, based on the overall evidence of comparability. The acceptance of indications extrapolation is decided on a case-by-case basis, depending on the strength of scientific demonstration of comparability.

Although doctors can confidently use biologics in all their approved indications, assuming that they are given based on scientific evidence, the reference to the principle of extrapolation can only be made after sound comparability studies. Comparability is designed as a step-by-step process, tailored to each drug; stage 1 comprises the knowledge gained from initial quality comparability studies that are used to determine the extent and type of non-clinical (stage 2) and clinical (stage 3) studies required in the next stage of development, always aiming to rule out clinical performance differences between the biosimilar and the reference medicine.

In terms of interchangeability, the intervention of both medical practitioners and healthcare authorities is needed. Interchangeability refers to the possibility of replacing one drug with another that is expected to have the

same clinical effect [9]. The decision to allow interchangeable use and substitution of the reference biological medicine with the biosimilar one shall be taken at national level. Starting from the existing legal framework, the respective regulations, guidelines and recommendations are issued. As with any medication, healthcare professionals must choose carefully when prescribing, considering the patient's medical history. Therefore, any decision to replace a medicinal product with another medicinal product that has the same indication should be taken by the physician in consultation with the patient considering possible national policies on the prescription and use of biologic medicinal products. Reimbursement of biosimilars instead of originators, more national bodies dedicated to biosimilars, the reassuring data from switching studies, increased awareness of health professionals, a growing number of publications confirming the clinical similarity of biosimilars with originators and finally the accumulated positive clinical experience with biosimilars speak in favor of the increasing confidence in biosimilars [10].

In Moldova there is no precedent in biosimilars production. In March 2013, the order on the introduction of good manufacturing practice (GMP) came into force. As a result, only 16 of the 28 existing pharmaceutical companies remained. Currently Moldovan manufacturers produce over 400 generic drugs, it is the main and in fact the only focus of the domestic pharmaceutical industry. The local manufacture of the biosimilars obviously would offer an incomparable pharmacoeconomic advantage over all the existing and potential competitors.

Local biosimilars production involves reducing the time and costs for developing internal know-how and the prospect of creating contagion effects in other areas, including access to wider distribution networks and new business opportunities [13]. Consistent is the reduction of state budget expenditures for the acquisition of biosimilars and the redirection of resources to the development and implementation of national health programs. Broadening the profile of local pharmaceutical plants implies the emergence of new jobs. An inconceivable advantage is the increase of the production volume and the turnover of the national pharmaceutical industry through the export of biosimilars, the increase of the sales market. Manufacturing biosimilars in Republic of Moldova represents an excellent opportunity for increasing the operating profit margin for local manufacturers, for traditional generic drugs it's roughly 20, but for biosimilars around 30. That goes without saying that reputational benefits cannot be ignored.

Somatropin is a polypeptide consisting of 191 amino acids, by composition and chemical structure it is identical to human growth hormone of pituitary origin in terms of consistency and composition, as well as the map of peptides, isoelectric point, molecular mass, isomeric structure and biological activity. The first data confirming the effectiveness of human growth hormone (rhGH) were obtained in 1958, just 2 years after its isolation from the human pituitary gland. However, before the development

of recombinant DNA technology, hGH for the purpose of substitution therapy could only be obtained by extraction and purification from human cadaveric pituitary glands. Therefore, the market supply was very low and hGH replacement therapy was reserved only for the most severe cases of growth hormone deficiency (GHD). Elucidation of the biochemical structure and cloning of the hGH gene led to the pharmaceutical development of recombinant human growth hormone (rhGH) in the mid-1980s in the United States. With the expiry of the period of protection of the reference medicinal product on the market, the opportunity arose for the development of biosimilar medicinal products.

Omnitrope® (biosimilar rhGH; Sandoz, Kundl, Austria) approved by EMA in 2006, has since been approved worldwide, including in the US, and the product is now available in over 50 countries. Since its launch, more than 40.000 patients have been treated with biosimilar rhGH, generating a total experience of almost 107 million days of inpatient treatment [11]. The appearance of an abundant amount of rhGH allowed the treatment of several children, later and adults, as well as the extension of the area of therapeutic indications. RhGH is currently indicated in growth retardation in children due to reduced or lack of secretion of endogenous growth hormone or chronic renal failure, in case of gonadal dysgenesis (Turner syndrome), growth disorders in children born small for gestational age (SGA), and in adults in the accentuated growth hormone deficiency, also in severe burns. 14 years on the European market for the first biosimilar rhGH may be characterized by the absence of unexpected or unique adverse events, the absence of signs of increased risk of cancer or glucose homeostasis disorder compared to the reference biological medicine and other rhGH products, and the immunogenicity of biosimilar rhGH is, also similar to that of other products in that class [12].

Currently on the market of Republic of Moldova only one medicinal product from the group of anterior pituitary lobe hormones is authorized, namely Saizen®, powder and solvent for injection solution, 8 mg, marketing authorization holder Ares Trading SA, Switzerland, manufacturer Merck Serono S.P.A., Italy. Thus, we can conclude that the domestic pharmaceutical market does not face the phenomenon of competition regarding medicinal products from the ATC group H01AC01. Because rhGH medical therapy usually has a recommended duration of several years and an individualized dosing regimen with a dose calculation based on the patient's body weight, a priority issue is to increase patient adherence and adherence to treatment.

The project for innovation and technology transfer "Cultivation process of raw material based on *Pichia pastoris* with the expression of growth hormone", with registration number 21.80015.8007.244T has started in January 2021, within the State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemitanu", the Scientific Center of Medicine from Republic of Moldova. The project is funded by the National Agency for Research and Development

from Republic of Moldova and co-financier is the Pharmaceutical Enterprise Balkan Pharmaceuticals, Republic of Moldova.

The project has the following objectives:

- perform the technological transfer for the manufacturing process of a new biosimilar rhGH product and improve the innovation capacity of pharmaceutical manufacturer Balkan Pharmaceuticals;
- obtain scientific results during the technological transfer process;
- improve the collaboration among the co-financier Pharmaceutical manufacturer Balkan Pharmaceuticals, the scientific research institutes and the National Agency for Research and Development of the Republic of Moldova;
- increase the capacity of assimilation into manufacturing process of the research results obtained during the project;
- create the WCB (working cell bank) of *Pichia pastoris* culture for short and long term storage, with subsequent inoculum preparation and growth of *Pichia pastoris* culture with rhGH expression.

The final result of the project is the technology transfer of cultivation process of the vector *Pichia pastoris* with the expression of rhGH: creation of working cell bank, preparation of inoculum and growth of *Pichia pastoris* culture, and elaboration of documentation related to these activities.

The excellence of the project consists not only in the manufacture of the first biosimilar in the Republic of Moldova - an exhaustive goal in itself, but also in the unprecedented production of recombinant human growth hormone (rhGH) in Republic of Moldova. This ensures the empirical exploration of the most promising segment of the global pharmaceutical industry with the fastest growth rate. The realization of the project will involve the endowment of the local plant with appropriate equipment and machinery and improving the manufacturing facilities, implementing highly performant analytical and control methods as well as increasing employees' qualification. Per se the field of biosimilars is eminently boundless for various local and international scientific researches in the huge range of the disciplines of medicine and pharmacy.

The relevance of the project "Cultivation process of raw material based on *Pichia pastoris* with the expression of growth hormone" is ensured by:

- strengthening the innovation capacity of the beneficiary economic agent (project co-financier) and increasing the product portfolio;
- obtaining in perspective a new biosimilar product, corresponding to regulation requirements in the field of biological medicinal products for human use;
- the implementation of a biosimilar rhGH in the manufacturing of the project co-financier who is at the same time the beneficiary of the results obtained from the research activity;

- the novelty resulting from the complexity of biosimilar cultivation methods, and complex analytical testing, using high performance methods and high-technological equipment for *Pichia pastoris* culture;
- obtaining a working cell bank and the cultivation of *Pichia pastoris* with the expression of rhGH for the first time in Republic of Moldova;
- partners who have specialists and necessary equipment for the documentation works and implementation into manufacturing process of the new elaborated technologies.

The implementation of the project "Cultivation process of raw material based on *Pichia pastoris* with the expression of growth hormone" involves the development of activities in the frontier fields: biochemistry, genetics, pharmaceutical chemistry, pharmaceutical technology, pharmacology, clinical medicine. The activities in the project are supported by the partnership with a university and a research center, involving specialists in several fields: chemistry, biology, genetics, biochemistry, pharmacy, medicine, computer science. The results of the interdisciplinary collaboration will be documentation works, scientific research, cultivation and conditioning technologies, genetic studies, technological production regulations, compartments of the authorization documentation, which will demonstrate the multidisciplinary character of the proposed topic.

The local manufacture of the rhGH obviously offers an incomparable pharmacoeconomic advantage both over the only competitor existing today on the market of Republic of Moldova - Saizen® and over the potential ones.

Given that recombinant human growth hormone (rhGH) is purchased from the state budget according to the criterion - at the lowest price without VAT, in accordance with all requirements, including national registration in the State Nomenclature of Medicines of the Republic of Moldova, the priority of the domestic product is obvious based only on the classic formula of price calculation by summing the cost price and the manufacturer's margin.

The realization of the project "Cultivation process of raw material based on *Pichia pastoris* with the expression of growth hormone" involves the establishment of partnership and collaboration relations with the most important and promising players worldwide on the biosimilars market.

REFERENCES

1. Espiritu M.J., Collier A.C., Bingham J. *A 21st-Century Approach to Age-Old Problems: The Ascension of Biologics in Clinical Therapeutics*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands: 2014. [PubMed] [Google Scholar]
2. Miller H.I. Biotech's defining moments. *Trends Biotechnol.* 2007;25:56-59. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.12.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Wan H. An Overall Comparison of Small Molecules and Large Biologics in ADME Testing. *ADMET DMPK.* 2016;4:1-22. doi: 10.5599/admet.4.1.276. [CrossRef] [Google Scholar]
4. Scott Morton F.M., Stern A.D., Stern S. The Impact of the Entry of Biosimilars: Evidence from Europe. *Rev. Ind. Organ.* 2018;53:173-210. doi: 10.1007/s11151-018-9630-3. [CrossRef] [Google Scholar]
5. Zalberg J. Biosimilars are coming: Ready or not. *Intern. Med. J.* 2018;48:1027-1034. doi: 10.1111/imj.14033. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Thornton G. *Bio-Dynamism: Insights into the Biosimilars Market* / Grant Thornton India. Grant Thornton India LLP; New Delhi, India: 2013. [Google Scholar]
7. Sekhon B., Saluja V. Biosimilars: An overview. *Biosimilars.* 2011;1:1-11. doi: 10.2147/BS.S16120. [CrossRef] [Google Scholar]
8. Mellstedt H., Niederwieser D., Ludwig H. The challenge of biosimilars. *Ann. Oncol.* 2007;19:411-419. doi: 10.1093/annonc/mdm345. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Rifkin R.M., Peck S.R. Biosimilars: Implications for Clinical Practice. *J. Oncol. Pract.* 2017;13:24s-31s. doi: 10.1200/JOP.2017.025734. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. De Mora F. Biosimilar: What it is not. *Br. J. Clin. Pharm.* 2015;80:949-956. doi: 10.1111/bcp.12656. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Geynisman DM, De Velasco G, Sewell KL, Jacobs I. Biosimilar biologic drugs: a new frontier in medical care. *Postgrad Med.* 2017;129(4):460-70. doi: 10.1080/00325481.2017.1311196 [PubMed] [Google Scholar]
12. Kawalec P, Stawowczyk E, Tesar T, Skoupa J, Turcu-Stolica A, Dimitrova M, et al. Pricing and Reimbursement of Biosimilars in Central and Eastern European Countries. *Front Pharmacol.* 2017;8:288 doi: 10.3389/fphar.2017.00288 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
13. European Medicines Agency—Multidisciplinary—Multidisciplinary: biosimilar: EMA; 2017. [05/06/2017] Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000408.jsp&mid=WC0b01ac058002958c. [Google Scholar]
14. Rémuzat C, Dorey J, Cristeau O, Ionescu D, Radière G, Toumi M. Key drivers for market penetration of biosimilars in Europe. *J Mark Access Health Policy.* 2017;5(1):1272308 doi: 10.1080/20016689.2016.1272308 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
15. Rémuzat C, Kapuśniak A, Caban A, Ionescu D, Radière G, Mendoza C, et al. Supply-side and demand-side policies for biosimilars: an overview in 10 European member states. *Journal of Market Access & Health Policy.* 2017;5(1). DOI: doi: 10.1080/20016689.2017.1307315 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

CZU: 615.31.015.4:546.32+616.152.32

**EVALUAREA COMPARATIVĂ A BIODISPONIBILITĂȚII
PREPARATELOR PERORALE
CU CONȚINUT DE POTASIU ȘI SPIRONOLACTONĂ****COMPARATIVE EVALUATION OF THE BIOAVAILABILITY
FOR ORAL MEDICINES
WITH POTASSIUM AND SPIRONOLACTONE****Ecaterina Mazur^{1,2}, Vladimir Valica^{1,2}, Simona Negreș³,
Elena Donici^{1,2}, Sergiu Parii¹, Livia Uncu^{1,2}**¹Scientific Center of Medicine Fellow*Nicolae Testemitsanu* State University of Medicine and Pharmacy of the Republic of Moldova² Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Nicolae Testemitsanu
State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, the Republic of Moldova³Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy,
Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania.**Autor corespondent:** livia.uncu@usmf.md

Rezumat. Conform studiilor recente, una dintre cele mai răspândite cauzele a hipertensiunii arteriale este un consum ridicat de sare (clorură de sodiu) și un aport scăzut de potasiu (K⁺). Creșterea aportului de potasiu de 1,64 g poate reduce riscul de accident vascular cerebral cu 21% (p = 0,0007) și a bolilor cardiovasculare. În Republica Moldova există produse medicinale cu diferitele săruri de K⁺ care pot fi utilizate ca supliment mineral pentru tratarea deficienței de K⁺ (hipopotasemie). Astfel, a fost necesar să se stabilească unor parametri pentru a elabora medicamentul cu cea mai înaltă biodisponibilitate. Datele obținute vor fi utilizate pentru a selecta compoziția produsului medicamentos combinat cu cea mai mare biodisponibilitate, eficacitate și siguranță.

Cuvinte cheie: HIPOPOTASEMIE, POTASIU, SPIRONOLACTONE, ASPARTAT DE POTASIU, BIODISPONIBILITATE

Summary. According to recent studies, one of the widely-spread causes of the arterial hypertension is a high consumption of salt (sodium chloride) and a low potassium (K⁺) intake. An increase in potassium intake of 1.64 g may reduce the risk of stroke by 21% (p=0.0007) and cardiovascular disease. There were found the different salts of K⁺, which can be used as a mineral supplement to treat K⁺-deficiency (hypopotassemia) in the Republic of Moldova. Thus, it was necessary to establish some parameters in order to find the medicine with the highest bioavailability. The obtained data will be used in order to select the composition to create the fixed-dose drug combination with the highest bioavailability, efficacy and safety.

Keywords: HYPOPOTASSEMIA, POTASSIUM, SPIRONOLACTONE, POTASSIUM ASPARTATE, BIOAVAILABILITY

INTRODUCTION

Arterial hypertension (AH) is a major public health problem due to its high prevalence all around the globe [1, 2, 3, 4]. Around 7.5 million deaths or 12.8% of the total of all annual deaths worldwide occur due to high blood pressure [5].

According to the obtained data from National Bank of Statistics of the Republic of Moldova it was established 23 386 deaths caused by cardiovascular disease (CVD) in the Republic of Moldova [6]. High blood pressure is the cause of about 62% of strokes and 49% of acute heart events, complications that could be prevented by proper blood pressure control. [7]. Arterial hypertension is a major risk factor for cardiovascular disease (CVD), including stroke, heart attack, heart and kidney failure, and aneurysm. More than one billion adults worldwide have hypertension with up to 45% of the adult populace being affected with the

disease [8]. Recent estimates have suggested the number of patients with hypertension could increase as much as by 15 to 20%, which could reach close to 1.5 billion adults with AH by 2025 [9].

It is well-known relationship between AH and highly sodium intake. According to recent studies, one of the widely-spread causes of the AH is a high consumption of salt (sodium chloride) and a low potassium (K⁺) consumption. Therefore, the World Health Organization (WHO) currently recommends for adults a consumption not higher than 5 g of potassium salt daily [10]. The ratio of sodium and potassium in the urine in AH exceeds 5.7 [11]. Unlike sodium, potassium increases blood flow and promotes vasodilatation as a result of hyperpolarization of vascular smooth muscle cell membranes by activation of Na⁺/K⁺ - ATP-ase and potassium channels. K⁺ ions are also released by endothelial cells in response to neurohumoral mediators and

contribute to the process of endothelium-dependent vascular relaxation, being a component of endothelium-derived hyperpolarization factor-mediated responses [12, 13].

Moderate intake of potassium with food reach in K^+ or over-the-counter medicines (OTC) can lead to decrease in blood pressure (BP) in individuals with hypertension, especially in the absence of drug therapy. In contrast to sodium, dietary potassium has beneficial effects on BP and cardiovascular health [14, 15, 16]. An increase in potassium intake of 1.64 g may reduce the risk of stroke by 21% ($p=0.0007$) and CVD in general. Increasing the concentration of potassium in the blood plasma improves ventricular repolarization and reduces the risk of arrhythmia in patients with hypertension taking non-potassium-sparing diuretics, which can disrupt glucose tolerance and increase the risk of developing type 2 diabetes mellitus (DM2) by reducing insulin secretion in response to glucose loading [17, 18]. The administration of potassium supplements with thiazide diuretics avoids impaired insulin secretion in response to glucose loading [19].

Most patients with [AH](#) are effectively treated with diuretics. Antihypertensive therapy with diuretics such as loop (furosemide, torasemide, ethacrynic acid) and thiazides (hydrochlorothiazide, indapamide) lead to electrolyte abnormalities in particularly hypopotassemia. Hypopotassemia is present in up to 20% of hospitalized patients, 40% of patients taking diuretics, and 17% of patients with cardiovascular conditions [20]. Because loop and thiazide diuretics increase sodium delivery to the distal segment of the distal tubule, this increases potassium loss (potentially causing hypopotassemia) because the increase in distal tubular sodium concentration stimulates the aldosterone-sensitive sodium pump to increase sodium reabsorption in exchange for potassium and hydrogen ion, which are lost to the urine. The increased hydrogen ion loss can lead to metabolic alkalosis [21].

Unlike loop and thiazide diuretics, potassium-sparing diuretics (spironolactone) inhibit the actions of aldosterone (aldosterone receptor antagonists) at the distal segment of the distal tubule, therefore less potassium and hydrogen are lost to the urine [21]. Thus, potassium-sparing diuretics do not produce hypopotassemia as the loop and thiazide diuretics. Due to this they are called potassium-sparing diuretics and are widely-spread in medical practice.

Dietary supplementation of potassium can lower blood pressure in normal and some hypertensive patients. Again, in contrast to NaCl restriction, the response to potassium supplementation is slow to appear, taking approximately 4 weeks. Such supplementation reduces the need for antihypertensive medicines. "Salt-sensitive" hypertension responds particularly well, perhaps, in part, because supplementation with potassium increases the urinary excretion of sodium chloride. Potassium supplementation may even reduce organ system complications (e.g., stroke) [22].

The use of moderate doses of potassium with food does not cause severe hyperpotassemia or deterioration of kidney function in people with normal kidney function, even against the background of renin-angiotensin-aldosterone system blockers. Special care should be taken only in patients with severe renal impairment [23]. Increased potassium intake is recommended for patients without impaired renal potassium metabolism to control elevated blood pressure and prevent stroke [24, 25].

Due to intensive development of the pharmaceutical industry, there is a great variety of medicines reach in potassium salt for oral administration. The absence of domestic effective product for the correction of potassium deficiency is disappointing. From a pharmaco-economical point of view, they are planned to be more affordable than foreign analogues for patients. Due to this, it could provide people with the most efficient and least expensive medicines. At the same time, it had to lead to efficient health care and had to improve the quality of an individual's life. Therefore, the creation of domestic effective products containing potassium is very actual and important aim for our country. Consequently, this product has to comply with high bioavailability and good tolerability with long-term use.

MATERIAL AND METHODS

It was applied the widely complex study of using the next databases: PubMed, Medline, Scopus, HINARI, SciSearch © The Thomson Corporation. In this present work 32 articles were analyzed. It was found the different salt of potassium, which is a source of potassium and is used as a mineral supplement to treat potassium deficiency. They are used as a transporter that carries potassium into the cells. According to the Nomenclature of the Republic of Moldova (RM), potassium medicines and [supplement](#) used to prevent and to treat [low potassium](#) is found in the various form of salts, such as: chlorides, aspartate, orotate and others, as noted in table 1.

Due to the different route of administration and the dose of medicine, they can be used in patients with hypopotassemia on the different levels. Hypopotassemia is classified as mild (serum potassium, greater than 3 to 3.5 mEq/L), moderate (serum potassium, 2.5 to 3 mEq/L), or severe (serum potassium, less than 2.5 mEq/L) [26]. Most cases of mild-to-moderate hypopotassemia may be corrected with oral potassium supplements and medicines (table 1).

Potassium chloride is should be given by intravenous route strictly, because large amounts for long-term administration cause damage to the small intestine, where absorption occurs 90% potassium. Potassium iodide is used as a source of iodine (I_2) and as a mineral supplement to prevent and to treat I_2 deficiency. In addition, potassium iodide can block absorption of radioactive iodine by the thyroid gland through flooding the thyroid with non-radioactive iodine and preventing intake of radioactive molecules, thereby protecting the thyroid from cancer causing radiation. Moreover, salt iodization is the preferred policy to prevent iodine deficiency and associated disorders in the Republic of Moldova, due to nuclear accident that occurred in the North of Ukraine, Chernobyl. [27].

Table 1. Oral potassium medicines and supplement used in the different salts

Medicine name	Potassium salt	Pharmaceutical form	Potassium salt dose	Elemental Potassium dose
Iodomarin	Potassium Iodide	tablet	100 µcg 200 µcg	23 µcg 47 µcg
Panangin	Potassium Aspartate Magnesium Aspartate	tablet	158 mg 140 mg	36 mg (0.92 mEq)
Panangin® Forte	Potassium Aspartate Magnesium Aspartate	tablet	316 mg 280 mg	72 mg (1.8 mEq)
Miostenil	Potassium Aspartate Magnesium Aspartate	tablet	250 mg 250 mg	57 mg (1.45 mEq)
Potassium orotate	Potassium Orotate	tablet	500mg	100 mg (2.5 mEq)
KCl	Potassium Chloride	tablet retard	750mg 1000mg 1500mg	393mg (10 mEq) 524mg (13.4 mEq) 786mg (20.1 mEq)
Kalinor	Potassium Citrate monohydrate Potassium Hydrocarbonate	tablet efferv.	2170mg 2057mg	246mg (6.3 mEq) 803mg (20.5 mEq)

Potassium aspartate is active in the form of the levorotatory stereoisomer compared to dextrorotatory. It was proved by clinical trials in patients receiving furosemide and digoxin concomitantly. They were provided for 14 days with L-aspartic acid potassium and magnesium salt (K-Mg L-aspartate), D-aspartic acid potassium and magnesium salt (K-Mg-D-aspartate) and DL-aspartic acid potassium and magnesium salt (K-Mg-DL-aspartate). Applying atomic emission spectroscopy to analyze the blood, it was shown that L-aspartic acid potassium and magnesium salt compensated the most for the potassium deficiency compared to other aspartate stereoisomers [28].

Thus, various salt of potassium for oral route of administration have the different rate and active fraction of the initial dose of a medicine that successfully reaches the systemic circulation in a chemically unchanged form (bioavailability). Bioavailability, the "term" used is "F", is defined as the active fraction of drug from its pharmaceutical dosage form administered that gains access to the central circulation, i.e., the circulating post-portal venous blood. Bioavailability, F, refers to the extent a substance or medicine becomes completely available to its intended biological destination. More accurately, F is a measure of the rate and fraction of the initial dose of a drug that successfully reaches either; the site of action or the bodily fluid domain from which the medicine's intended

targets have unimpeded access [29, 30, 31]. Therefore, F for a medicine administered intravenously is 100%. An F of 1.00 is equivalent to a bioavailability of 100%. Unlikely IV, just a part of a dose administered orally is "available" to the target sites of action. It is due to the number of factors, such as: the passage through the gastrointestinal (GI) system and hepatic first-pass metabolism. Therefore, the influence of oral pharmaceutical form on medicine's bioavailability is generally in the following order: Solution > Emulsion > Suspension > Powder > Capsule > Tablet [32].

It was applied a Lipinski Rule of Five states, which is used in order for the medicine to be orally active it must have: Not more than 5 hydrogen bond donors (OH and NH groups); Not more than 10 hydrogen bond acceptors (notably N and O); A molecular weight under 500 g/mol; A partition coefficient log P less than 5. Therefore, the different salt of potassium used in hypopotassemia have been analyzed, as noted in table 2.

F is usually assessed by determining the area under the plasma concentration-time curve, as noted in figure. By plotting plasma concentrations of the medicine versus time, we can measure the area-under-the-curve (AUC). This curve reflects the extent of the medicine absorption. F of the medicine administered orally is the ratio of the area calculated for oral administration compared with the area calculated for IV injection (as noted in equation 1).

Table 2. Characteristic values of medicines used in hypopotassemia

Name Value	K ⁺ Aspartate	K ⁺ Orotate	K ⁺ Chloride	K ⁺ Citrate	K ⁺ Bicar-bonate	Spiro-nolactone
Molecular Weight, g/mol	209.28	194.19	74.55	306.39	100.115	416.6
Hydrogen Bond Donor Count	1	2	0	1	1	0
Hydrogen Bond Acceptor Count	5	4	1	7	3	5
Rotatable Bond Count	1	1	0	2	0	2
Topological Polar Surface Area	106 Å ²	98.3 Å ²	0 Å ²	141 Å ²	60.4 Å ²	85.7 Å ²
Formal Charge	0	0	0	0	0	0
Defined Atom Stereocenter Count	1	0	0	0	0	7
Covalently-Bonded Unit Count	3	2	2	4	2	1

Note: Data deposited in or computed by PubChem < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> >

$$F = (AUC_{oral} / AUC_{parenteral}) * 100\% \quad (1)$$

Key measurements are examined: $AUC_{(0-last)}$ is defined as the area under the concentration-time curve from dosing (time 0) to the time of the last measured concentration; Maximum concentration (C_{max}) is defined as the maximum observed medicinal concentration observed in the blood, reported in units of ng/mL; Time of maximum concentration (t_{max}) is defined as the time at which the C_{max} occurs, reported in units of h. AUC is directly proportional to the total amount of unchanged drug that reaches systemic circulation [30].

Plasma drug concentration increases with extent of absorption; the maximum (peak) plasma concentration is reached when drug elimination rate equals absorption rate. Bioavailability determinations based on the peak plasma concentration can be misleading because drug elimination begins as soon as the drug enters the bloodstream. It has been established that 10% of the dose of the potassium orotate taken orally is absorbed. It is converted into orotidine-5-phosphate in the liver and is excreted in the urine (30% as metabolites). The main route of elimination of potassium aspartate is renal (about 90% of potassium is excreted by the kidneys daily). The remaining 10% are excreted through the digestive tract.

Diuretic use is a common cause of renally mediated hypopotassemia [33]. The widely spread using of the diuretics such as loop (furosemide, torasemide, ethacrynic acid) and thiazides (hydrochlorothiazide, indapamide) is more likely to induce hypopotassemia than

spironolactone. Unlikely loop and thiazide diuretics, spironolactone is potassium-sparing diuretics that blocks the aldosterone receptors due to similar chemical structure with aldosterone. Thus, it helps make more urine and to lose excess water from the human body with less K^+ lost to the urine [21].

Recently, it was demonstrated that after a single oral dose of spironolactone, 7 alpha-thiomethylspironolactone is the main metabolite and that unchanged spironolactone reaches maximum serum concentrations which are in the same order of magnitude as canrenone (see figure 2) [34]. Both spironolactone and 7 alpha-thiomethylspironolactone are known to possess anti-mineralocorticoid activity, and they may be mainly responsible for the activity of spironolactone. The uptake from the gastrointestinal tract is at least 70%. The protein binding averages 98%. The half-life is 18 to 20h after doses of 100 to 400m.g. It is eliminated as metabolites via the urine and the bile.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The last few decades have witnessed an increase of importance of medicines bioavailability. It was shown that aspartate and orotate of potassium salt are more efficient than other in oral pharmaceutical form. First of all, these organic salts play some important roles: as a source of potassium and as a transporter that carry potassium into the cells, and other benefits are specific for these acids.

Thus, orotic acid exhibits antioxidant properties, since it is a key intermediate in the biosynthetic pathway of pyrimidines that promotes the synthesis of enzymes which act as free radical scavengers. Also, aspartic acid serves as a neurotransmitter and takes a part in the synthesis of other amino acids (Arginine, Lysine, Methionine, Isoleucine) and some nucleotides. It was established, that the L-aspartic acid potassium salt is the more bioactive form than its dextrorotatory stereoisomers. Due to combination with spironolactone (potassium-sparing diuretic), it could achieve the successful result in patient with hypopotassemia. Therefore, the creation of domestic effective medicines with the salt of potassium and spironolactone for the correction of potassium deficiency, which have high bioavailability and good tolerability with long-term use, is an urgent problem.

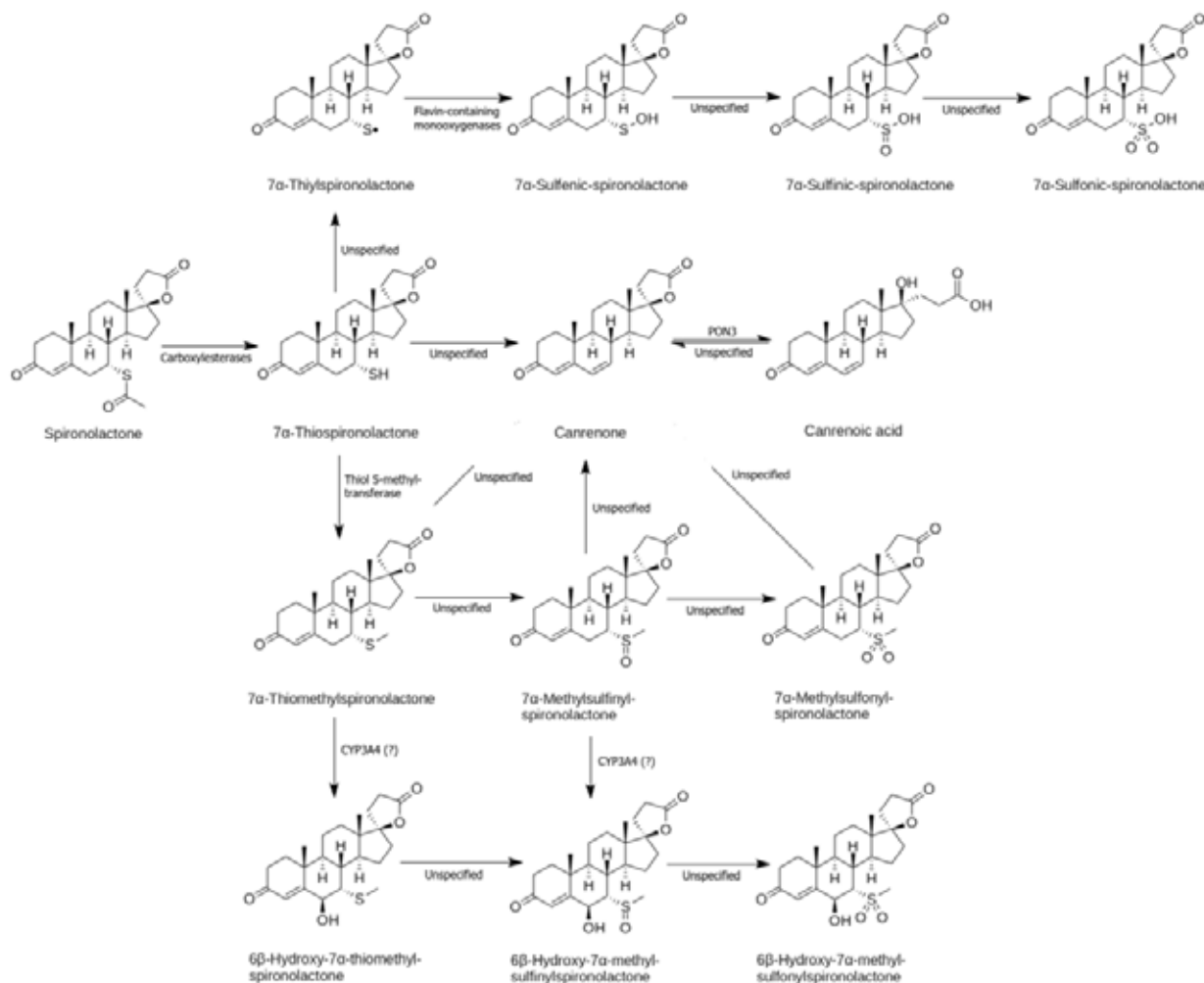


Figura 1. Spironolactone metabolism in humans.

REFERENCES

1. Erem C., Hacıhasanoglu A., Kocak M., Deger O., Topbas M. Prevalence of prehypertension and hypertension and associated risk factors among Turkish adults: trabzon hypertension study. *Journal of Public Health*. 2009;31(1):47–58. doi: 10.1093/pubmed/fdn078
2. Ahmed A., Rahman M., Hasan R., et al. Hypertension and associated risk factors in some selected rural areas of Bangladesh. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2014;2(3):p. 925. doi: 10.5455/2320-6012.ijrms20140816.
3. Mishra C. P., Kumar S. Risk factors of hypertension in a rural area of Varanasi. *Indian Journal of Preventive and Social Medicine*. 2011;42(1):101–111
4. Abebe S. M., Berhane Y., Worku A., Getachew A. Prevalence and associated factors of hypertension: a cross-sectional community based study in Northwest Ethiopia. *PLoS ONE*. 2015;10(4) doi: 10.1371/journal.pone.0125210.e0125210
5. Mendis S. World Health Organisation; 2010. Global status report on non-communicable diseases 2010.
6. Datele statistice mortalității maladiilor de origine cardiovasculară în RM 2019 conform Băncii naționale de Statistică a RM Available at: <https://statbank.statistica.md/PxWeb/pxweb/ro/20%20Populatia%20si%20procese-le%20demografice/20%20Populatia%20si%20procese-le%20demografice__POPrec__POP040/POP041400rci.px/?rxid=b2ff27d7-0b96-43c9-934b-42e1a2a9a774> [accessed May 2021]

7. Ministerul Sănătății al Republicii Moldova. Hipertensiunea arterială la adult. Protocol clinic național (PCN-1). Chișinău, 2016, p. 8. [online] Available at: http://89.32.227.76/_files/15279-PCN-%2520HTA%2520%252B%2520FA%2520%2528fi%2529.pdf [accesat 3 iulie 2019].
8. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *Lancet*. 2017 Jan 07;389(10064):37-55.
9. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005 Jan 15-21;365(9455):217-23.
10. World Health Organization . Guideline: Sodium Intake for Adults and Children. World Health Organization (WHO); Geneva, Switzerland: 2012
11. Ettehad D., Emdin C.A., Kiran A. et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2016;387:957-967.
12. Filippini T., Violi F., D'Amico R., Vinceti M. The effect of potassium supplementation on blood pressure in hypertensive subjects: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2017;230:127-135. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.12.048.
13. Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Mar;290(3):R546-52. doi: 10.1152/ajpregu.00491.2005. PMID: 16467502.
14. Aburto N.J., Hanson S., Gutierrez H., Hooper L., Elliott P., Cappuccio F.P. Effect of increased potassium intake on cardiovascular risk factors and disease: Systematic review and meta-analyses. *Br. Med. J.* 2013;346: f1378. doi: 10.1136/bmj.f1378.
15. D'Elia L., Barba G., Cappuccio F.P., Strazzullo P. Potassium Intake, Stroke, and Cardiovascular Disease: A meta-analysis of Prospective Studies. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2011; 57:1210-1219. doi: 10.1016/j.jacc.2010.09.070.
16. D'Elia L., Iannotta C., Sabino P., Ippolito R. Potassium rich-diet and risk of stroke: Updated meta-analysis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2014; 24:585-587. doi: 10.1016/j.numecd.2014.03.001.
17. Averin E.E., Nikitin I.G., Nikitin A.E. Hypokalemia: a review of the current state of the problem. *Medical alphabet*. 2018;3(32 (369)):12-18 [Аверин Е.Е., Никитин И.Г., Никитин А.Э. Гипокалиемия: обзор современного состояния проблемы. *Медицинский алфавит*. 2018;3(32 (369)):12-18]
18. Averin E.E. The safety of torasemide in the treatment of chronic heart failure: results of a randomized crossover study. *Medical Council*. 2016;13:81-84 (in Russ.) [Аверин Е.Е. Безопасность торасемида в комплексной терапии хронической сердечной недостаточности: результаты рандомизированного перекрестного исследования. *Медицинский совет*. 2016;13:81-84]
19. Ekmekcioglu C., Elmadfa I., Meyer A.L., Moeslinger T. The role of dietary potassium in hypertension and diabetes. *J. Physiol. Biochem*. 2016;72:93-106
20. Elliott TL, Braun M. Electrolytes: Potassium Disorders. *FP Essent*. 2017, vol. 459, p.21-28
21. Richard E. Klabunde, PhD Cardiovascular Pharmacology Concepts Available at: <https://www.cvpharmacology.com/diuretic/diuretics> [accessed May 2021]
22. Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Mar;290(3):R546-52. doi: 10.1152/ajpregu.00491.2005. PMID: 16467502.
23. Cappuccio F.P., Buchanan L.A., Ji C. et al. Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials on the effects of potassium supplements on serum potassium and creatinine. *BMJ Open*. 2016;6(8):e011716. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-011716.
24. Averin E.E., Nikitin A.E., Nikitin I.G., Sozykin A.V. The place of ramipril in modern guidelines for the management of patients with cardiovascular disease. *Medical Advice*. 2018;21:34-41 (in Russ.) [Аверин Е.Е., Никитин А.Э., Никитин И.Г., Созыкин А.В. Место рамиприла в современных рекомендациях по ведению пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. *Медицинский совет*. 2018;21:34]
25. Averin E.E. The safety of complex therapy of chronic heart failure: results of a randomized, cross-sectional study of the BASTION. *International Journal of Heart and Vascular Diseases*. 2016;4(11):40-46 (in Russ.) [Аверин Е.Е. Безопасность комплексной терапии хронической сердечной недостаточности: результаты рандомизированного перекрестного исследования БАСТИОН. *Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний*. 2016;4(11):40-46]
26. Brophy DF. Disorders of potassium and magnesium homeostasis. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, et al., editors. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 9th ed. New York, New York: McGraw-Hill; 2014.
27. Obreja G., Raevschi E., Penina O. Informing national salt reduction strategy. *Mold. Med. J.* 2018;61:9-16
28. Fedorova O., 2014, *Preparate de potasiu și magneziu în practica clinică modernă*, "Likaru-practice, vol. 1, nr. 1, p. 99 [Федорова О., 2014, Препараты калия и магния в современной клинической практике," *Ликару-практику*, vol. 1, nr. 1, p. 99]
29. Herkenne C, Alberti I, Naik A, Kalia YN, Mathy FX, Pr at V, Guy RH. In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharm Res*. 2008 Jan;25(1):87-103.
30. Currie GM. Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. *J Nucl Med Technol*. 2018 Sep;46(3): 221-230.
31. Chow SC. Bioavailability and Bioequivalence in Drug Development. *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat*. 2014;6(4):304-312.
32. Melikian AP, Cheng LK, Wright GJ, Cohen A, Bruce RE. Bioavailability of potassium from three dosage forms: suspension, capsule, and solution. *J Clin Pharmacol*. 1988 Nov;28(11):1046-50. doi: 10.1002/j.1552-4604.1988.tb03128.x. PMID: 3243918.
33. Schulman M, Narins RG. Hypokalemia and cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 1990;65(10):4E-9E
34. Varin F, Tu TM, Beno t F, Villeneuve JP, Th eor t Y (February 1992). "High-performance liquid chromatographic determination of spironolactone and its metabolites in human biological fluids after solid-phase extraction". *Journal of Chromatography*. 574 (1): 57-64. doi:10.1016/0378-4347(92)80097-A. PMID 1629288.

TEHNOLOGIE FARMACEUTICA

CZU: 615.32:638.135

INFLUENȚA UNOR FACTORI EXTERNI ASUPRA COMPOZIȚIEI ȘI EFICIENȚEI TERAPEUTICE A PROPOLISULUI

INFLUENCE OF EXTERNAL FACTORS ON THE COMPOSITION AND THERAPEUTIC EFFICIENCY OF PROPOLIS

S. Tincu¹, F. Macaev², D. S. Dezmirean³, N. Eremia⁴, A. Znagovan¹, A. Botnaru¹¹ Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;² Institutul de Chimie afiliat Academiei de Științe al Republicii Moldova, Chișinău, Republica Moldova³ Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, România⁴ Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova**Autor corespondent:** alexandru.znagovan@usmf.md

Abstract. From therapeutic point of view, propolis is one of the most valuable bee products, which proves its use in various pharmaceutical forms, and further research of this product worldwide. However the complex and diverse composition requires a complex study of both propolis and the factors that lead to the modification of the composition and respectively inevitably to the change of the therapeutic properties. This paper is a synthesis of the effects of the use of herbicides and insecticides on the composition and therapeutic properties of propolis. It was established that the presence of certain herbicides and insecticides propolis samples collected in different geographic areas, as is concluded to decrease the effect of the presence of the therapeutic properties of propolis in the presence of polluting factors mentioned above.

Keywords: Propolis, herbicides, insecticides, free radicals, therapeutic potential.

Rezumat. Din punct de vedere terapeutic, propolisul reprezintă una dintre cele mai valoroase substanțe biologice active apicole, fapt dovedit de utilizarea lui tot mai largă în diverse prescripții și forme farmaceutice, și studiul lui centrat, reluat în pandemie, la nivel mondial. Compoziția complexă și diversă, necesită un studiu la fel de complex, atât al propolisului, cât și al factorilor ce pot duce la modificarea compoziției, și respectiv, la schimbarea potențialului terapeutic. Lucrarea reprezintă o sinteză prioritar axată pe rezultatele studiilor efectelor utilizării erbicidelor și insecticidelor asupra compoziției și potențialului terapeutic al propolisului. Astfel, prezența unor erbicide și insecticide în mostrele de propolis colectat în diferite zone geografice și climacterice, influențează direct compoziția propolisului, condiționând diminuarea substanțială a potențialului terapeutic.

Cuvinte cheie: Propolis, erbicide, insecticide, radicali liberi, potențial terapeutic.

INTRODUCERE

Comunitățile științifice din întreaga lume atestă fenomenul tot mai agresiv de poluare al mediului. Un factor semnificativ al poluării este determinat și de utilizarea masivă, irațională a erbicidelor și insecticidelor sintetice. Impactul lor asupra vieții și sănătății este unul foarte mare, indiferent, că se consumă produse native sau procesate, poluate direct sau indirect cu erbicidele și insecticidele utilizate în agricultură. Printre produsele indirect poluate se numără și produsele apicole, în special mierea, polenul, propolisul, poluate. Propolisul reprezintă un produs apicol cu proprietăți biologice și terapeutice dovedite antibacteriene, antivirale, antitumorale, antifungice, antioxidante, imunomodulatoare etc. [5]. Când privește compoziția chimică complexă, preponderent este reprezentată de flavonozide, alte substanțe, precum aldehidele aromatice, acizii fenolici, acizii organici, minerale, vitamine și aminoacizi, conținutul lor fiind determinat de mai mulți factori: flora specifică, condițiile climacterice, gradul de poluare a zonei geografice în care albinele activează.

SCOPUL LUCRĂRII

Studiul realizărilor în domeniul cunoașterii influenței utilizării erbicidelor și insecticidelor asupra compoziției și potențialului terapeutic al propolisului, cu specificarea particularităților specifice (colectare, depozitare, procesare) și influenței și interacțiunii lor în asigurarea efectului terapeutic.

MATERIALE ȘI METODE

Analiză sistematică bazată pe interogarea bazei de date PubMed, motorului de căutare Google Scholar Academic research, literaturii de specialitate, utilizând cuvinte cheie adecvate studiului și evaluarea manuală a articolelor returnate. La baza acestui studiu stă metodologia de cercetare prin abordare sistemică, care permite determinarea factorilor și mijloacelor de descriere și reprezentare a obiectului studiat, obiectivele de analizat considerându-le ca un set de elemente, a căror relație determină proprietățile obiectului cercetării - propolisului, ca un tot întreg și total interdependent de condițiile mediului.

REZULTATE

Savanții din domeniu din toată lumea anual publică și descriu diverse rezultate ale studiilor produselor apicole, propolisului. Cele mai multe publicații științifice în acest domeniu revin Braziliei, Argentinei, Peru, Cili, Boliviei, SUA ș.a. Astfel, cercetătorii brazilieni, au analizat patru tipuri de propolis (maro, verde, roșu și galben) în total 19 probe, și au fixat concentrațiile de glifosat, acid aminometilfosfonic (AMPA), picloram și atrazină în diferite tipuri de propolis brut din Brazilia [3] utilizând ca metodă de analiză cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC). Din totalul probelor de propolis, 47% au dat rezultate pozitive pentru erbicidele cu conținut de atrazină de la 5 μg/g până la 17,4 μg/g și AMPA de 10,2 μg/g până la 11,3 μg/g, nu s-au identificat probe pozitive pentru glifosat; totuși, prezența acidului aminometilfosfonic (AMPA) dovedește existența sa. La fel în cadrul altor studii sau analizat reziduuri de pesticide în propolisul brut colectat din Spania și Chile [1], componentele au fost detectate și cuantificate de către cercetători utilizând spectrometria de masă prin cromatografie în fază gazoasă obținându-se următoarele rezultate: triamidefon prezent în 70,1% din probe cu concentrații cuprinse între 0,35 și 42,17 mg/kg și dicofol detectat în 7,5% din probe cu concentrații între 0,39 și 2,83 mg/kg. Diclorofluanid, procimidonă, folpet, propam și metazaclor au fost, de asemenea, detectate, dar într-un număr mic de probe. Reziduurile de pesticide și metale grele în propolisul procesat comercial (Fig Nr. 2) la fel au fost studiate, astfel utilizând cromatografia gazoasă-spectrometrie de masă (GC-MS) au fost cuantificate, [2][8] unde triadimefonul a fost principalul pesticid detectat și cuantificat între 0,32

mg/kg și 2,68 mg/kg fiind prezent în 65% din probe. Celelalte pesticide care s-au identificat, dar într-o măsură mai mică, sunt quitozenul 0,91-1,06 mg/kg, procimidona 0,11 mg/kg, metazaclor 0,63-6,09 mg/kg, folpetul până la 11,31 mg/kg, diclofluanid până la 0,29 mg/kg și clorfenson 1,05 mg/kg. Rezultatele au mai aratat prezența elementelor minerale grele, cum ar fi Cr, Ni, Cu, Zn și Pb, precum și reziduuri de pesticide precum fungicide, erbicide și acaricide, în trezeci și una de capsule de propolis, tablete, tincturi, bomboane și siropuri comercializate în Spania, Portugalia, Belgia, Anglia, SUA și Chile.

Pesticidele induc stres oxidativ, provocând generarea radicalilor liberi și alterarea sistemului enzimatic de eliminare al antioxidanților sau a radicalilor liberi ai oxigenului. Analizând studiul realizat pentru a investiga toxicitatea orală a clorpirifosului (insecticid utilizat pe scară largă în agricultură) față de șobolanul mascul, observând stresul oxidativ al dozei subletale de clorpirifos (9 mg/kg; 1/25 LD50) observând nivelul peroxidării lipidelor (LPO), conținut redus de glutatión (GSH) și nivelul următoarelor enzime antioxidante : activități catalazice (CAT), superoxid dismutază (SOD), glutatión peroxidază (GPx) și glutatión-S-transferază (GST) ale țesutului testicular[6]. De asemenea s-au investigat efectele protectoare ale extractului de propolis (50 mg/kg m.w.) singur, sau în combinație cu clorpirifos. Analizând figura nr.1, putem concluziona că efectul antioxidant al propolisului administrat este mai mare ca în cazul utilizării concomitente al propolisului și clorpirifosului, astfel se dovedește micșorarea efectului oxidativ al propolisului din motivul prezenței insecticidului.

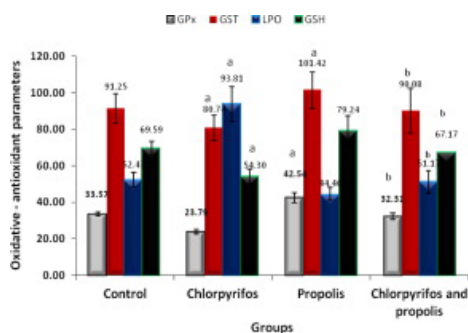


Figura 1. Parametrii oxidativi-antioxidativi

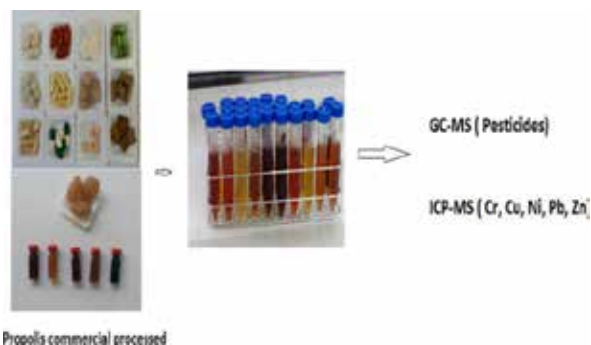


Figura 2. Forme comerciale cu propolis

Concluzii

Conform Legii apiculturii Nr. 70 din 30-03-2006, [7] Articolul 12 Asigurarea condițiilor pentru activitatea în apicultură, Articolul 13 Protecția albinelor, se interzice utilizarea pesticidelor și insecticidelor pentru prelucrarea cîmpurilor, fișilor forestiere și a plantațiilor de arbuști în perioada înfloririi plantelor nectar-polenifere. La fel se impune o conlucrare al apicultorilor și fermierile în monitorizare riguroasă a utilizării erbicidelor și insecticidelor, din păcate conform avizelor Asociației Naționare de Apicultură din Republica Moldova sunt identificate numeroase cazuri de utilizare irațională al acestora și contaminarea

coloniilor și respectiv produselor apicole cu erbicide și insecticide.

În concluzie, analizând rezultatele, ce ne dovedesc efectele dăunătoare și diminuarea efectului terapeutic al propolisului în urma contaminării acestuia cu erbicide și insecticide. La fel din cauza, că a fost depistată poluarea în diferite regiuni geografice ne permite să presupunem că acest produs apicol utilizat pe larg în scopuri terapeutice atât în terapia clasică cât și în medicina populară, e posibil să fie contaminat cu erbicide și insecticide și în Republica Moldova, fapt ce denotă necesitatea unui studiu practic aprofundat a problemei în cauză.

BIBLIOGRAFIE

1. "Pesticide residues in propolis from Spain and Chile An approach using near infrared spectroscopy" M.I. González-Martína, I.Revillab A.M.Vivar-Quintanab, E.V.Betances Salcedoa
2. "Pesticide residues and heavy metals in commercially processed propolis" M.I.González-Martína, I.Revillab, E.V.Betances-Salcedoa, A.M.Vivar-Quintanab
3. "Herbicide determination in Brazilian propolis using high pressure liquid chromatography" M. A. Umsza-GuezORCID Icon,N. P. Silva-BeltránORCID Icon,B. A. S. MachadoORCID Icon &A. P. Balderrama-Carmona
4. "Pesticides in the propolis at São Paulo State, Brazil" Ricardo de Oliveira Orsil, Lidia Maria Ruv Carelli Barretoll; Silvia Maria Alves Gomesl; Samir Moura Kadril
5. "Antiviral activity of Baccharis dracunculifolia and propolis and poliovirus quantification by real-time PCR" BÚFALO, M. C.; FIGUEIREDO, A. S.; SOUSA, J.P.B.; CANDEIAS, J. M.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M.
6. "Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats" A.AttiaaReda; H.EIMazoudya-Nahla; S.El-Shenawy
7. "LEGE Nr. 70 din 30-03-2006 apiculturii" PARLAMENTUL Republica Moldova
8. "Contamination of bee products and risk for human health: situation in France" FLECHE, C.; CLEMENT, M. C.; ZEGGANE, S.; FAUCON, J. P.

CZU: 615.234.015.154

FORMULAREA ȘI STUDIUL | FORMULATION AND STUDY COMPRIMATELOR RETARD CU TEOFILINĂ | OF THEOPHILINE DELAYED TABLETS

Katya Alhalabi¹, Abdalah Halabi², Alexandru Znagovan¹

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;

²HamaPharma, Hama, Syria

Autor corespondent: alexandru.znagovan@usmf.md

Abstract. Theophylline, administered in appropriate doses and in a regular way is a very effective remedy in the treatment of asthma, chronic obstructive pulmonary disease in moderate or severe forms. The formulation of drugs with sustained, prolonged, controlled release significantly influences not only the therapeutic profile and efficacy, but also the compliance of medicament users by reducing the dose and frequency of the drug administration, ensuring the maintenance of blood levels, the possibility of diminishing both the irritating effect of the drug on the gastrointestinal tract and the manifestation of the main side effects.

Keywords: theophylline retard tablets, formulations, manufacturing technology, medicines.

Rezumat. Teofilina, administrată în doze adecvate și în mod regulat este un remediu foarte eficient în tratamentul astmului bronșic, bolii pulmonare obstructive cronice în formă moderată sau severă. Formularea medicamentelor cu eliberare (cedare) susținută, prolongată, controlată influențează semnificativ nu numai profilul și eficiența lor terapeutică, dar în egală măsură și complianța pacienților consumatori de medicamente prin posibilitatea de a reduce doza și frecvența administrării medicamentului, asigurarea menținerii nivelului concentrației în sânge, posibilitatea de a diminua atât efectul iritant al medicamentului asupra tractului gastro-intestinal, cât și manifestarea principalelor efectelor secundare.

Cuvinte cheie: comprimate retard cu teofilină, formulare, tehnologie de fabricare, medicament.

ACTUALITATE

Conform OMS (Organizația Mondială a Sănătății) circa 235 de milioane de oameni pe glob suferă de astm bronșic, peste 65 de milioane de oameni suferă de boala pulmonară obstructivă cronică în formă moderată sau severă. Astmul este cea mai frecventă boală cronică și la copii. Teofilina, administrată în doze adecvate și în mod regulat este una dintre cele mai eficiente substanțe medicamentoase în tratamentul acestor maladii.

Formularea medicamentelor cu eliberare (cedare) susținută, prolongată, controlată influențează semnificativ eficiența lor terapeutică. Eliberarea, cedarea substanței active în cantitate adecvată stabilește concentrația inițială sanguină necesară (doza terapeutică) răspunsului terapeutic dorit, apoi, la intervale egale de timp, cantități suplimentare eliberate cu viteza și rata care asigură menținerea nivelului sanguin constant (concentrația de întreținere) constituie, credem, obiectivul principal al formulării unor astfel de medicamente. Mai mult ca atât, aceste forme au fost concepute special pentru a ceda, elibera substanța activă lent, pînă la câteva ore, cu dublu scop: pentru a proteja substanțele medicamentoase de mediul agresiv acid din stomac și, deseori invers, pentru a proteja mucoasa stomacală de efectele iritante ale substanțelor medicamentoase. Avantajele cheie dovedite ale acestor forme și tehnici farmaceutice sunt: toxicitate redusă, prolongarea acțiunii și efectului terapeutic, diminuarea prizelor, dozelor administrate, a efectelor secundare severe.

Utilizată, majoritar, în forme farmaceutice orale solide, în special cu eliberare lentă, teofilina reprezintă un bronhodilatator eficient care facilitează respirația, relaxând și deblocând pasajele de aer către plămâni. Denumirea comprimatelor cu eliberare prelungită conține de obicei prefixul „long”, „depo” sau „retard”. Ca și în cazul altor medicamente cu indice terapeutic îngust (ITI), cele cu teofilină, pentru a evita efectele adverse severe, necesită monitorizarea continuă, în dinamică a concentrațiilor plasmatice (serice).

Scopul lucrării. De a pune în atenție abordările și progresul în fabricarea comprimatelor retard cu teofilină, cu specificarea particularităților influenței excipienților specifici asupra formulei, tehnologiei de fabricare, calității, a interacțiunii în asigurarea promptă al mecanismului lor lent de acțiune.

MATERIALE ȘI METODE

Analiză sistematică bazată pe interogarea bazei de date PubMed, motorului de căutare Google, Google Scholar recherche académiques, reviste științifice, cum ar fi „International Journal of Pharmaceutics”, „Pharmaceutical Chemistry Journal” ș.a., utilizând cuvinte cheie adecvate studiului și evaluarea manuală a articolelor returnate.

REZULTATE

Despre frecvența și accesibilitatea utilizării teofilinei în studiile fundamentale medicale și farmaceutice vorbesc rezultatele interogării: motorului de căutare - Google care identifică aproximativ 1.060.000 rezultate (0,41 secunde) despre *teofilina*, aproximativ 37.700 surse rezultate despre *preparate, remedii cu conținut de teofilina*, PubMed deschide accesul la 33.455 rezultate despre *teofilina* și 4.995 rezultate despre *medecines with teofilina*, iar Google Scholar recherche académiques - environ 14 600 résultats (0,05 s) despre *teofilină* și - environ 5 440 résultats (0,11 s) despre *medecines with teofilina*.

Pentru a realiza eliberarea controlată a medicamentelor au fost utilizate tehnici și tehnologii diferite cum ar fi: tip-matrice din substanțe și materiale insolubile în apă, cum ar fi, spre exemplu, etilceluloza. Alt mecanism, diferit de cel menționat, se atestă la Eudragit®, care este capabil să încetinească vizibil difuzia substanțelor medicamentoase din conținutul proprietății sale de gonflare și permeabilității sporite. [1]

Alt mod de a realiza formulări cu eliberare prelungită, în industrie, este acoperirea comprimatelor cu învelișuri - fiind printre cele mai eficiente metode moderne utili-

zate pentru eliberarea controlată, susținută a dozei de substanță medicamentoasă. În acest scop, servesc diferiți polimeri, ca de exemplu, ceara de albine. Acoperirea comprimatelor cu ceară poate fi realizată, fie la rece, prin aplicare după dizolvarea ei într-un solvent adecvat, fie, la cald, prin acoperire cu un strat fin de ceară topită. Alte rezultate, denotă că Eudragit RS și RL sunt polimerii adecvați fabricării microcapsulelor cu teofilină cu eliberare susținută, obținute prin metoda de coacervare, utilizate în raport de 1: 1, solventul de spălare utilizat fiind hexanul. [2]

Formularea comprimatelor retard cu teofilină a constat din mai multe etape de selectare și analizate în funcție de proprietățile cerute de prescripție a listei substanțelor auxiliare, în care se aflau: amidon, celuloza microcristalina MCC 102, talc, stearatul de magneziu, ș.a. Pentru a controla și a asigura eliberarea teofilinei în compoziția comprimatelor a fost inclus polimetil metacrilatul (Eudragit L100-55), aprobat și utilizat pe scară largă în industria farmaceutică. [3]

Formula elaborată finală și reprezentarea cantitativă a substanțelor auxiliare în compoziția comprimatelor retard include lista din 5 substanțe auxiliare asociate cu teofilina (tabelul 1).

Tabelul 1. Compoziția comprimatelor retard cu teofilină

API/Excipient	Code	%
Theophylline anhydrous	A109	80
Eudragit L100-55	EX034	10
MCC 102	EX003	6
Talc	EX024	3
Mg St	EX018	1
Methanol	EX027	-
TOTAL		100

Procesul tehnologic de fabricare al comprimatelor retard cu teofilină a inclus 9 principale etape tehnologice:

- 1) Pregătirea materiilor prime,
- 2) Dizolvare (Eudragit L100-55 + metanol),
- 3) Amestecare (teofilina a/h + MCC),
- 4) Granularea umedă (teofilina a/h + MCC + Eudragit L100-55),
- 5) Uscare granule,
- 6) Uniformizarea și pudrarea granulelor (sită cu d=0,8 mm + talc + Mg stearat),
- 7) Presare (matrița cu d=12 mm, P= 9 kN/cm²),
- 8) Controlul calității,
- 9) Ambalare.

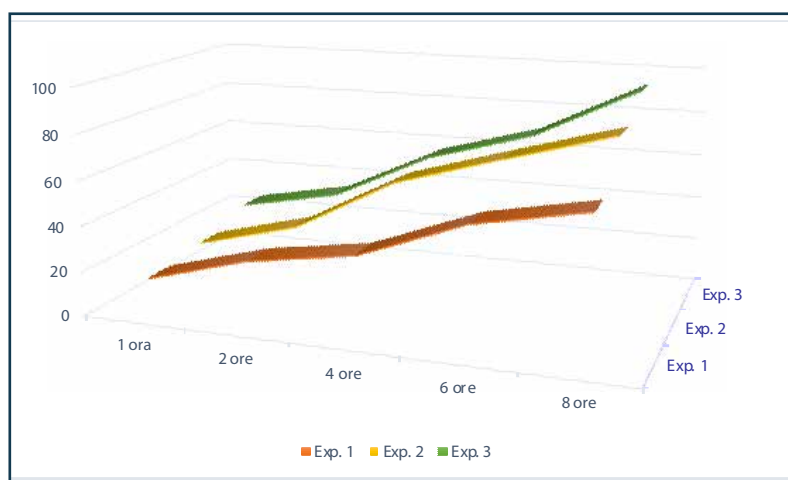
Procesul de fabricare și control al calității comprima-

telor retard cu teofilină include mai multe puncte și etape de control al proceselor și operațiilor tehnologice. Astfel, uniformizarea și pudrarea granulelor a fost realizată cu ajutorul unei site cu d=0,8 mm, presarea a avut loc în matrița cu d=12 mm, cu diferite valori ale forței de presare P = 6, 9, 14 kN/cm². Masa medie, rezistența mecanică, dezagregarea și testul de dizolvare în mediul acid (stomach), neutru (duoden) și alcalin (intestin) au fost efectuate conform metodelor și tehnicilor descrise în BPh 2020. Rezultate selective ale acestor determinări sunt prezentate în tabelul 2.

Simultan au fost petrecute teste de control și verificarea a timpului de eliberare (cedare) a teofilinei din trei formulări testate de comprimate retard cu teofilină (figura 1).

Tabelul 2. Rezultate selective ale testelor de calitate și timp de dizolvare

API și numărul experiment	Masa per comprimat, mg	Forța de presare, Kg/cm ²	%				
			În HCl, pH=1.2		În soluție-tampon, pH=6.8		
			1 ora	2 ore	4 ore	6 ore	8 ore
Teofilina 400mg Exp. 1	500	6	15.4	28.3	35.6	53.5	62.7
Teofilina 400mg Exp. 2	500	14	18.3	30.4	55.4	69.4	82.8
Teofilina 400mg Exp. 3	500	9	25.1	34.2	56.6	70.0	93.4


Figura 1. Timpul și intervalul de eliberare (cedare) a teofilinei din trei formulări de comprimate cu eliberare susținută

CONCLUZII

Formularea comprimatelor retard cu teofilină include 5 substanțe auxiliare asociate și compatibile cu teofilina a/h. Eliberarea (cedarea) prelungită eficientă a teofilinei este asigurată în comprimate de prezența polimerului polimetil metacrilat (Eudragit L100-55). Procesul de fabricare al comprimatelor retard cu teofilină se realizează prin metoda de granulare umedă, și include 9 etape tehnologice. Important este, că timpul de eliberare (cedare) a teofilinei din comprimate este direct proporțională cantității polimerului polimetil metacrilat (Eudragit L100-55) și excipienților utilizați.

BIBLIOGRAFIE

- Peter J. Barnes, Theophylline New Perspectives for an Old Drug, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002, 167(6), pp. 813-818.
- Solmaz Ghaffari, Preparation and Evaluation of Theophylline Sustained Release Microcapsules Using Coacervation, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2012, 33(9):1332-1335.
- Kumar, A. ., & Goyal, N. Design, Development and Evaluation of Extended Release Tablets of Anti-asthmatic Agents using various Polymers. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences*, 2018, 7(4), 3050 - 3054.
- R. Wulff, C.S. Leopold, Coatings from blends of Eudragit® RL and L55: A novel approach in pH-controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014 476:1-2, pages 78-87.
- R. I. Mustafin, V. L. Bobyleva, V. A. Kemenova, Potential carriers for controlled drug delivery based on Eudragit® EPO/L100 - 55 interpolyelectrolyte complexes. part 2: comparative evaluation of diffusion transport properties. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2010, 44:7, pages 391-395.

FARMACOLOGIE ȘI FARMACIE CLINICĂ

CZU: 615.22.015

PARTICULARITĂȚILE FARMACODINAMICE, FARMACOGENETICE ȘI FARMACOCINETICE ALE CARVEDILOLULUI | PHARMACODYNAMIC, PHARMACOGENETIC AND PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF CARVEDILOL

Georgel Bacinschi, Veaceslav Gonciar, Elena Bodrug

Catedra de farmacologie și farmacie clinică,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu"

Autor corespondent: bacinschi.george@yahoo.com

Summary. The rational use of drugs, including beta-adrenoblockers, requires a connection between pharmacokinetic, pharmacogenetic and pharmacodynamic features that will ensure an individualized selection of preparations in accordance with the principles of evidence-based medicine. Carvedilol, the third generation beta-adrenoblocker with beta- and alpha-adrenoblocking action, which determines antihypertensive, antiarrhythmic, antianginal and antiischemic properties. The drug, due to its physico-chemical properties, the presence of specific groups (carbosolic, etc.), the interaction with membrane phospholipids, manifest antioxidant, antiapoptotic, antiproliferative, anti-inflammatory, antiplatelet and benefic effects on carbohydrate and lipid metabolism. The pharmacogenetic features of metabolism with the participation of cytochrome P-450 isoenzymes (CTP 2D6, 2C9, 2C19, 3A4) and glucuronyltransferases ensure the efficacy and harmlessness of carvedilol in patients with cardiovascular disease and/or comorbidities.

Keywords: beta-adrenoblockers, carvedilol, CYP isoenzymes, genetic polymorphism.

Rezumat. Utilizarea rațională a medicamentelor, inclusiv a beta-adrenoblocantelor, presupune o conexiune între particularitățile farmacocinetice, farmacogenetice și farmacodinamice ce va asigura o selectare individualizată a preparatelor în conformitate cu principiile medicinei bazate pe dovezi. Carvedilolul, beta-adrenoblocant de generația a III cu acțiune beta- și alfa-adrenoblocantă, ce determină proprietăți antihipertensive, antiaritmice, antianginoase și antiischemice. Preparatul, datorită proprietăților fizico-chimice, prezenței unor grupări specifice (carbozolică etc.), interacțiunii cu fosfolipidele membranare, manifestă acțiune antioxidantă, antiapoptotică, antiproliferativă, antiinflamatoare, antiagregantă și efecte benefice asupra metabolismului glucidic și lipidic. Particularitățile farmacogenetice ale metabolismului cu participarea izoenzimelor citocromului P-450 (CTP 2D6, 2C9, 2C19, 3A4) și glucuroniltransferazelor asigură eficacitatea și inofensivitatea carvedilolului la paceinții cu maladii cardiovasculare și/sau comorbidități.

Cuvinte cheie: beta-adrenoblocante, carvedilol, izoenzime CYP, polimorfism genetic.

INTRODUCERE

Beta-adrenoblocantele (BAB) constituie o grupă principală de medicamente utilizate în cardiologie în tratamentul hipertensiunii arteriale, cardiopatiei ischemice, aritmiilor cardiace și insuficienței cardiace cronice. Selecția preparatelor pentru farmacoterapia acestor maladii poate fi determinată de proprietățile fizico-chimice, lipofilitate și/sau hidrosolubilitate, particularitățile de absorbție, distribuție, metabolizare și eliminare, care la rândul lor vor influența efectele farmacodinamice. Beta-adrenoblocantele, sub formă de preparate active sau promedicamente, sunt inactivate și/sau transformate în metaboliți activi preponderent prin procesele metabolice de fază I cu participarea enzimelor citocromului P-450 izoenzimele CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP 3A4, dintre care CYP2D6 în revine rolul principal. Majoritatea izoenzimelor implicate în metabolismul beta-adrenoblocantelor prezintă polimorfism genetic, care poate influența rezultatele tratamentului și probabilitatea reacțiilor adverse în

funcție de patologia cardiovasculară și maladiile concomitente. În același timp, grupul BAB este divers și reprezentanții săi individuali diferă semnificativ între ei privind mecanismele de acțiune, domeniul de aplicare, siguranța și suportabilitatea. Carvedilolul, BAB din a treia generație, manifestă un șir de proprietăți farmacocinetice, farmacogenetice și farmacodinamice ce îi conferă anumite particularități de utilizare clinică. Preparatul, datorită liposolubilității înalte, se absoarbe rapid și complet (circa 90%), se supune unui metabolism presistemic la primul pasaj hepatic (până la 80%), formează metaboliți activi și are o perioadă de înjumătățire lungă [1, 4, 10, 11, 13, 21, 22, 24].

MATERIALE ȘI METODE

S-a efectuat un studiu bibliografic cu selectarea și analiza a 25 surse bibliografice științifice din bazele de date Pubmed și revistele de specialitate referitor la proprietățile fizico-chimice, particularitățile farmacocinetice, farmacogenetice și farmacodinamice ale carvedilolului.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Carvedilolul reprezintă un antagonist concurent al beta-1, beta-2 și alfa-1-adrenoreceptorilor fără activitate simpatomimetică intrinsecă. În formele medicamentoase este prezent sub R(+) și S(-) enantiomeri care determină acțiunea alfa-1-adrenoblocantă, iar S(-) forma pe cea beta-adrenoblocantă [5, 7, 15, 17, 18, 23].

Carvedilolul este metabolizat în principal de izoenzima CYP2D6 și, parțial, de CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2 și CYP2E1. S(-)-carvedilolul este metabolizat de CYP2D6, iar R(+)-izomerul de CYP2C9. Se știe că farmacocinetica carvedilolului este influențată de variația genetică a CYP2D6, dar nu există date pentru CYP2C9. Se presupune că persoanele care au două copii non-funcționale ale genei CYP2D6 sunt metabolizatori lenți CYP2D. Concentrațiile plasmatice de R(+)-carvedilol sunt de 2-3 ori mai mari la metabolizatorii lenți, iar nivelurile de S(-) - carvedilol sunt crescute cu aproximativ 20% - 25%, comparativ cu metabolizatorii normali. Timpul de înjumătățire biologic al carvedilolului va fi prelungit la pacienții cu funcție hepatică afectată. La metabolizatorii lenți ai carvedilolului, metabolizarea izomerului R(+) este inhibată, ceea ce duce la creșterea marcată a activității alfa-adrenoblocante, în timp ce activitatea beta-adrenoblocantă rămâne neafectată. Metabolismul particular al carvedilolului ar putea contribui la activitatea sa de blocare a beta-adrenoreceptorilor pe termen lung. S-a raportat că la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică, nivelele plasmatice ale carvedilolului și enantiomerilor săi au fost crescute în stare de echilibru. S-a descris glucuroconjugarea stereoselectivă a carvedilolului prin UDP-glucuroniltransferază în ficat și în microzomi intestinali la folosirea carvedilolului racemic și enantiomerilor săi. Analiza retrospectivă a efectelor adverse din studiile clinice a arătat că indivizii care sunt metabolizatori lenți CYP2D6 au avut o rată mai mare de amețeli datorită efectelor vasodilatatoare prin blocarea alfa-receptorilor determinate de concentrațiile de 2-3 ori mai mari ale R(+)-enantiomerului. Variația în CYP2D6 nu pare a fi asociată cu o modificare a răspunsului terapeutic la carvedilol, posibil, datorită faptului că alte enzime CYP450 pot converti carvedilolul în metabolitul său activ. Unele studii au raportat că există diferențe semnificative specifice alelei CYP2D6 în farmacocinetica carvedilolului, dar genotipul CYP2D6 nu a avut niciun efect asupra FCC, tensiunii arteriale sau efectelor adverse [3, 5, 14].

Carvedilolul, administrat oral la subiecții sănătoși, suferă un metabolism stereoselectiv la prima trecere prin ficat, iar concentrația plasmatică a enantiomerului R(+), cu efect α 1-adrenoblocant, este de 2-3 ori mai mare decât cea a enantiomerului S(-), cu activitate β -adrenoblocantă. Carvedilolul este metabolizat în principal în ficat în diverși metaboliți activi de către enzimele CYP2D6 și CYP2C9. În metabolismul carvedilolului sunt implicate enzimele de faza I (izoenzimele CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 etc.) și faza II (UDP-glucuroniltransferaze, sulfataze). Preparatul este metabolizat prin reacții de oxidare de faza I a grupării hidroxil din lanțul lateral, mediate în principal de CYP2D6 și, într-o măsură mai mică, de CYP2C9. Acestea sunt urmate de reacții de conjugare în faza II, precum

glucuroconjugare (metaboliți hidrofilii, eliminați prin rinichi și sulfatare (metaboliți lipofili cu eliminare hepatică/biliară). Metaboliții activi ai carvedilolului identificați la om sunt O-desmetil carvedilol (ODMC), 4'-hidroxifenil carvedilol (40HC) și 5'-hidroxifenil carvedilol (50HC) (Figura 1). Dintre acești metaboliți activi, doar 40HC pare să aibă activitate β -adrenoblocantă. Mai multe studii au arătat că polimorfismele CYP2D6 induc variații individuale ale capacității de metabolizare a carvedilolului. Studiile au demonstrat că clearance-ul (CL) și volumul de distribuție (Vd) la subiecții japonezi cu alela CYP2D6*10 (genotipurile CYP2D6*1/*10, *2/*10, *10/*10) au fost semnificativ mai mici decât cele ale subiecților japonezi cu genotipurile CYP2D6 *1/*1 sau *1/*2, ce denotă că metabolismul carvedilolului în ficat este semnificativ mai mic la persoanele japoneze cu alela CYP2D6*10. Date similare au fost raportate și la pacienții japonezi cu insuficiență cardiacă cronică, la care valorile clearance-ului pentru carvedilol au fost semnificativ mai mici la pacienții cu genotipuri CYP2D6 *1/*5, *5/*10 și *10/*10 comparativ cu cei cu CYP2D6 *1/*1, *1/*10. Alelele CYP2D6*1,*2 și *10 sunt cele mai frecvente printre metabolizatorii extensivi și metabolizatorii intermediari ai carvedilolului în populațiile asiatică, în timp ce metabolizatorii lenți ai carvedilolului cu alelele CYP2D6*5 cuprind mai puțin de 1% din populația asiatică [7, 11, 13, 15].

Carvedilolul este un ligand cunoscut pentru P-glicoproteină, care afectează negativ absorbția intestinală a medicamentului, dar și un puternic inhibitor al acestui transportor de membrană plasmatică, ce determină mai multe interacțiuni potențial semnificative ale preparatului cu alte medicamente substraturi majore ale P-glicoproteinei, precum ciclosporina, doxorubicina, digoxina. Aceste interacțiuni pot fi relevante la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică [11, 21, 24].

S-a raportat că există diferențe în proprietățile farmacodinamice ale carvedilolului în funcție de genotipurile CYP2D6 prezente. Modificarea frecvenței contracțiilor cardiace (FCC) la metabolizatorii lenți și extensivi cu CYP2D6 nu a fost semnificativă în comparație cu valoarea inițială, dar tensiunea arterială sistolică la EM a fost scăzută semnificativ în comparație cu cea a PM după administrarea de doze multiple de carvedilol la subiecții caucazieni sănătoși. Un studiu de cohortă la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică a arătat că genotipurile CYP2D6 nu au avut niciun efect semnificativ asupra eficacității clinice a carvedilolului [7, 8].

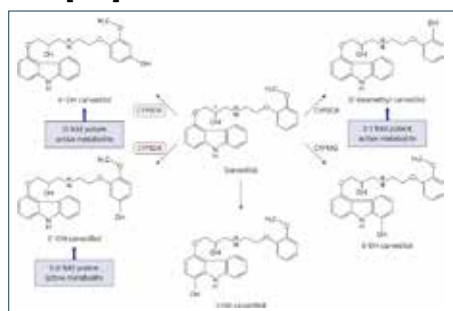


Figura 1. Structura carvedilolului și metaboliților [7, 15]

Carvedilolul este metabolizat prin citocromul P450 2D6 (CYP2D6), care este extrem de polimorf și determină o variabilitate fenotipică de 4 tipuri de metabolizatori: ultra-rapid, extensiv, intermediar și lent (UM, EM, IM și PM), starea genetică a CYP2D6 poate fi un factor determinant al tolerabilității BAB. Polimorfismele funcționale ale CYP2D6 sunt frecvente, cu scăderea funcției alelei CYP2D6*10 prezente la aproape 40% dintre pacienții asiatici și CYP 2D6 6*4 alele non-funcționale prezente la aproape 20% dintre pacienții europeni [10, 12].

Efectele farmacodinamice ale carvedilolului sunt: efectul antihipertensiv, antianginos, antiaritmie și vasodilatator; intensificarea fluxului renal; ameliorarea funcției endoteliale; majorarea nivelului factorului endotelial de creștere; micșorarea nivelului IL-6 și TNFalfa; acțiunea antioxidantă, antiproliferativă, antiapoptotică și antiinflamatoare. Carvedilolul manifestă acțiune antiproliferativă prin preîntâmpinarea hipertrofiei și remodelării miocardului, proliferării musculaturii netede a vaselor și ameliorarea funcției endotelului, ce poate determina profilaxia progresiei remodelării vasculare cauzată de dereglările hemodinamice la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică. Preparatul prin diminuarea surplusului radicalilor liberi și a stresului oxidativ exercită acțiune antioxidantă. Acțiunea antiproliferativă și antioxidantă potențează activitatea antiischemică și antiaritmie a carvedilolului [16, 17, 18, 19, 23].

Beta-adrenoblocantele ocupă un rol important în tratamentul insuficienței cardiace cronice, iar carvedilolul printre cele neselective determină un șir de efecte benefice. Blocada alfa-1-adrenoreceptorilor prin carvedilol determină vasodilatație arterială cu reducerea rezistenței vasculare periferice și respectiv a postsarcinii cu un eflux mai complet a sângelui din ventriculul stâng. Prin relaxarea arterelor renale crește fluxul renal cu o diminuare a presiunii în glomeruli datorită dilatării arterelor glomerulare eferente și micșorării reabsorbției sodiului în tubii proximali. Vasodilatarea arterială, de asemenea, reduce activarea vasoconstricției neurohormonale. La bolnavii cu insuficiență cardiacă cronică decompensată se reduce raportul beta1/beta2-adrenoreceptorilor, prin micșorarea numărului beta-1-adrenoreceptorilor în miocard fără a se modifica cel al beta-2-adrenoreceptorilor, ce determină accentuarea simptomelor clinice. Concomitent crește densitatea alfa-adrenoreceptorilor cu vasoconstricție. Carvedilolul în aceste condiții înlătură aceste mecanisme patogenetice cu ameliorarea insuficienței cardiace cronice. S-a demonstrat, că carvedilolul poate preîntâmpina dezvoltarea hipokaliemiei prin blocarea influxului potasiului în hepatocite și eritrocite și dezvoltarea fibrilației prin blocarea concomitentă a beta-1 și beta-2-adrenoreceptorilor [16, 17, 18].

Beta-adrenoblocantele în funcție de doză și selectivitate pot influența în mod diferit agregarea plachetară. Astfel, în doze mici, necesare pentru realizarea acțiunii beta-adrenoblocante, pot stimula, iar în doze mari, inhiba agregarea trombocitelor. Studiul agregării plachetare prin diferiți compuși (adenozin difosfat, trombină, adrenalină, calciu) a estimat că efectul antiagregant al BAB,

este determinat nu atât de acțiunea beta-adrenoblocantă, ci de interacțiunile nespecifice cu componentii membranelor celulare cu modificarea arhitectonicii și fluidității stratului bilipidic, geometriei moleculelor proteice ce formează canalele ionice și sistemele de transducție a semnalelor intracelulare. Aceste caracteristici pot fi determinate de proprietățile fizico-chimice, precum momentul dipol, masa și structura nelineară a moleculei. Lipofilitatea înaltă contribuie la o încorporare mai rapidă și mai marcată în stratul bilipidic, iar dimensiunile și ramificarea mai mare determină o dezorganizare mai accentuată a arhitectonicii membranei celulare. Carvedilolul, în comparație cu propranololul și atenololul, are un moment dipol mai mic, o masă moleculară mai mare și o structură 3D-netrivială. Fragmentul carboxilic al carvedilolului are rolul principal în interacțiunea cu stratul bilipidic, în timp ce interacțiunea cu beta-adrenoreceptorii este asigurată de alte sectoare ale moleculei carvedilolului. Carvedilolul influențează agregarea plachetară prin inhibarea cascadei acidului arahidonic relevată prin diminuarea sintezei tromboxanului B₂, metabolitul staniil al tromboxanului A₂. Preparatul, ca o moleculă cationică amfifilă, diminuează activitatea fosfolipazei A₂ atât prin cuplarea nemijlocită, cât și prin formarea unui complex cu fosfolipidele membranare și dislocarea calciului. Se consideră, că carvedilolul influențează agregarea plachetară prin mecanismele implicate în realizarea proprietăților antiapoptotice și antioxidante, efecte caracteristice îndeosebi metabolitului său. S-a demonstrat, că carvedilolul inhibă agregarea trombocitelor indusă de adenzin difosfat, colagen, trombină și adrenalină în concentrații micromolare dozodependente spre deosebire de cele nanomolare pentru acțiunea beta-adrenoblocantă [25].

Carvedilolul este un β-α1-adrenoblocant neselectiv de generație a III care ameliorează funcția miocardică, inhibă remodelarea distructivă în insuficiența cardiacă, scade tensiunea arterială (TA) prin reducerea rezistenței vasculare periferice și vasodilatației și nu manifestă efecte nefavorabile caracteristice altor reprezentanți ai grupei. O parte semnificativă a efectelor favorabile ale carvedilolului este asigurată de proprietățile sale metabolice, antioxidante, antiinflamatorii și anti-apoptotice. Aceste proprietăți ale carvedilolului sunt similare și se suprapun cu cele ale lipoproteinelor cu densitate mare (HDL) și paraoxonazei 1(PON-1). Proprietățile antiaterogene ale HDL sunt atribuite absorbției de lipide din pereții vaselor și unui spectru larg de funcții antioxidante și antiinflamatorii. Aceste funcții benefice sunt mediate de proteine și enzime care se găsesc în mod natural în HDL. Paraoxonaza 1 este o enzimă care se găsește exclusiv în structura HDL și manifestă capacitatea de a elimina speciile oxidate de lipide din structura lipoproteinelor cu densitate mică (LDL). Nivelul PON1 din ser corelează invers cu riscul dezvoltării CAD și este recunoscut în prezent ca biomarker în prezicerea probabilității bolilor vasculare. HDL facilitează secreția PON1 și oferă un mediu hidrofob pentru legarea și activitatea PON1, iar prin activitatea sa lactonazică și de a inhiba fosfolipază prezintă efecte antioxidante și anti-

inflamatorii. Nivelul PON1 din ser se corelează invers cu riscul dezvoltării hipertensiunii arteriale sistolice și este recunoscut în prezent ca biomarker în precizarea probabilității bolilor vasculare. Tratamentul cu carvedilol a scăzut tensiunea arterială sistolică și diastolică până la patruzeci și respectiv 16 mmHg, a crescut nivelul HDL și colesterolului total, precum și a diminuat activitatea serică a PON-1 cu reducerea conținutului dialdehidei malonice. Concomitent carvedilolul nu a modificat semnificativ nivelul trigliceridelor, LDL, apoproteinei A-I și B [2].

Carvedilolul prin blocarea α 1-receptorilor produce vasodilatație, facilitează absorbția glucozei și lipidelor de către mușchii scheletici, în ficat modulează glicogenoliza și gluconeogeneza și diminuează efluxul TG și sinteza colesterolului, ceea ce îmbunătățește legarea LDL de receptorii săi hepatici. Majorarea HDL, pe fundalul unui nivel nemodificat al apoproteinei AI, și creșterea activității PON-1, sugerează despre creșterea funcției HDL. HDL joacă roluri antioxidante, elimină lipidele oxidate din membrana celulară și particulele de lipoproteine, scade stresul oxidativ și inhibă răspunsurile pro-inflamatorii în care PON-1 joacă un rol substanțial. S-a concluzionat, că proprietățile antioxidante ale carvedilolului pot fi parțial mediate prin reglarea ascendentă a PON-1. Carvedilolul ca antagonist al α 1/ β -adrenoceptorilor scade tensiunea arterială cu reglarea descendentă a sistemului renină-angiotensină, NADPH oxidazei și producerea de superoxizi. Astfel, carvedilolul prezintă efecte antioxidante și antiinflamatoare directe și indirecte. Carvedilolul, spre deosebire de β -adrenoblocantele convenționale, nu are efecte secundare negative asupra profilului lipidic și a determinat efecte metabolice benefice prin creșterea activității HDL și PON-1 și antioxidante [2].

Carvedilolul manifestă efect nefroprotector prin acțiunea alfa-adrenoblocantă ce ameliorează perfuzia și funcția rinichilor. Comcomitent, blocada alfa-receptorilor ameliorează fluxul sanguin în mușchii scheletici cu creșterea utilizării glucozei și sensibilității la insulină, efecte benefice la pacienții cu afecțiuni renale în sindromul metabolic, obezitate, diabet zaharat, hipertensiune arterială. Acțiunea vasodilatatoare poate fi cauzată și de inhibarea secreției endotelinei, o substanță endogenă vasoconstrictoare. Grupa carbozolică a carvedilolului se consideră responsabilă de cuplarea radicalilor liberi și dezvoltarea acțiunii antioxidante și protectoare a organelor-țintă. Carvedilolul inhibă producerea de anioni de către neutrofilele activate, expresia moleculelor de adeziune cu diminuarea migrării locale a neutrofilelor cu dezvoltarea efectului antiinflamator. La utilizarea de durată a carvedilolului, se inhibă secreția factorului de necroză tumorală (TNFalfa) cu dezvoltarea efectului antiapoptotic. Într-un șir de studii s-a demonstrat acțiunea inhibitoare a preparatului asupra

expresiei moleculelor de adeziune, IL-6 și altor citokine, iar la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică a IL-1beta și IL-6. Consecințe benefice asupra funcțiilor renale vor avea și ameliorarea parametrilor metabolismului lipidic și preîntâmpinarea activării sistemului renină-angiotensină-aldosteron, responsabile de dezvoltarea nefrosclerozei și disfuncției tubulare. Astfel, efectul nefroprotector al carvedilolului este determinat de acțiunea vasodilatatoare (blocarea alfa-receptorilor, micșorarea endotelinei), antioxidantă (captarea radicalilor liberi, inhibarea peroxidării lipidelor), antiapoptotică și antiinflamatoare (reducerea IL-1beta, IL-6, TNFalfa, moleculelor de adeziune), precum și efectelor benefice asupra metabolismului glucidic și lipidic [18, 20].

Beta-adrenoblocantele sunt utilizate la pacienții cu ciroză hepatică și hipertensiune portală. Carvedilolul, s-a dovedit a fi mai eficient decât propranololul în reducerea presiunii portale, posibil prin acțiunea vasodilatatoare alfa-adrenoblocantă cu reducerea rezistenței vasculare intrahepatice. Preparatul ar putea avea un efect benefic la pacienții cu ciroză avansată prin proprietățile antioxidante, antifibrotice și antiinflamatoare. Efectul hemodinamic al carvedilolului este dependent de doză, iar o creștere a dozei de carvedilol de la 6,25-12,5 la 25-50 mg/zi a scăzut semnificativ tensiunea arterială sistemică fără un efect suplimentar asupra hipertensiunii portale. E necesar de reținut, că efectul vasodilatator poate avea restricții la pacienții cu ciroză hepatică decompensată și ascită refractară din cauza hipotensiunii sistemice cu reducerea perfuziei renale. Unele studii au demonstrat că carvedilolul poate fi mai eficient decât BAB tradiționale (propranolol etc.) în prevenirea hemoragiilor variceale la pacienții cu ciroză, deși o meta-analiză recentă a concluzionat că carvedilolul nu este la fel de eficient în reducerea mortalității, sângerărilor variceale și efectelor adverse grave [6, 9].

CONCLUZII

Carvedilolul sub formă de racemat prin prezența R(+) și S(-) enantiomerilor manifestă proprietăți beta- și alfa-adrenoblocante ce determină unele particularități de utilizarea clinică. Lipofilitatea înaltă determină caracteristici farmacocinetice avantajoase și aspecte farmacogenetice certe în procesul de metabolizare. Polimorfismul genetic al CYP2D6 mai puțin influențează eficacitatea și inofensivitatea carvedilolului, în comparație cu alte beta-adrenoblocante, datorită implicării în procesul de metabolizare a altor izoenzime CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, precum și a glucuroniltransferazei, enzimă de faza a II-a a metabolismului. Prezența grupei carbozolice determină un șir de efecte farmacologice precum antioxidant, antiapoptotic, antiproliferativ, antiinflamator, antiagregant și nefroprotector.

BIBLIOGRAFIE

1. Agesen F.N., Weeke P.E., Tfelt-Hansen P. et al. Pharmacokinetic variability of beta-adrenergic blocking agents used in cardiology. *Pharmacol Res Perspect*. 2019; e00496. doi.org/10.1002/prp2.496.
2. Ayashi S., Assareh A.R., Jalali M.T. et al. Role of antioxidant property of carvedilol in mild to moderate hypertensive patients: A prospective open-label study. *Indian J Pharmacol*. 2016 Jul-Aug;48(4):372-376. doi: 10.4103/0253-7613.186206.
3. Cižmáriková R., Habala L., Valentová J., Markuliak M. Survey of Pharmacological Activity and Pharmacokinetics of Selected β -Adrenergic Blockers in Regard to Their Stereochemistry. *Appl. Sci*. 2019, 9(4), 625. doi.org/10.3390/app9040625.
4. Dalton R., Lee S.B., Claw K.G. et al. Interrogation of CYP2D6 Structural Variant Alleles Improves the Correlation Between CYP2D6 Genotype and CYP2D6-Mediated Metabolic Activity. *Clin Transl Sci*. 2020 Jan;13(1):147-156. doi: 10.1111/cts.12695.
5. Dean L. Carvedilol Therapy and CYP2D6 Genotype. 2018 Aug 1. In: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, et al., editors. *Medical Genetics Summaries* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518573/>
6. Gunarathne L.S., Rajapaksha H, Shackel N. et al. Cirrhotic portal hypertension: From pathophysiology to novel therapeutics. *World J Gastroenterol*. 2020 Oct 28;26(40):6111-6140. doi: 10.3748/wjg.v26.i40.6111.
7. Jung E., Ryu S., Park Z. Et al. Influence of CYP2D6 Polymorphism on the Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Characteristics of Carvedilol in Healthy Korean Volunteers. *J Korean Med Sci*. 2018 May 23;33(27):e182. doi: 10.3346/jkms.2018.33.e182.
8. Ingram A., Valente M. Genetic Variation of Hepatic Enzymes Influence on β -Blocker Dose in Patients With Reduced Ejection Fraction Heart Failure. *J Pharm Pract*. 2020 Feb;33(1):96-98. doi: 10.1177/0897190018782794.
9. Li T., Ke W., Sun P. et al. Carvedilol for portal hypertension in cirrhosis: systematic review with meta-analysis. *BMJ Open*. 2016 May 4;6(5):e010902. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010902.
10. Luzum J.A., Sweet K.M., Binkley P.F. et al. CYP2D6 Genetic Variation and Beta-Blocker Maintenance Dose in Patients with Heart Failure. *Pharmaceutical Research*, 08 Feb 2017, 34(8):1615-1625. doi.org/10.1007/s11095-017-2104-8.
11. Parker B., Rogers S., Lymperopoulos A. Clinical pharmacogenomics of carvedilol: the stereo-selective metabolism angle. *Pharmacogenomics*. 2018; 19(14), 1089-1093. doi.org/10.2217/pgs-2018-0115.
12. Romskaug R., Wyller T.B., Straand J. et al. Prescribed Doses of CYP2D6-Metabolized Drugs and Hemodynamic Responses in Relation to CYP2D6 Genotype Among Older Patients Exposed to Polypharmacy. *Drugs Aging*. 2020 Jun;37(6):425-433. doi: 10.1007/s40266-020-00763-0.
13. Sehrt D., Meineke I., Tzvetkov M. et al. Carvedilol pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to CYP2D6 and ADRB pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2011;12(6):783-795.
14. Torrellas C., Carril J.C., Cacabelos R. Benefits of Pharmacogenetics in the Management of Hypertension. *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics* 2014; 5: 126. doi:10.4172/2153-0645.1000126
15. Wang Z., Wang L., Xu R.A. et al. Role of cytochrome P450 2D6 genetic polymorphism in carvedilol hydroxylation in vitro. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Jun 8;10:1909-16. doi: 10.2147/DDDT.S106175.
16. Беволол А.Н. **Клиническая фармакология бета-блокаторов, применяемых при хронической сердечной недостаточности**. «Мир Медицины и Биологии» 2012, 1(32), 7-13.
17. Ена Л.М., Артеменко В.О., Мудрук И.В и др. β -адреноблокаторы в лечении хронической сердечно-сосудистой патологии: место карведилола. *Кардіологія, Ревматологія, Кардіохірургія*. 2018; 2(57): 51-52.
18. Колесник Т.В. Блокаторы β -адренорецепторов в лечении сердечно-сосудистых заболеваний: современные позиции карведилола. *Ліки України. Medicine of Ukraine*. 2016; 3(199): 25-32.
19. Королева А.А., Журавков Ю.Л. Значение карведилола в лечении хронической сердечной недостаточности. *Медицинские новости*. 2019; 2: 47-50.
20. Муркамилов И.Т., Сабиров И.С., Фомин В.В., Юсупов Ф.А. Бета-адреноблокаторы и ренопротекция: возможности карведилола. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 2017;13(3):422-426. doi.org/10.20996/1819-6446-2017-13-3-422-426.
21. Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатъев И. В., Смирнихина С. И., Максимов М. Л., Кукес В. Г., Клиническая фармакогенетика β -адреноблокаторов: возможности повышения эффективности и безопасности терапии. *Сердце*. 2009;5(3): 162-165.
22. Сычев Д.А., Миронова Н.А. Фармакогенетическое тестирование по CYP2D6 и CYP2C19: значение для персонализации применения лекарственных средств в клинической практике. *Лаборатория*. 2012; 4: 11-13.
23. Терещенко С.Н., Жиров И.В, Хосева М.Н, Все ли бета-адреноблокаторы одинаково эффективны? Место карведилола в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. „Эффективная фармакотерапия. Кардиология и Ангиология» 2011,3, 20-26.
24. Шумков В.А., Загородникова К.А., Болдуева С.А. Влияние генетического полиморфизма CYP2D6 на фармакокинетику и фармакодинамику бета-блокаторов у больных в раннем постинфарктном периоде. *Вестник Российской Военно-Медицинской Академии*. 2014; 1(45): 233-236.
25. Закирова А.Н., Зарудий Ф.С., Гарифуллин Б.Н. Бета-адреноблокаторы и агрегация тромбоцитов. *Карведилон*.

CZU: [615.225+615.216.84]: 617.7-007.681

ASPECTE ALE UTILIZĂRII BLOCANTELOR RECEPTORI- LOR ANGIOTENSINICI ÎN GLAUCOM

ASPECTS OF THE UTILISATION OF ANGIOTENSIN RE- CEPTOR BLOCKERS IN GLAUCOMA

Georgel Bacinschi, Veaceslav Gonciar, Corina Scutari

Catedra de farmacologie și farmacie clinică,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu"

Autor corespondent: corina.scutari@usmf.md

Summary. The components of the renin-angiotensin-aldosterone ocular system are involved in regulating the production and drainage of aqueous humor and intraocular pressure, respectively, as well as the degenerative processes of retinal ganglion cells. Angiotensin receptor blockers by inhibiting the effects of angiotensin II may influence the pathogenetic links of glaucoma and provide a promising therapeutic target. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of angiotensin receptor blockers may allow local and / or systemic use that will ensure effective concentrations in ocular fluids and tissues, important conditions for achieving the therapeutic effect. Internal administration may provide an increase in patient confidence in treatment and a priority in the presence of comorbidities (hypertension, diabetes, etc.).

Keywords: angiotensin receptors, glaucoma, blockers.

Rezumat. Componentele sistemului renină-angiotensină-aldosteron ocular sunt implicate în reglarea producerii și drenajului umorii apoase și respectiv a presiunii intraoculare, precum și a proceselor degenerative ale celulelor ganglionare ale retinei. Blocantele receptorilor angiotensinici prin inhibarea efectelor angiotensinei II pot influența verigile patogenetice ale glaucomului și oferi o țintă terapeutică de perspectivă. Proprietățile farmacocinetice și farmacodinamice ale blocanțelor receptorilor angiotensinici pot permite utilizarea locală și/sau sistemică ce va asigura concentrații eficiente în lichidele și țesuturile oculare, condiții importante pentru realizarea efectului terapeutic. Administrarea internă poate oferi o creștere a complianței pacienților la tratament și o prioritate în cazul prezenței comorbidităților (hipertensiunii arteriale, diabetului zaharat etc.).

Cuvinte cheie: receptori angiotenzinici, glaucom, blocante.

INTRODUCERE

Sistemul renină-angiotensină-aldosteron (SRAA), descoperit cu circa 120 ani în urmă, prin intermediul enzimelor, peptidelor și receptorilor joacă un rol important în fiziologia și fiziopatologia unui șir de maladii și stări patologice. S-a constatat, că nu numai SRAA sistemic, dar și cel local în organe și țesuturi, pot duce la evenimente patologice. Unele sisteme locale se bazează pe SRAA sistemic, în timp ce altele funcționează independent de SRAA sistemic, producând propriile componente la nivel local. Astfel, SRAA poate fi considerat un sistem proteolitic cheie care posedă funcții intracrine, autocrine, paracrine, precum și endocrine în corpul uman. Actualmente toate componentele cheie ale SRAA, cu excepția angiotensinei IV și receptorilor angiotensinici tip 4, au fost identificate atât în structurile retiniene, cât și în cele non-retiniene ale ochiului uman. Elucidarea rolului SRAA sistemic și local în patogeneză maladiilor, inclusiv oculare, va determina studiul și elaborarea unor medicamente noi. Complexitatea cascadei SRAA (Figura 1) se axează pe studiul componentelor cheie (peptidaze, proteaze, peptide, receptori) și interacțiunii lor cu alte sisteme, inclusiv kalikrein-kininic [1, 3, 4, 6, 7, 9].

Descoperirea SRAA ocular local a inițiat studii experimentale și clinice în vederea elucidării rolului acestuia în etiologia și patogeneză afecțiunilor oculare, precum glaucom, retinopatia diabetică, degenerescența maculară le-

gată de vârstă, retinopatia prematură etc. Glaucomul, cu numeroasele sale subtipuri, este o patologie responsabilă de afectarea neurodegenerativă a nervilor optici și axonilor celulelor ganglionare a retinei cu orbire ireversibilă. Se consideră, că glaucomul afectează la nivel global circa 80 de milioane de oameni în 2020, dar numărul acestora este probabil mult mai mare datorită faptului că boala poate fi asimptomatică pentru o lungă perioadă de timp. Etiologia multifactorială (vârsta, rasa, istoricul familial, diabetul, pseudoexfolierea, miopia) și patogeniza complexă (creșterea presiunii intraoculare, leziunile structurilor nervoase) a glaucomului necesită dezvoltarea de noi terapii eficiente în încetinirea progresiei bolii, inclusiv pentru controlul presiunii intraoculare (PIO) și elaborarea agenților neuroprotectori. S-a sugerat că SRAA ocular joacă un rol în reglarea PIO, deoarece poate modifica dinamica umorii apoase (UA). În acest context, preparatele cu influență asupra SRAA, inclusiv inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei (IECA) și blocantele receptorilor angiotensinici (BRA), prezintă un interes deosebit în cazul dezvoltării glaucomului pe fundalul maladiilor cardiovasculare, diabetului zaharat. S-a estimat, că administrarea sistemică și topică a medicamentelor antihipertensive cu acțiune asupra SRAA, IECA și BRA, pot reduce PIO [3, 4, 6, 7].

Prezența și transcrierea activă a genelor care codifică proteinele SRAA, în cadrul diferitelor tipuri de țesut ocular, sunt dovezi suplimentare ale unui astfel de sistem local în

Efectul benefic al BRA s-a estimat a fi cauzat de creșterea fluxului uveoscleral, precum și de preîntâmpinarea degenerării celulelor ganglionare ale retinei independent de proprietățile lor de scădere a PIO. S-a demonstrat că candesartanul, administrat oral, protejează și previne pierderea progresivă a morții celulelor ganglionare retiniene la șoarecii cu glaucom normotensiv și la șobolanii cu glaucom cronic. Tratamentul cu losartan a fost descris pentru a exercita efecte neuroprotectoare asupra celulelor ganglionare ale retinei la șoarecii cu PIO crescută. Într-un studiu experimental s-a constatat că administrarea sistemică a losartanului, irbesartanului și telmisartanului a micșorat TA, în timp ce PIO a fost semnificativ redusă de irbesartan și telmisartan, dar nu de losartan, probabil din cauza dozelor non-echipotente. Un alt studiu imunohistochimic a demonstrat, că doar telmisartanul a redus fluorescența în stratul celular ganglionar retinal. Concomitent s-a dovedit, că administrarea sistemică a aldosteronului a provocat o pierdere progresivă dependentă de doză a celulelor ganglionare ale retinei, iar utilizarea spironolactonei, a îmbunătățit supraviețuirea celulelor ganglionare retiniene, independent de orice efecte asupra PIO. Capacitatea dublă a BRA de a reduce PIO și de a acționa ca agenți neuroprotectori este promițătoare în tratamentul glaucomului [5, 6, 7].

Blocanții receptorilor angiotensinici administrați oral scad PIO. Administrarea topică poate reduce efectele secundare sistemice și poate fi eficientă pentru tratamentul glaucomului. Studiile experimentale au demonstrat, că administrarea irbesartanului și candesartanului sub formă de picături oftalmice a creat concentrații suficiente în segmentul anterior al ochiului cu micșorarea PIO, efect similar cu timololul, beta-adrenoblocant. Autorii au concluzionat, că BRA pot fi considerate o nouă clasă de preparate antiglaucomatoase [8].

S-a constatat, că reglarea receptorilor AT_1 este asociată cu creșterea PIO, iar blocarea semnalizării receptorilor AT_1 cu candesartan previne eficient moartea neuronală a retinei. Candesartanul în doza de 1 mg/kg/zi, în modelul experimental de glaucom, a demonstrat efecte neuroprotectoare împotriva ischemiei retinei. S-a arătat că candesartanul provoacă o scădere a PIO timp de 5 ore la subiecți sănătoși fără a influența TA. Concomitent preparatul micșora TA doar la persoanele hipertensive, rezultate ce sugerează că mecanismul nu este mediat de o scădere a TA, ci mai degrabă este mai specific. Astfel, s-a ajuns la concluzia că tratamentul cu candesartan oferă un efect neuroprotector independent de reducerea PIO [11].

S-a constatat, că activarea receptorilor AT_1 stimulează transducția semnalului factorului de creștere transformator-beta ($TGF\beta$) cu intensificarea formării matricii extracelulare, ce contribuie la patogeneză glaucomului. Blocantele receptorilor angiotensinici inhibă această activare, ce contribuie la micșorarea PIO și neuroprotecție. Proprietățile farmacologice ale BRA, precum și afinitatea față de receptori, reducerea ratei receptorilor și agonismul invers, ar putea determina eficacitatea în tratarea glaucomului [4, 5].

Administrarea sistemică a BRA a determinat concentrații relevante de losartan, irbesartan și telmisartan în ochi, creier și plasmă. Toate BRA au redus TA, iar PIO a fost micșorată semnificativ de irbesartan și telmisartan, dar nu de losartan. Telmisartanul a demonstrat capacitatea de a reduce semnalizarea $TGF\beta$. Reducerea semnalizării $TGF\beta$ observată în stratul celulelor ganglionare ale retinei sugerează că BRA pot traversa bariera hemato-retiniană cu realizarea de efecte neuroprotectoare. Astfel, s-a concluzionat, că telmisartanul, BRA cu efecte duale de micșorare a PIO și a $TGF\beta$, poate fi considerat ca terapie patogenetică în tratamentul glaucomului [4].

Variațiile proprietăților farmacologice ale BRA pot duce la diferențe în efectele fiziologice. Irbesartanul are cea mai mare afinitate pentru receptorii AT_1 comparativ cu losartanul, iar telmisartanul este cel mai lipofil BRA cu cel mai mare potențial de distribuție în țesuturi. Studiile comparative au constatat, că concentrațiile tisulare ale telmisartanului, inclusiv în ochi, au fost cu un ordin mai mare decât celelalte BRA. Acest lucru este în concordanță cu lipofilitatea compusului, care poate facilita pătrunderea barierelor de sânge/retină și sânge/UA și poate atinge concentrații mari și poate explica eficacitatea telmisartanului atât la scăderea PIO, cât și la interacțiunea cu celulele ganglionare ale retinei. Pacienții cu glaucom ar putea fi tratați cu doze orale de BRA, o comoditate care poate duce la o mai bună complianță a pacientului în comparație cu picăturile pentru ochi. Alternativ, într-o abordare medicală personalizată, pacienții cu hipertensiune sistemică și glaucom ar putea alege BRA în loc de sau în asociere cu IECA pentru tratarea hipertensiunii arteriale în timp ce primesc beneficii suplimentare pentru tratarea glaucomului [4, 5].

Presiunea intraoculară este controlată de echilibrul dintre secreția și drenajul UA, iar drenarea este realizată de celulele trabeculare umane (CTU), situate în unghiul iridocorneal. Creșterea PIO se crede că se bazează pe disfuncția sau rezistența crescută a CTU la scurgerea UA. Modificările citopatologice cauzate de expresia și activitatea factorilor de stres oxidativ, disfuncția normală a CTU poate duce la o creștere a PIO. S-a raportat că rețeaua trabeculară are niveluri ridicate de metaboliți ai peroxidării lipidelor și un număr mare de aducți ai ADN-ului. Oxidarea și deteriorarea biomoleculară a CTU au fost considerate cauza obstrucției fluxului UA. În fibroza pulmonară, epilepsia, hipertensiunea arterială, ateroscleroza, boala Parkinson și moartea subită, stresul oxidativ joacă un rol important și se crede, de asemenea, că este asociat cu multe tulburări oftalmice, cum ar fi degenerescența maculară legată de vârstă, cataractă și glaucom. În mai multe celule oculare, inclusiv celule epiteliale corneene, CTU, celule epiteliale pigmentare retiniene și celule ganglionare retiniene, poate surveni stresul oxidativ. Disfuncția indusă de stresul oxidativ al CTU poate suprima scurgerea UA, poate duce la creșterea patologică a PIO și glaucom. Progresia glaucomului a fost legată de stresul oxidativ, care poate rezulta din scăderea expresiei și activității proteinelor antioxidante. În ultimii ani mai multe publicații au documentat că

depozitele crescute de matrice extracelulară în CTU sunt responsabile pentru creșterea PIO. Speciile reactive de oxigen (SRO) modifică funcția fiziologică a rețelei trabeculare și sunt responsabile pentru semnalizarea celulară, inclusiv TGF- β cu diferite citokine și factori de creștere. S-a arătat că TGF- β sunt prezenți în mediul ocular al oamenilor, iar conținutul de TGF- β crește în UA în timpul îmbătrânirii și glaucomului [2].

Concluzii

Sistemul renină-angiotensină-aldosteron sistemic și ocular prin proteinele, proteazele și receptorii specifici joacă un rol primordial în dezvoltarea și progresia maladiilor oculare, inclusive glaucom. Blocantele receptorilor angiotensinici (losartan, irbesartan, candesartan, telmisartan etc.) pot manifesta efecte benefice în tratamentul glaucomului în funcție de proprietățile farmacocinetice (lipofilitate, distribuție) și farmacodinamice (afinitatea față de receptori). Preparatele, de rând cu reducerea presiunii intraoculare, manifestă efecte neuroprotectoare față de celulele ganglionare ale retinei cu preîntâmpinarea progresiei proceselor neurodegenerative în glaucom. Administrarea sistemică și/sau locală a blocantelor receptorilor angiotensinici poate fi considerată ca o terapie antiglaucomatoasă de perspectivă datorită capacității preparatelor de a crea concentrații efective în mediile și țesuturile oculare.

Bibliografie

- Almeida LF., Tofteng SS., Madsen K., Jensen BL. Role of the renin-angiotensin system in kidney development and programming of adult blood pressure. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Mar 27;134(6):641-656.
- Chen H.Y., Chou H.C., Ho Y.J. et al. Characterization of TGF- β by Induced Oxidative Stress in Human Trabecular Meshwork Cells. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jan 13;10(1):107. doi: 10.3390/antiox10010107.
- Choudhary R., Kapoor MS., Singh A., Bodakhe SH. Therapeutic targets of renin-angiotensin system in ocular disorders. *J Curr Ophthalmol*. 2017 Oct 20;29(1):7-16. doi: 10.1016/j.joco.2016.09.009.
- Hazlewood R.J., Chen Q., Clark F.K. et al. Differential effects of angiotensin II type I receptor blockers on reducing intraocular pressure and TGF β signaling in the mouse retina. *PLoS One*. 2018 Aug 9;13(8):e0201719. doi: 10.1371/journal.pone.0201719.
- Hazlewood R.J., Kuchtey J., Wu H.J., Kuchtey R.W. Telmisartan Reduces Axon Degeneration in Mice With Experimental Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020 May 11;61(5):51. doi: 10.1167/iovs.61.5.51.
- Holappa M, Vapaatalo H, Vaajanen A. Ocular renin-angiotensin system with special reference in the anterior part of the eye. *World J Ophthalmol* 2015; 5(3): 110-124.
- Holappa M., Vapaatalo H., Vaajanen A. Local ocular renin-angiotensin-aldosterone system: any connection with intraocular pressure? A comprehensive review. *Ann Med*. 2020 Aug;52(5):191-206. doi: 10.1080/07853890.2020.1758341.
- Lorenzo-Soler L., Olafsdottir O.B., Garhöfer G. et al. Angiotensin Receptor Blockers in cyclodextrin nanoparticle eye drops: Ocular pharmacokinetics and pharmacologic effect on intraocular pressure. *Acta Ophthalmol*. 2020 Nov 16. doi: 10.1111/aos.14639.
- Povlsen AL., Grimm D., Wehland M. et al. The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. *J Clin Med*. 2020 Jan 18;9(1).
- White A.J., Cheruvu S.C., Sarris M. et al. Expression of classical components of the renin-angiotensin system in the human eye. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015 Mar;16(1):59-66. doi.org/10.1177/1470320314549791.
- Yang H., Hirooka K., Fukuda K., Shiraga F. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor blocker in a rat model of chronic glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Dec;50(12):5800-4. doi: 10.1167/iovs.09-3678.
- Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2008; 2: 81-84.

STUDIUL PLANTELOR MEDICINALE

CZU: 615.322:582.886+615.243

GASTROPROTECTIVE ACTIVITY OF EPILOBIUM ANGUSTIFOLIUM HERB | ACTIVITATEA GASTROPROTECTIVĂ A PĂRȚILOR AERIENE DE EPILOBIUM ANGUSTIFOLIUM

Sviatlana Sheuchuk¹, Natalia Gurina²

¹ PhD student, Department of organization of pharmacy, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

² Doctor of Biological Science, Dean of pharmaceutical faculty, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Rezumat. Studiul proprietăților gastroprotectoare ale părților aeriene de *Epilobium angustifolium* a fost efectuat pe un model al leziunilor mucoasei gastrice a șobolanilor printr-o singură administrare intragastrică de etanol (1 ml de etanol 96%). Administrarea profilactică intragastrică a extractului din părți aeriene de *Epilobium angustifolium* în doza de 500 mg/kg a contribuit la o creștere semnificativă a rezistenței mucoasei gastrice a șobolanilor la efectul nociv al etanolului. Activitatea antiulceroasă a produsului vegetal investigat a fost de 3,18, ce a depășit rezultatele grupului de comparație.

Cuvinte cheie: fitoterapie, afecțiuni ale aparatului digestiv, plante medicinale, ulcer peptic, *Epilobium angustifolium* L., produse vegetale.

Abstract. The study of the gastroprotective properties of the herb *Epilobium angustifolium* was carried out on an ethanol model of lesions of the gastric mucosa of rats by a single intragastric introduction of ethanol (1 ml of 96% ethanol). Preventive intragastric administration of decoction at dose 500 mg / kg led to a significant increase in resistance of the gastric mucosa of rats to the damaging effect of ethanol. The anti-ulcer activity of the studied medicinal plant raw materials was 3.18, which exceeds the results of the standard group (2.06).

Keywords: phytotherapy, diseases of digestive system, medicinal plants, peptic ulcer, *Epilobium angustifolium* L., herbal materials.

INTRODUCTION

Diseases of the gastrointestinal tract are among the most common diseases in the world. It is known, that 30% of total number of gastrointestinal diseases is peptic ulcer disease. Peptic ulcer disease affects people of the most active, working age, causing temporary and sometimes permanent disability [1]. There are several types of peptic ulcer disease:

- 1) Peptic ulcers caused by *Helicobacter pylori* infection;
- 2) Symptomatic (acute) - medicinal, stressful, etc.;
- 3) Ulcers resulting as a complication from diseases of the internal organs (Cushing ulcers, etc.).

The signs of acute damage of the stomach wall are necrosis, inflammatory exudate, and immature granular tissue. Their characteristic feature is rapid occurrence with frequent development of complications, and almost as rapid healing after elimination of etiological factors. If earlier acute ulcer was described as a rather rare pathology, then in recent years many authors report hundreds of observations [2]. Some of the main causes of gastric ulcers include continual use of alcoholic beverages and anti-inflammatory drugs, long time stress.

The large number of synthetic drugs have been used in conservative treatment of peptic ulcer disease, which can have a toxic effect on the human body. And also, due

to the impossibility, in some cases, to eliminate the etiological factors and the high frequency of relapses and complications, it is recommended to use preventive measures and improve the methods of complex therapy.

It is important to use herbal medicines as a means of prevention, which is associated with low toxicity during long-term use and the availability of medicinal plant raw materials [3].

A promising object of research is *Epilobium angustifolium* L., which is used in traditional medicine and has large raw materials reserves on the territory of the Republic of Belarus. Herb contains an extensive complex of biologically active compounds (tannins (up to 10%), polysaccharides (up to 15%), flavonoids (up to 10%), vitamin C (320 mg%), etc.) [4].

Thus, the purpose of our trial was to study the gastroprotective properties of decoction of *Epilobium angustifolium* L..

MATERIALS AND METHODS

Plant material. *E. angustifolium* herb was collected in the Minsk region of the Republic of Belarus in 2019. The plant material was identified and a herbarium was submitted to Department of Organization of pharmacy, BSMU, Minsk (Belarus). The drying of raw materials was carried

out in a natural air-shadow way. The plant material was dried in shade and powdered. A decoction was prepared according to the article "Infusions and decoctions" of the State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus [5].

Ethanol induced ulcer. The study of the gastroprotective properties of *E. angustifolium* herb was carried out in accordance with the existing requirements of Good Laboratory Practice (GLP) and generally accepted recommendations for this type of research [6, 7]. 24 female white rats (260–320g) were selected, housed and divided into three groups. Each group contained of eight animals under standard laboratory conditions of temperature (25±2 °C). The animals had free access to food and water. Before experiment, a daily examination of the external condition was carried out for minimum 10 days. The Belarusian State Medical University, Animals Ethics Committee approved all experimental protocol. The control group was given only water purified, test group were given decoction (500 mg/kg, p.o.). Standard group was given "Plantagluclid" in dose 500 mg/kg, p.o.. Active ingredients of "Plantagluclid" is common plantain dry leaf extract.

Rats were fasted for 24hrs prior receiving first doses. The solutions was administered intragastrically with a special metal probe in a 7-day course before modeling an "acute" ulcer. The ulcer was induced using 1 ml of 96% ethyl alcohol by administered orally to each animal. After 24 hours, the rats were removed from experiment by cervical dislocation. The macroscopic observation of stomach was recorded for ulcer scoring after removal of stomach. All stomachs were gently rinsed with water to remove the gastric contents and blood clots and examined for lesions: the number of small (point) (less than 2 mm), large (more than 2 mm), band-shaped ulcers was counted and the severity of hyperemia was recorded. Then the

percentage of animals with ulcers in each group was calculated [8]. The study of the effect of decoction on the motor-evacuation function of the gastrointestinal tract was carried out using the method of "tags". As a "tag" was used activated carbon [9]. The integral index of the number of destructions was determined:

$$IP = (N \times K) / 100,$$

where N - is the average number of destructions per 1 animal,

K - is the percentage of animal lesions in the group.

The anti-ulcer activity was determined as the ratio of the values of the integral index in the control group to the value in the experimental group and expressed in relative units. The test agent was considered active if the anti-ulcer activity was 2 or more units [9, 10].

RESULTS AND DISCUSSIONS

The preventive intragastric administration of decoction of herb *Epilobium angustifolium* L. at dose 500 mg/kg led to a significant increase of resistance of the gastric mucosa of rats to the damaging effect of ethanol.

The introduction of decoction and "Plantagluclid" led to a significant improvement in the condition of the animals. Macroscopic examination of the stomachs of rats of these groups showed the absence of bloating, folding and color of the gastric mucosa almost did not differ from the same characteristics in the group of intact animals.

There was a statistically significant decrease in the average number of ulcers in test group (by 1.8 times) due to a 2.8-fold decrease of number of point destructions and the absence of band-shaped ulcers relative to similar values in group of untreated animals (Table 1). The absence of hyperemia also indicates the presence of a gastroprotective effect.

Table 1. Effect of decoction of herb *E. angustifolium* on the formation of lesions in ethanol induced model in rats, (M±m)

Group	Small ulcers	Large ulcers	Band-shaped ulcers	Hyperemia
Control group (purified water)	Number of ulcerations per animal 10.25±1.72			Expressed
	3.75±1.40	2.13±0.83	4.13±1.92	
Standard group ("Plantagluclid", 500 mg/kg)	Number of ulcerations per animal 6.43±0.98*			Absenced
	3.29±0.70	3.14±0.83	0	
Test group (<i>E. angustifolium</i> , 500 mg/kg)	Number of ulcerations per animal 5.67±2.06*			Absenced
	1.33±0.48	4.83±2.04	0	

* Calculations were performed for those animals, that were found to have ulcerative lesions

The preventively introduction of decoction at dose 500 mg/kg led to decrease in number of small ulcers (less than 2 mm) by 2.5 times compared to the drug "Plantagluclid", however, in the standard group, there was a smaller number of large ulcers by 1.53 times compared to the experimental group.

The ability of the studied plant to enhance the motor-evacuation activity of the gastrointestinal tract is an important aspect of anti-ulcer activity. In the control and test group was an acceleration of the motility of the gastrointestinal tract by 49% and 61%, respectively (Table 2). Violation of this function leads to an increase in the time

of exposure to ulcerogen and gastric juice on the gastric mucosa, the throwing of the contents of the duodenum into the stomach, which can reduce the resistance of the

mucous membrane to the effects of irritating factors and contribute to damage to the gastric mucosa [11].

Table 2. Effect of decoction of herb *E. angustifolium* on motor-evacuation function of the gastrointestinal tract

Group	Filling the intestines with carbon, %	Acceleration of motorfunction, %
Control group (purified water)	35.3±1.76	-
Standard group ("Plantagluclid", 500 mg/kg)	52.5±2.03	49
Test group (<i>E. angustifolium</i> , 500 mg/kg)	56.7±1.89	61

The gastroprotective effect of the studied plant was confirmed by a statistically significant decrease in the number of animals with ulcers in test group. So, in the control group, pre-treated with a 7-day course water purified,

founded damage of the mucous membrane of all rats, in the standard group 87.5% of animals were affected, in the experimental group - 75% (table 3).

Table 3. -Anti-ulcer activity of preventively introduction of *E. angustifolium* herb (500 mg/kg)

Group	Animals with ulcers (%)	Integral index	Anti-ulcer activity
Control group (purified water)	100%	10,13	-
Standard group ("Plantagluclid", 500 mg/kg)	87,5%	4,92	2,06
Test group (<i>E. angustifolium</i> , 500 mg/kg)	75%	3,19	3,18

The results obtained showed that the course application has a positive result. The anti-ulcer activity of the studied extract of *E. angustifolium* was 3.18, which exceeds the results of the standard group, where the animals received "Plantagluclid". The analysis of the composition of biologically active compounds of *E. angustifolium* herb supposes that substances of polyphenolic nature (tannins, flavonoids, phenolic acids) cause gastroprotective activity. This group of compounds stabilizes mast cells, helping to maintain an optimal level of microcirculation in damaged tissues, reduces the production of histamine and weakens the damaging effect of ulcerogen [12]. In previous studies, we established a pronounced anti-inflammatory effect of the herb *E. angustifolium* in an *in vivo* experiment on a model of carrageenan inflammation [13]. In case of peptic ulcer the activity of the enzyme and non-enzyme antioxidant systems decreases, resulting in a weakening of the antioxidant defense and an increase in the processes of lipid peroxidation. Biological oxidati-

on reactions lead to the formation of free radicals, which have a high chemical activity. They react with unsaturated fatty acids of the membranes, disrupting their structure [14]. In previous studies, we found that studied plant has a pronounced antioxidant activity and the content of phenolic compounds is directly proportional to the degree of inhibition of free radicals [15].

CONCLUSIONS

The medicinal plant raw materials with anti-inflammatory and antioxidant activity can be used in case of gastric ulcer disease. Experimental data characterize the decoction of herb *E. angustifolium* at dose of 500 mg/kg as an effective gastroprotective agent. Biologically active compounds of studied plant are mainly substances of a polyphenolic nature, which have an anti-inflammatory and wound-healing effect due to the inhibitory effect on prostaglandin synthetase and lipoxygenase.

REFERENCES

1. Fadeev P. A. Ulcer disease. Moscow: Onyx LLC, Mir iobrazovanie, 2009, p. 128.
2. Ivashkin V. T., Sheptulin A. A., Baranskaya E. K., Trukhmanov A. S., Lapina T. L. Ulcer disease. Recommendations of the Russian Gastroenterological Association for diagnosis and treatment. Moscow: OOO Tipografiya „Pi kvadrat”, 2013, p. 20.
3. Sambukova Tatyana, Ovchinnikov Boris, Ganapol'sky-Vyacheslav, Yatmanov Alexei, Shabanov Petr. (2017). Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 15. 56-63. 10.17816/RCF15256-63.
4. Karomatov, I. D. Kipreyuzkolisty, Ivan-chai / I. D. Karomatov, N. I. Turaeva // Biology and integrative medicine. - 2016. - No. 6. - pp. 160-169.
5. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: 2 t / Min. of Health of. Rep. of Belarus, UE "Center for Expertise and Testing in Health Care" / under total. ed. S. I. Marchenko. - 2nd ed. - Molodechno, 2016. - T. 2. - P. 1368.
6. TCP 125-2008 (02040) Good Laboratory Practice (GLP) Guidelines for Conducting Preclinical Drug Trials. Part 1 / A. N. Mironov [et al.]- M.: Grif and K, 2012 - - 944 p.
7. Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Karimian H, Fadaeinasab M, Abdulla MA, Kadir HA. Gastroprotective activity of *Annona muricata* leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement. Drug Des DevelTher. 2014 Oct 28; 8:2099-110. doi: 10.2147/DDDT.S70096. PMID: 25378912; PMCID: PMC4218895.
8. Mamonova N. V., Zotova A.V., Yegorkina A. A. Anti-ulcer activity of complex collection of medicinal plants. Medical ecology. The science. 2009. No. 4-5. - p. 119-124.
9. Klimentova D. A. Anti-ulcer properties of the infusion of the aboveground part of *Fragaria vesca* (Rosaceae) / D. A. Klimentova, S. G. Aksinenko, A.V. Gorbacheva et al. // Rast. resources. - 2005. - T. 41, issue 2. - pp. 129-134.
10. Lorenz Samira Elshadovna, Zharikov Alexander Yuryevich, Bobrov Igor Petrovich, Mazko Olesya Nikolaevna, Makarova Olesya Gennadyevna, and Kiselev Valery Ivanovich. „Gastroprotective effect of a peptide complex from pig kidney tissues in experimental „indomethacin” ulcer in rats „ Siberian Scientific Medical Journal, vol. 37, No. 6, 2017, pp. 5-9.
11. Churin B. V. Digestive motility of the stomach and small intestine in patients with ulcerative disease / B. V. Churin // Klin. med. - 1996. - Vol. 74, No. 6. - p. 23-27.
12. Zueva E. P., Reichart D. V., Krylova S. G., etc. Medicinal plants in the treatment of gastric ulcer and duodenal ulcer. Tomsk: TSU Publishing House, 2003. 212 p.
13. Sheuchuk S.V. Anti-inflammatory activity of the herb *kipreyauzkolistnogo*/ S. V. Sheuchuk, N. S. Gurina / / BSMU in avangard of medical science and practice. -2020. - No. 10. - pp. 460-463.
14. Zvershkhankovskiy F. A., Vainshtein S. G. Free radical lipid oxidation and antioxidant systems in the pathogenesis of gastroduodenal ulceration. case. 1987. 9: 42-45.
15. Sheuchuk S. V. Antioxidant activity of the grass of narrow-leaved cypress (*ivan-tea*) / S. V. Sheuchuk, N. S. Gurina // Medical Journal-2021. - No.1. - pp. 116-120.

CZU: 615.322.074:582.972

COMPOZIȚIA CHIMICĂ A SPECIILOR | CHEMICAL COMPOSITION GALIUM VERUM L. ȘI G. MOLLUGO L. | OF GALIUM VERUM L. AND G. MOLLUGO L.

Angelica Ohindovschi, Maria Cojocaru-Toma, Tatiana Calalb

Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

Autor corespondent: angelica.ohindovschi@usmf.md

Abstract. Species of the genus *Galium* (Rubiaceae family) bloom at the summer solstice and have a special role in the traditions and spirituality of our people. Although, some species have been used for hundreds of years in traditional medicine, their therapeutic qualities are still little highlighted, and in the Republic of Moldova they are not studied until the present. Of the more than 600 species of g. *Galium*, two of them – *G.verum* and *G.mollugo* have a diverse chemical composition and are considered to be medicinal plants. Previous pharmacological studies have shown that species of g. *Galium* possess antioxidant, diuretic, spasmolytic, cytotoxic, antimicrobial, endocrine and protective effects [3,8]. Chemical compounds identified in species of g. *Galium* are: iridoids, phenolic compounds, flavonoids, phenolic acids, tannins, essential oils, coumarins, anthracene derivatives, etc.

Keywords: *G. verum*, *G. mollugo*, chemical compounds, pharmacological action.

Rezumat. Speciile genului *Galium* (familia Rubiaceae) înfloresc la solstițiul de vară și au un rol aparte în tradițiile și spiritualitatea poporului nostru. Deși, unele specii sunt utilizate de sute de ani în medicina tradițională, calitățile terapeutice ale acestora sunt încă puțin puse în evidență, iar în Republica Moldova nu sunt studiate până în prezent. Dintre cele peste 600 de specii ale g. *Galium*, două din ele – *G.verum* și *G.mollugo* au o compoziție chimică diversă și sunt considerate a fi plante medicinale. Studiile farmacologice anterioare au arătat că, speciile din g. *Galium* posedă efecte antioxidante, diuretice, spasmolitice, citotoxice, antimicrobiene, endocrine și protectoare [3,8]. Compuși chimici identificați în speciile g. *Galium* sunt: iridoide, compuși fenolici, flavonoide, acizi fenolici, substanțe tanante, uleiuri volatile, cumarine, derivați de antracen.

Cuvinte cheie: *G. verum*, *G. mollugo*, compuși chimici, acțiune farmacologică.

INTRODUCERE

Dintre toate sărbătorile, sânzienele au un farmec aparte, ce dau naștere unui spectaculos ceremonial magic în noaptea de 23 spre 24 iunie. Cunoscută și ca florile solstițiului de vară, în această zi se culeg sânzienele, iar noaptea este una cu adevărat magică, în care se aprind focuri de vară și se fac ritualuri. Din perspectiva mistică, se spune că în noaptea de 23 iunie porțile cerului se deschid și orice muritor, care bate la vămile nevăzutului poate să intre doar dacă poartă o coroană galbenă de flori sau duce un fir de sânziană. În Moldova, Muntenia și Dobrogea sărbătoarea se numește Drăgaică, iar fetele împletesc drăgaici (cununi de sânzien). În ziua de sânzien, fetele și femeile care poartă în păr cununi sau își pun flori de sânzien în sân, vor deveni mai atrăgătoare. În alte zone ale României (Maramureș) se sărbătorește noaptea focurilor de vară, când după căderea întinericului, bărbații se adună pe dealuri ținând făclii aprinse din care sar scânteii, iar fetele dansează asemeni făcliiilor [33].

Astfel, mitologia poporului român a perpetuat credințe străvechi moștenite din religiile primitive ale primelor civilizații europene, iar obiceiurile populare abundă în multe țări și regiuni. Cu toate că speciile g. *Galium* sunt utilizate de sute de ani în medicina tradițională, calitățile medicinale ale acestor plante sunt încă puțin puse în evidență, iar în

Republica Moldova nu sunt studiate până în prezent, fapt ce ne-a încurajat să luăm aceste specii în studiu. În flora mondială g. *Galium* L. cuprinde 600 specii, preponderent plante perene, specifice zonei temperate ale ambelor emisfere nordice și sudice [1, 8], în România, g. *Galium* include 38 specii, ce au ca habitat pajiști cu o calitate ecologică medie, răspândită de la șes până la zona subalpină [23]. În flora Republicii Moldova cresc 20 specii ale g. *Galium*.

Scopul lucrării a fost evaluarea studiilor științifice privind compoziția chimică a speciilor *G. verum* și *G. mollugo* în vederea identificării compușilor chimici cu potențial farmacoterapeutic pentru valorificare fitoterapeutică.

MATERIALE ȘI METODE

Pentru realizarea scopului trasat au fost identificate și evaluate publicațiile științifice privind compoziția chimică a speciilor *G. verum* și *G. mollugo* de pe platformele: *PubMed*, *Google Scholar*, *Hinari*, *CrossRef*, *EduAcademia* etc. Analiza studiilor științifice a fost efectuată prin următoarele criterii: corologia speciilor, tradiții de utilizare, profilul chimic, metode chimice de izolare, analiză și particularități farmacoterapeutice.

REZULTATE

Descrierea botanică. Dintre cele peste 600 de specii ale g. *Galium* (familia *Rubiaceae*), răspândite în flora mon-

dială, două din ele – *G. verum* și *G. mollugo* au o compoziție chimică diversă, sunt mai studiate și considerate a fi plante medicinale. Extractele obținute din părți aeriene sunt bine tolerate și se încadrează în clasa de toxicitate 4, fiind practic inofensive [12]. Părțile aeriene ale speciilor *Galium* intră în componența unor ceaiuri medicinale sau fitopreparate cu efecte analgezice, antireumatice și antipsoriatice (**Sciargo Herb, Tabritis, Gerard House Buchu compound tablets, Psorasolv ointment**).

Galium verum L. (drăgaică, sânziene-galbene, floarea-sfântului-Ioan) este o plantă erbacee. Are tulpina erectă sau ascendentă, tetra-muchiata, rigidă, pubescentă, în partea superioară se ramifică, iar la maturitate lemnifică și ajunge până la 60-120 cm înălțime. Frunzele, dispuse câte 8-12 în verticil, au 1-3 cm lungime și 2 cm lățime, sunt de culoare verde-închis, liniare, cu margini răsucite, glabre pe față, iar pe partea dorsală tomentoase, acoperite cu peri scurți moi, cu nervuri proeminente. Florile sunt mici, diametrul de 4-7 mm, cu 4 petale unite la bază, de culoare galbenă-aurie, plăcut mirositoare, cu lobi corolei obtuși, formând cime. Fructele sunt mici, glabre și netede de tip achenă, împărțite în două mericarpe.

Sunt plante cu o răspândire largă în Europa, Africa de Nord și Asia, din Israel și Turcia până în Japonia și peninsula Kamchatka [5, 22].

Este considerată o plantă invazivă ce vegetează prin fânețe, tufișuri, livezi, pășuni, margini de păduri și poieni [8,29].

Părțile aeriene de *G.verum* sunt recomandate în boli cutanate (răni, furuncule, acnee, psoriazis, erupții tegumentare) prin proprietăți regenerative, cicatrizante, sub formă de suc proaspăt din părți aeriene, care se picură pe plăgi cutanate de 2-3 ori în zi sau sub formă de decoct (100 g de produs vegetal mărunțit și uscat la un litru de apă) folosit sub formă de băi locale, spălături în afecțiuni ale pielii și în reumatism.

Datorită mirosului dat de cumarine planta este folosită ca repelent. În Scoția planta este utilizată pentru coagularea laptelui și colorarea produselor lactate, printr-un colorant galben. O băutură specifică pe bază de alcool este preparată în Danemarca, iar popoarele scandinave o folosesc pentru efectul sedativ [33].

Galium mollugo L (sânziene-albe) este o specie erbacee cu tulpină subțire, prostrată sau ascendentă, rar erectă, tetra-muchiata, glabră sau slab pubescentă, cu înălțimea între 15 și 100 cm. Frunzele dispuse câte 8 în verticil, sunt liniare până la lanceolate sau obovat-lanceolate, de obicei mai largi de 1,5 mm, cu vârful ascuțit, pe margine cu asperități direcționate înainte. Florile cu caliciul cu 4 diviziuni scurte și corola albă, plan-rotacee sunt dispuse în panicule terminale. Înflorște din luna mai până în septembrie. Fructul de tip achenă este format din 2 mericarpe aderente.

Planta crește pe marginea drumurilor, în fânețe, poieni și pășuni.

Părțile aeriene de *G.mollugo* L. sunt întrebuițate ca antispasmodic, diuretic, calmant [3, 9].

Recoltarea produselor vegetale: părțile aeriene de *G. verum* și *G. mollugo* se recoltează în perioada lunilor iunie-septembrie, pe timp frumos, cu soare, se usucă în straturi subțiri, se păstrează în încăperi bine aerisite, în ambalaj etichetat [6,14].

Compuși chimici. Mulți autori în publicațiile științifice [8, 20, 29] indică că plantele produc metaboliți secundari, care sunt derivați din metaboliții primari și constituie o sursă importantă de produse fitoterapeutice. Până în prezent au fost izolate mai multe grupe de compuși chimici din speciile *G. Galium: G. verum* și *G. mollugo*. În baza investigațiilor și studiilor fitochimice efectuate au fost puse în evidență: glicozide iridoide, compuși fenolici, flavonoide, acizi fenolici, derivați de antracen, ulei volatil, precum și substanțe tanante, saponozide și cumarine, în cantități mai mici [3, 32].

Glicozide iridoide. Atât *G. verum*, cât și *G. mollugo* sunt plante bogate în iridoide (**Tabelul 1**), asperulozida, acidul asperulozidic și diacetil-asperulozidic, monotropein scandozid, daflozid, acetil-daflozid, fiind identificate în ambele specii, atunci când secogaliozidul, marcat ca un marker chimiotaxonomic important, ce stimulează funcția glandei tiroide, a fost identificat doar în părțile aeriene de *G.mollugo* [20]. Evaluarea concentrației asperulozidei în produse vegetale, pe întreaga perioadă de vegetație, indică un conținut maxim în perioada înfloririi, cu cea mai mare concentrație de asperulozidă în inflorescențele de *G.verum* [4, 17]. Asperulozida poate fi transformată în prostaglandine, ce poate fi de interes pentru industria farmaceutică [10, 17]. Extractele din părți aeriene de *G. verum* și *G. mollugo* se administrează persoanelor cu noduli tiroidieni, sub formă de tinctură (1:10), doar după controlul dimensiunilor acestora și efectuarea analizelor hormonale, tratamentul fiind respectat conform indicației specialistului endocrinolog [4, 30].

Compuși fenolici. Studiile fitochimice prezintă un spectru larg de compuși fenolici în extracte etanoliche din părți aeriene de *G. verum* și *G. mollugo*, pentru diferite concentrații de alcool etilic (30, 50, 60 și 70%) [16]. Rezultatele indică că totalului de polifenoli, exprimat în acid galic, depinde, atât de natura și concentrația solventului, cât și de tehnica de extracție aplicată, cu diferențe mari, de la (2,44-5,16) mg/g în produsul vegetal uscat de *G. verum*, recoltat în Serbia [14], până la 75,3 mg/g în extractul metanolic de *G. verum* [13]. În ceea ce privește aplicarea diferitor tehnici de extracție: cu ultrasunet, prin macerare, la reflux, s-a demonstrat că cea mai mare cantitate de compuși fenolici a fost obținută prin aplicarea metodei de extracție prin reflux [25]. Autorii [8, 31] indică, că prin extragerea cu apă și cu soluții hidroalcoolice în concentrații joase are loc oxidarea și degradarea unor compuși bioactivi de natură fenolică, iar solubilitatea polifenolilor și flavonoidelor crește odată cu aplicarea temperaturilor mai înalte.

Un grup de autori din România [8, 21, 29] prin aplicarea metodei cromatografice de înaltă performanță (HPLC) determină 19 compuși fenolici în extracte etanolice obținute din părți aeriene de *G. verum* și *G. mollugo*, cu repartizarea lor pe grupe: 8 acizi fenolici, 4 glicozide ale quercetinei și 7 flavonoide (agliconi de flavonol și flavone), menționate în tabelul 1. Vlase L. și colaboratorii [29] indică, că tehnica HPLC permite o analiză simultană a diferitor clase de polifenoli printr-o singură coloană de trecere, cu separarea tuturor compușilor examinați, metoda fiind efectuată până la 35 de minute.

În extractul etanolic din părți aeriene de *G. verum* se pun în evidență flavonozidele: rutozida, componentul identificat în cea mai mare cantitate, urmată de kaempferol, quercitrină, quercetină, apigenină, atunci când cinnarozida, palustrozida și astragalina au fost detectate în cantități minore. Din acizii fenolici: în cantități mai mari a fost identificat acidul galic, clorogenic și cafeic, în timp ce acidul p-coumaric și ferulic au fost identificați în concentrații prea mici pentru a putea fi cuantificate [8, 29].

În extractul etanolic din părți aeriene de *G. mollugo* au fost identificate din flavonozide: rutozida - în cantități mai mari, urmată de izorutozidă și quercetină, iar izoquercetina și luteolina - în concentrații prea mici pentru a putea fi cuantificate (<0,2 mg/100 g). În ceea ce privește acizii fenolici, acidul galic și p-coumaric a fost găsit în cea mai mare cantitate, urmați de acidul cafeic, clorogenic, ferulic, în concentrații prea mici pentru cuantificare (<0,2 mg/100 g) iar acidul vanilic și ursolic - în cantități infime. Menționăm, că prezența luteolinei în extractul din *G. mollugo* ar putea servi ca un marker important chimiotaxonomic care ar putea evita impuritățile cu taxoni de *G. verum* [28, 29]. Alt studiu efectuat în România de profesorul Tămaș M. referitor la dozarea flavonoidelor prin metoda spectrofotometrică și cromatografie de înaltă performanță, indică că totalul de flavonoide este de cca trei ori mai mare în extractele etanolice de *G. verum* (6,4 mg/g) în comparație cu *G. mollugo* (2,2 mg/g) [28]. Lianrong D. și colaboratorii [15] pun în evidență rolul diosmetinei din extractele de *G. verum* și valorile activității acesteia în tromboza venoasă, acțiune confirmată prin studii preclinice pe șobolani, în scopul identificării de noi substanțe cu acțiune trombolitică. Diosmetina (mono-metoxiflavonă) se prezintă în concentrații mai mari în extracte de *G. verum* (1,5- 2,1), urmate de *G. mollugo* (0,8-1,3).

Substanțe tanante. Conținutul de substanțe tanante se prezintă în produse vegetale de *Galium* după extragere prin macerare cu acetonă timp de 24 ore și în soluții hidroalcoolice de 30% la temperatura de 60°C timp de 2 ore. Rezultatele indică un conținut de zeci de ori mai înalt în extractul acetonic, atât pentru taninuri, cât și pentru acțiunea antioxidantă a taninurilor izolate din produsele vegetale, soluția de acetonă și metoda de macerare, fiind optime pentru extragerea substanțelor tanante din speciile *g. Galium* [7]. Conținutul de epicatehină în *G. verum*

constituie 0,08%, urmat de un conținut mai scăzut în *G. mollugo* (0,03-0,06%) [4].

Derivații antraceni. Se indică că derivații antraceni se acumulează în vacuole pentru specia *G. mollugo* [9]. În plus, a fost demonstrată, de asemenea, prezența a 1,3-dihidroxi-2-metilantraquinon; 2-hidroxi-1,3-dimetoxiantraquinon; 2,5-dihidroxi-1,3-dimetoxiantraquinon în extracte de *G. verum* [2]. Constatăm, că, datele privind prezența antrachinonelor în speciile *g. Galium* sunt limitate, sugerând și ideea că sunt prezente într-o cantitate mult mai mică în comparație cu alți compuși chimici cu valoare farmacologică.

Saponozide triterpenice. Datele indică prezența saponozidelor triterpenice pentru speciile *g. Galium*. În părțile aeriene de *G. verum* s-au identificat: 2 glicozide monoterpene, cum ar fi betulalbusida și (2e)-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol-6-o-β-glucopiranozid; triterpene ursane (acid ursolic, euscafic, tormentic, uvaolic); oleanane și lupine [24].

Ulei volatil. Mirza M. și colaboratorii [19] au constatat că uleiul volatil obținut prin hidrodistilare din părțile aeriene de *G. verum* recoltate din Iran a atins 1,3% în produsul vegetal uscat, cu identificarea a peste 20 de componente, dintre care cele majore sunt cariofilenul (26%), oxidul de cariofilen (16,2%) și germacrenul D (11,3%), atunci când Soleimani și Ali Zade au identificat 25 de componenți din uleiul volatil din *G. verum* cu menționarea componentelor majore: fitol (9,3%), tetradecan (11,8%), hexadecan (12,3%), n-tetradecan (17,9%) [26]. Analiza chimică a constituenților extrași din *G. verum* (China), indică 11 compuși identificați, unde în cantități mai mari se menționează: [+]- pinosinol, epipinosinol; [+]- medioresinol, izoramnetin [32]. Astfel, componenții uleiului volatil depind de calitatea produsului vegetal și de metoda de extragere, în mare parte fiind aplicată extragerea prin distilare [11, 19].

Fitosteroli. Se găsesc în membranele celulare ale plantelor și au fost identificați în ambele specii, fiind cunoscuți ca steroli vegetali similari din punct de vedere al colesterolului, au importanță în biosinteza hormonilor steroidici, a vitaminei D, cât și în menținerea nivelului de colesterol în organismul uman. Se indică că *G. mollugo* conține β-sitosterol (19,1 μg/g) și campesterol (15,0 μg/g), iar *G. verum* (85,5 mg/g) - β-sitosterol și (9,8 mg/g) - campesterol, cu un conținut mai înalt de β-sitosterol pentru *G. verum*, atunci când campesterolul prevalează în *G. mollugo* [27, 29].

Cumarine. Părțile aeriene proaspete recoltate de *G. verum* conțin melilotozidă, care se transformă în cumarină în timpul uscării produsului vegetal, a cărei concentrație poate ajunge până la 1%. Prin mirosul puternic dat de cumarină, specia este folosită ca repelent, protejează de înțepăturile de insecte [3, 8].

Minerale. Ambele specii (*G. verum* și *G. mollugo*) servesc ca surse de săruri minerale naturale, precum potasiu, calciu și magneziu. Evaluarea compoziției mineralelor în

extractele alcoolice obținute din flori de *G. mollugo*, prin macerare, extracție la reflux și extracție cu ultrasunet, indică că cel mai mare randament de calciu și magneziu poate fi realizat la extragerea cu ultrasunet [18].

Tabelul 1. Compuși chimici în speciile *G. verum* și *G. mollugo*

Compuși chimici	<i>G.verum</i>	<i>G. mollugo</i>	Referințe bibliografice
Glicozide iridoide			
Asperulozidă	+	+	Mathe I. et al., 1984 Vadasz A., 1984 Hetenyi L, Mitova M., 2002 Iavarone C., 2003
Acid asperulozidic	+	+	
Acid diacetil- asperulozidic	+	+	
3,4-dihidro-3-metoxi-asperulozidă	+	+	
Monotropeină	+	+	
Daflozidă	+	+	
Acetil-daflozidă	+	+	
Scandozidă	+	+	
Secogaliozidă	-	+	
Compuși fenolici	25,3- 75,3 mg/g	4.57-5.16 mg/g	
Epipinoresinol, (+) -medioresinol, izoramnetin, isoramnetin 3-O-alfa-L-ramnopiranozil- (1-beta-D-glucopiranozid	+	-	Layali I, 2016 Lakis N., 2010 Ebrahimzadeh M, 2016 Tămaș M., 2006 Matei A., 2015 Mocan A., 2016 Vlase L., 2016
1- (4-hidroxifenil) -etanol, (+) - pinoresinol 4,4'-O-bis-beta-D-glucopiranozidă, epipinoresinol	+	-	
Astragalın (kaempferol 3-O-3- glucoiranozid- liltin (quercetin 3-o- rutinozid	+	-	
(2E)-2,6-dimetil-2,7octadien-1,6-diol-6-o-β-glucopiranozid	+	-	
Betulalbizid A	+	-	
Flavonoide	6,3-10,7 mg/g	2,1-2,2 mg/g	
Rutozidă	2,64	0,72	Lianrong D., 2010 Tămaș M., 2006 Matei A., 2015 Mocan A., 2016 Vlase L., 2016
Izorutozidă	1,23	0,54	
Quercetină	2,15	0,33	
Izoquercetină	1,33	0,2	
Quercitrină	2,46	-	
Apigenină	2,08	-	
Luteolină	-	0,61	
Kaempferol	2.50	-	
Cinarozidă	+	-	
Palustrozidă	+	-	
Astragalină	+	-	
Diosmetină	1,5- 2,1	0,8-1,3	
Diosmetin 7-O-beta-D-glucopiranozidă	+	-	

Compuși chimici	<i>G.verum</i>	<i>G. mollugo</i>	Referințe bibliografice
Acizi fenolici			Layali I., 2016 Ebrahimzadeh M., 2012 Zhao C., 2009 Vlase L., 2014
Cafeic	2,96	<0,2 mg	
Clorogenic	3,22	<0,2 mg	
p-coumaric	0,98	0,68	
Ferulic	0,84	<0,2 mg	
Galic	5, 16%	4,57%	
Rubifolic	+	+	
Vanilic	-	+	
Ursolic		+	
Taninuri catehice			Gaamoune S., 2014 Demirezer O., 2006 Hanganu D, 2018
Epicatehină	0,08%	0,03-0,06%	
Uleiuri volatile			Mirza M, 2004 Navaei M, 2004 Zhao C., 2009
Cariofilen	26%	12,4%	
Oxid de cariofilen	16,2%	-	
Germacren D (<i>flores</i>)	11-27%	-	
2-metilbenzaldehyd (<i>folia</i>)	11,5-26,3%	-	
Derivatii antracenului			Bradic J., 2018 Vlase L., 2016
Fiscionă	+		
1.3-dihidroxi-2-metil-antraquinon	+		
2-hidroxi-1.3-dimetoxiantraquinon	+		
2,5 - dihidroxi-1.3-dimetoxiantraquinon	+		
Saponozide			Salvadore D., 2000, Esmail A., 2002, Bradic J., 2018
Ursane (acid ursolic, euscific, tormentic, uvaolic)	+	+	
Oleanane (acid oleanolic)	+		
Lupane (betulin, lupeol)	+		
Betulalbusida (2e)-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol-6-o-β-glucopiranozid	+		
Fitosteroli			Matei A., 2015, Crișan G., 2015
β-sitosterol	85,5 mg/g	19,1 μg/g	
Campesterol	9,8 mg/g	15,0 μg/g	
Cumarine	< 1%	< 1%	Bradic J., 2018 Hanganu D., 2018

Studiile recente indică prezența unui spectru larg de compuși chimici, inclusiv unii noi, care n-au fost descriși anterior în literatura științifică de specialitate. În extractele etanolice din părți aeriene de *G. verum*, prin aplicarea tehnicilor analitice moderne ca spectrometria de masă și cromatografia de lichide de înaltă performanță din grupul terpenelor (dihidroactinoliolidelor), au fost identificați: 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-2(4h)-benzofuranonă; acid tetradecanoic; 3-metil-1-butanolbenzoat; ftalat dibutilic; acid octadecanoic. Astfel, studiile numeroase

confirmă că speciile *G. verum* și *G. mollugo* au o compoziție chimică diversă, iar mulți compuși chimici au potențial terapeutic ridicat, care urmează să fie explorat farmaceutic.

CONCLUZII

Studiile științifice evaluate denotă că speciile *G. verum* și *G. mollugo*, utilizate cu succes în medicina tradițională a multor popoare, sunt bogate în diferite clase de compuși chimici valoroși cu potențial înalt farmacoterapeutic.

Speciile *G.verum* și *G.mollugo* sunt frecvente în habitatele naturale din flora Republicii Moldova și necesită a fi studiate prin abordări complexe (biologice, farmacognostice, farmacologice etc.) pentru a putea fi valorificate în scop farmaceutic în industria farmaceutică națională.

BIBLIOGRAFIE

- Abdel K., Abd El-Ghani M. A palynological study of *Galium* L. (Rubiaceae) in Egypt and its systematic implication. *Feds. Rep.* 2007, p. 311–326.
- Banthorpe D., White J. Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of *Galium verum*. *Phytochemistry*, 1995 (38), p.107–111.
- Bradic J., Percovic A., Tomovic M. Phytochemical and Pharmacological Properties of Some Species of the Genus *Galium* L. *Galium verum* and *mollugo*, 2018, Serbian Journal of Experimental and Clinical Research, DOI:10.1515/sjecr-2017-0057.
- Demirezer L., Gurbuz F., Guvenalp Z. et al. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. *Turk J Chem*, 2006 (30), p. 525–534.
- Esmail A. *Galium verum* L. - a review. *American Journal of Pharmaceutical sciences*, 2002, p.167–173.
- Farmacopeea Europeană (FE). (2018), ed. 9, EDQM.
- Gaamoune S. The comparison of two tannin extraction methods from *Galium*. *Poiret and their antioxidant capacities*. *D. Pharmacia Lettre*, 2014 (6), p.114–119.
- Hanganu D. et al. *Galium* species - polyphenolic content and their antioxidant potential. *Hop and Medicinal Plants*, Year XXVI, No. 1-2, 2018, p. 84–94.
- Heide L., Leistner E. Enzyme activities in extracts of anthraquinone-containing cells of *Galium mollugo*. *Phytochem.* 1983 (22), p. 659–662.
- Iavarone C., Sen A., Trogole C. et al. Mollugoside, an iridoid glucoside from *Galium mollugo*. *Phytochemistry*, 2003 (22), p.175–178.
- Kovaleva A., Goryachaya O. et al. Essential oil from *Galium verum* flowers. *Chem Nat Compd*, 2009 (45), p. 587–588.
- Kuznetsova M. Investigation of the toxicity of yellow bedstraw (*Galium verum*) aqueous extract. *Pharmacy*, 2018, p. 56–72.
- Layali I., Ebrahimzadeh M. et al. Antioxidant properties of *Galium verum*. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 2016, 6 (3), 31–37.
- Lacic N. et al. Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts. *Central European J of Biology*, 2010, 5 (3), p. 331–337.
- Lianrong D. et al. Diosmetin Substituent in *Galium verum* L. Acting on Venous Thrombosis, DOI:10.1109/ICB-BE.2010.5516270, 2010, p.78–93.
- Matei A., Gatea F., Radu G. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC-MS. *J Chromatogr Sci*, 2015 (53), p.114–1154.
- Mathe I. et al. Variation in the production of asperuloside *Galium verum* L. during the vegetation period. *Acta Hort*, 1984 (144), p.49–56.
- Milic P., Bekric D., Milic S. et al. A study of the extraction kinetics of the minerals from the white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.) by using an artificial neural network, *Hem Ind*, 2011 (65), p. 313–321.
- Mirza M., Navaei M., Dini M. Essential oil of *Galium verum* L. from Iran. *Iran J Pharm Res*, 2004 (3), p. 86–88.
- Mitova M., Anchev M., Handjieva N. et al. Iridoid patterns in *Galium* L. and some phylogenetic considerations. *Z Naturforsch C*, 2002 (57), p.226–234.
- Mocan A., Crișan G., Vlase L. et al. Phytochemical investigations on four *Galium* species (Rubiaceae) from Romania, *Farmacia*. 2016 (64), p.95–99.
- Neda S. et al. Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts. *Central European Journal of Biology*, 2010, p. 331–337.
- Pauca A. Fam. Rubiaceae, Flora of the Romanian People's Republic. Editura Academiei Republicii Populare Române, București, Vol 8, 1961, p. 524–589.
- Salvatode D. Triterpene saponins and iridoid glucosides from *Galium*, *Phytochemistry*, 2000, 54 (8), p. 751–756
- Shafaghat A., Salimi F., Aslaniyan N. et al. Flavonoids and an ester derivative isolated from *Galium verum* L. *World Appl Sci J*. 2010 (11), p. 473–477.
- Soleimani M., Ali Zade A. The Study of stainless steel corrosion inhibition in hydrochloric acid solution by *Galium verum* L. extract, First National Chemistry and Nanotechnology Conference. Rasht Branch, Islamic Azad University, Guilan, Iran, 2014, p. 92–103.
- Zhao C., Shao J., Cao D. et al. Chemical constituents of *Galium verum*. *China Journal of Chinese Materia Medica* 2009 (34), p. 2761–2764.
- Tamaș M., Stana D., Timiș S. Comparative phytochemical research of *Galium verum* L. and *G. mollugo* L. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 2006 (34), p.18–20.
- Vlase L., Mocan A., Hanganu D. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Galium* species (Rubiaceae). *Dig J Nanomater Biostruct.* 2014 (9), p.1085–1094.
- Uesato S., Ueda M., Inouye H. et al. Iridoids from *Galium mollugo*. *Phytochemistry*, 2003 (23), 2535–2537.
- Zhao C., Shao J., Li X. et al. Flavonoids from *Galium verum* L. *J Asian Nat Prod Res*, 2008 (10), 613– 617.
- Zhao C., Shao J., Cao D. et al. Chemical constituents of *Galium verum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2009 (34), p. 2761–2764.
- Galium verum*. Academic Dictionaries and Encyclopedias, <https://en-academic.com/dic.nsf/en-wiki/1322925>, accesat la 12.03.2021.

CZU: 615.212:615.477.66

IN VITRO DISSOLUTION PROFILE OF TRANSDERMAL MATRIX IBUPROFEN PATCHES USING PADDLE METHOD

PROFILUL DE DISOLUȚIE IN VITRO AL MATRICELOR TRANSDERMALE EMPLASTURI CU IBUPROFEN UTILIZÂND METODA PADEL

Natalia Golyak, Svetlana Malchenkova

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Rezumat. Hidrogelul de poli(vinil pirolidonă) cu greutate moleculară mare (PVP) și poli(etilen glicol) 400 cu greutate moleculară mică (PEG 400) a fost utilizat ca matrice adezivă a sistemului de livrare transdermică a foribuprofenului. Au fost elaborate cinci plasturi, fiecare conținând 0,2 ibuprofen. Testul de dizolvare a plasturilor transdermici a confirmat eliberarea ibuprofenului din matricea tuturor plasturilor și a determinat fluxul de ibuprofen. Fluxul mediu constant de ibuprofen a fost de 1,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ pentru doi plasturi, 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ pentru doi plasturi și 1,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ pentru un platură.

Cuvinte cheie: ibuprofen, platură transdermic, PVP: hidrogel PEG.

Abstract. The hydrogel of high molecular weight poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) and low molecular weight poly(ethylene glycol) 400 (PEG 400) was used as adhesive matrix for ibuprofen transdermal delivery system. Five patches were made, each containing 0,2 ibuprofen. The dissolution test for transdermal patches confirmed the release of ibuprofen from the matrix of all patches and determined the ibuprofen flux. The average constant ibuprofen flux was 1.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ for two patches, 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ for two patches, and 1.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ for one patch.

Keywords: ibuprofen, transdermal patch, PVP: PEG hydrogel.

INTRODUCTION

Transdermal drug delivery systems (TDDS) serve to deliver active pharmaceutical ingredients through intact skin into the bloodstream. Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) patches are used to create concentrations of NSAIDs in the local circulation. Modern TDDS with ibuprofen (Voltaren), ketoprofen (Ketoplastin), diclofenac (Flector) are matrix systems. The matrix consists of one or a mixture of polymers with a dissolved or dispersed active substance [1, 2]. Polymer matrix (acrylic, silicone, rubber, block copolymer, etc.) has the property of the pressure-sensitive adhesive for which the skin is a substrate [3]. The hydrogel, which is formed by mixing high molecular weight PVP and PEG 400, also has persistent adhesive properties, although individually these polymers are not tacky. The composition with 36% PEG shows the best adhesion properties. In a PVP: PEG 400 gel, PEG 400 oligomeric chains crosslink PVP strands. The terminal hydroxyls of PEG 400 form hydrogen bonds with the carbonyl groups of PVP [4].

The difference in the concentration of a substance between the matrix of the patch and the skin forms a transdermal flow described by Fick's first law for the diffusion of substances through a semipermeable membrane [5]. The skin is presented in the form of a semi-permeable membrane, which in laboratory conditions can be imitated by an artificial semi-permeable film. In accordance with the State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus, the "Dissolution" test for transdermal patches is carried out to confirm the release of the active substance. The

use of a semi-permeable membrane is allowed [6].

The purpose – confirm the release of ibuprofen from the PVP: PEG 400 matrix and determine its in vitro flux.

MATERIALS AND METHODS.

Preparation of transdermal ibuprofen patches. Ibuprofen patches were made using the irrigation-drying method. The backing for the plaster was Dupont (China) polyester fiber with a moisture-proof coating. Composition for adhesive base TTS with ibuprofen per patch:

Ibuprofen – 0,20

PEG 400 – 0,36

PVP – 0,64

Ethanol 96% – 7,00 ml

Ibuprofen was mixed in a 7 ml Ethanol 96%. PVP was poured with this solution and left for 12 hours to swell and dissolve. Then PEG 400 was added. The mass was stirred and left for 2-3 hours to naturally remove air bubbles. PEG 400 was then added. The adhesive mixture was poured onto a 25 cm² nonwoven backing and left to dry for 48 hours.

Apparatus and software. The dissolution test was carried out in an automatic dissolution tester Erweka, DH 2000, Germany. Since a hydrophilic base was used for the manufacture of TTS with ibuprofen, for the dissolution test, a semipermeable cellulose membrane Visking dialysis tubing, MWCO 12000-14000 with a pore diameter of 25 Å (Serva, Germany) was applied to each patch from the side of the removed film and was attached to the patch with the reverse sides with waterproof tape. The dissolution medium is a mixture of phosphate buffered saline

solution pH 7.4 and alcohol 96% in a 1: 1 ratio, 250 ml, T 32 ± 0.5 ° C. Samples with a volume of 5 ml were taken every hour with the return of the sampled volume to the tester's workstation. The dissolution test lasted 8 hours.

The amount of released ibuprofen was determined by UV spectrophotometry at a wavelength of λ 264 nm on a UV-Visible Spectrophotometer, Varian, Cary 50. The data were processed using the Cary WinUV computer program, Scan Application, 5.0.0.999.

To calculate the concentration of ibuprofen in the dissolution medium, a calibration graph of the dependence of optical density on the concentration of ibuprofen was constructed (Figure 1). So a series of solutions with a concentration of ibuprofen from 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ to 360 $\mu\text{g} / \text{ml}$ was obtained, for each of which the optical density was measured.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Analysis of the data reveals that the lag teim of ibuprofen for four of the five patches was 2 hours, for one the flow of ibuprofen was recorded already in the second hour of the test (Figure 2).

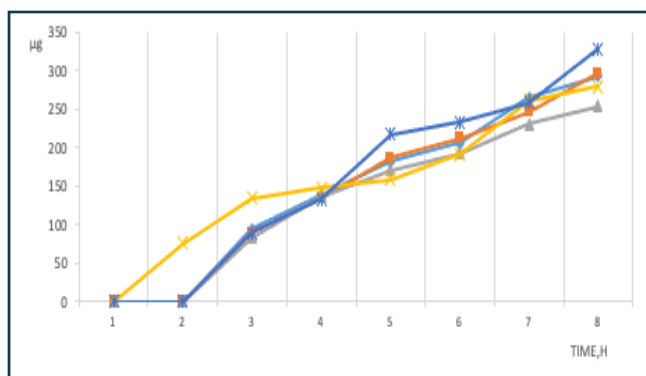


Figure 1. The calibration curve of the absorbance of the concentration of ibuprofen

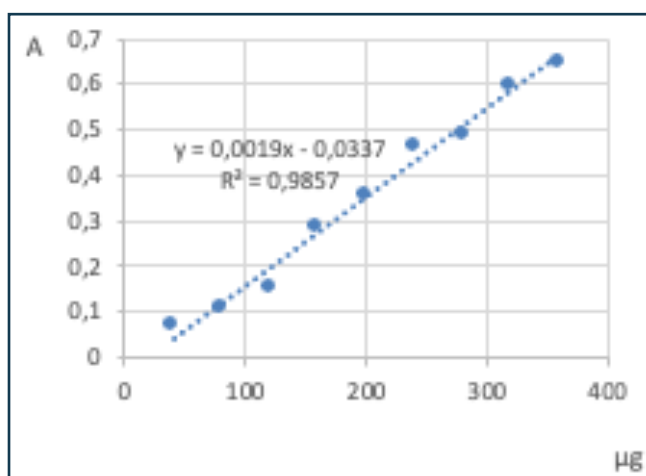


Figure 2. In vitro release profiles of ibuprofen from patches 1-5

For each patch, an average of 148.1 μg of ibuprofen was released during the 8 hours of the test (Table 1).

Table 1. In vitro ibuprofen release from patches 1-5 (μg)

Time (h)	Patches				
	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	75,60	-
3	94,10	89,80	83,50	134,1	88,80
4	138,3	134,1	137,2	148,3	133,5
5	181,9	186,7	170,4	159,3	217,7
6	206,7	213,0	193,0	191,4	233,5
7	264,6	246,2	230,4	260,9	258,3
8	293,0	296,2	254,1	279,8	328,3
Mean	147,3	145,6	133,6	156,2	157,5

On average, the transfer of ibuprofen through the semipermeable membrane increased at each hour of the test by 37.3 μg (Table 2).

Table 2. In vitro ibuprofen release from patches for each hour of the test 1-5 (μg)

Time (h)	Patches				
	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	75,6	-
3	94,1	89,8	83,5	58,5	88,8
4	44,2	44,3	53,7	58,5	44,7
5	43,6	52,6	33,2	14,2	84,2
6	24,8	26,3	22,6	11,0	15,8
7	57,9	33,2	37,4	32,1	24,8
8	28,4	50,0	23,7	69,5	70,0
Mean	36,6	37,0	31,8	39,9	41,0

The advantage of transdermal systems is their ability to form a constant flow of the active substance, which means that during the period when TTS is on the skin, the blood plasma maintains a constant level of the drug [7]. The flux ($\mu\text{g} / \text{cm}^2 \text{ h}$), that is, the mass of ibuprofen released per unit area of the patch 1 cm^2 per unit time (1 hour) was calculated by the formula: $J = m / St$, where m is the mass of ibuprofen (μg) released from the patch area S (25

cm²) for time t (h). On average, 1 cm² of a patch through a semipermeable membrane is 1.4 µg of ibuprofen per hour (Table 3).

Table 3. In vitro ibuprofen flux from patches 1-5 (µg / cm² h)

Time (h)	Patches				
	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	1,5	-
3	1,3	1,2	1,1	1,8	1,2
4	1,4	1,3	1,4	1,5	1,3
5	1,5	1,5	1,4	1,3	1,7
6	1,4	1,4	1,3	1,3	1,6
7	1,5	1,4	1,3	1,5	1,5
8	1,5	1,5	1,3	1,4	1,6
Mean	1,4	1,4	1,3	1,5	1,5

CONCLUSIONS

The hydrogel based on high molecular weight PVP and oligomeric PEG 400 is capable of releasing active substances and can serve as a basis for matrix of transdermal systems. The properties of the membrane can possibly influence the flux rate of ibuprofen. Despite the fact that the semipermeable membrane does not fully mimic the skin, it can still be considered as the same barrier to the release of ibuprofen as human skin. The *in vitro* release

profile of ibuprofen shows that the increase in the amount of ibuprofen in the dissolution medium was more or less uniform, which indicates a plateau of ibuprofen. The ibuprofen flux for each of the five patches differed slightly and averaged 1.4 µg / cm² h.

REFERENCES

1. Patel, D. M. Transdermal Drug Delivery System: A Review / D. M. Patel, K. Kavitha // The Pharma Journal. - 2012. - Vol. 1. - № 4. - P. 66-75.
2. MTA Dialog [Electronic resource]: Transdermale Pflaster (Teil 2). - Mode of access: <https://www.mta-dialog.de/artikel/transdermale-pflaster-teil-2.html>. - Date of access: 20.11.2021.
3. Benedek, I. Technology of pressure-sensitive adhesives and products / Benedek I., Feldstein M. // CRC Press Taylor & Francis Group, LLC. - 2009. P. 568.
4. Фельдштейн, М. Комплексообразование в смесях поливинилпирролидона с полиэтиленгликолем / М. М. Фельдштейн [идр.] // Высокомолекулярные соединения. - 1999. - Серия А. - Т. 41. - № 8. - С. 1316-1330.
5. Alkilani, A. Z. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum / A. Z. Alkilani, M. T. McCrudden, R. F. Donnelly // *Pharmaceutics*. - 2015. - № 7. - С. 438-470.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь. 2-ое издание. Т. 1. М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», Молодечно; 2012.
7. Pastore, M. N. Transdermal patches: history, development and pharmacology / M. N. Pastore Y. N., Kalia M., Horstmann M. S. Roberts // *British journal of pharmacology*. - 2015. - № 172(9). - С. 2179-209.

CZU: 615.322.074:582.824.3

EFECTELE FARMACOLOGICE ALE COMPUȘILOR CHIMICI
DIN SPECIA *HYPERICUM PERFORATUM* L. | PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF CHEMICAL
COMPOUNDS OF *HYPERICUM PERFORATUM* L.

Anna Benea

Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova**Autor corespondent:** anna.benea@usmf.md

Abstract. *Hypericum perforatum* L. is one of the most consumed in the world medicinal plants. The plant has a wide range of land uses in folk medicine, used to treat wounds, eczema, burns, ordinary colds, migraine, digestive tract diseases, is used in lightweight and moderate depression. *H. perforatum* L. presents great interest in antidepressant activity in mild and moderate depression. Due to the chemical composition, the plant possesses various pharmacological properties: antifungal, antibacterial, antiviral, anticonvulsive, anti-inflammatory, analgesics and photodynamic effect. In this article are presented scientific results about the pharmacological effects of biologically active compounds from St. John's wort, studied *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: pharmacological effects, chemical compounds, *Hypericum perforatum*

Rezumat. *Hypericum perforatum* L. este una dintre cele mai consumate în lume plante medicinale. Planta are o gamă largă de utilizări în medicina populară, folosită pentru tratarea rănilor, eczemelor, arsurilor, răcelii obișnuite, migrenei, bolilor tractului digestiv. *H. perforatum* L. prezintă mare interes pentru activitatea antidepresivă în depresie ușoară și moderată. Datorită compoziției chimice planta posedă diferite proprietăți farmacologice: antifungice, antibacteriene, antivirale, anticonvulsive, antiinflamatoare, analgezice și efect fotodinamic. În acest articol sunt prezentate rezultatele științifice despre efectele farmacologice a compușilor biologic activi din sunătoare, studiate *in vitro* și *in vivo*.

Cuvinte cheie: efectele farmacologice, compuși chimici, *Hypericum perforatum*

INTRODUCERE

Acțiunea antiinflamatoare a produselor vegetale și preparatelor fitoterapeutice din sunătoare se datorează prezenței flavonoidelor, uleiului volatil și substanțelor tanante, atunci când derivații antracenului determină acțiunea fotosensibilizantă. Flavonoidele – quercetolul și hiperozida, sunt componenți activi din tinctura de sunătoare, care răspund de efectul antihipnotic. Activitatea acestor compuși este mai înaltă comparativ cu hiperforina, deoarece efectul menționat se manifestă în doze mai mici [1]. Tinctura din sunătoare stimulează sistemul nervos central prin acțiunea neurotropă. Extractul uscat din părțile aeriene de sunătoare are acțiune diuretică și natriuretică [2]. Științific a fost dovedit că tinctura și extractul uscat din sunătoare posedă acțiune antidepresivă și anxiolitică [3,4]. Mai multe studii au demonstrat acțiunea antioxidantă a extractelor polifenolice din *H. perforatum* L. prin captarea radicalilor liberi. Extractele hidroalcoolice, obținute din părțile aeriene de *H. perforatum* L., conțin șase grupe majore de compuși chimici: naftodiantrone, floriglucinoși, flavonoide, biflavone, compuși fenilpropanici, proantocianidine. De asemenea, în produsul vegetal proaspăt și uscat de *H. perforatum* L. se conțin substanțe tanante și cantități mici de xantone, ulei volatil, aminoacizi [5, 6].

Scopul lucrării a fost revizuirea surselor bibliografice despre compoziția chimică și proprietățile farmacologice a compușilor biologic activi din *Hypericum perforatum* L.

MATERIAL ȘI METODE

Au fost analizate sursele bibliografice de specialitate, utilizând următoarele baze electronice: Medline, Pubmed, Hinari, Google Scholar.

REZULTATE

Peste 70 de ani au trecut de la prima izolare a naftodiantronelor (hipericinei și pseudohipericinei) din *H. perforatum* L. Până în prezent, aceasta grupă rămâne cea mai promițătoare din polifenoli, deoarece compușii ei fascinează cu proprietățile fizice, chimice și biologice [7]. Conținutul de compuși naftodiantronici în *H. perforatum* L. variază de la 0,05 până la 0,30%. În plantă de asemenea se conțin protohipericină, protopseudohipericină și ciclo-pseudohipericină. Acești compuși au fost identificați în părțile înflorite ale plantei și se localizează mai mult în punji pigmentate. Protohipericina și protopseudohipericina sunt considerate precursori ai hipericinei și pseudohipericinei, care respectiv, se obțin după expunere la lumină. Se cunoaște că pseudohipericina poate fi transformată în ciclo-pseudohipericină. Protohipericina, protopseudohipericina și ciclo-pseudohipericina sunt determinate în concentrații mai mici și sunt incluse în termenul analitic „hipericine totale” sau „totalul de naftodiantrone”. Conținutul de pseudohipericină (0,03–0,34%) este mai mare decât cel al hipericinei (0,03–0,09%) de la două până la patru ori [7].

Hipericina și derivații ei sunt studiați pentru proprietățile antitumorale, antivirale și antidepresive. Trebuie

remarcat faptul, că hipericina este unul dintre cei mai puternici agenți fotodinamici naturali. Proprietățile fotodinamice prooxidante a hipericinei au fost folosite pentru tratarea cancerului. Hipericina în combinație cu lumina foarte eficient induce apoptoza și necroza celulelor canceroase. Cercetările efectuate în ultimii ani *in vitro* au demonstrat că hipericina inhibă citomegalovirusul uman; inhibă capacitatea absorbivă a virusului febrei aftoase [7]. Hipericina manifestă o activitate semnificativă antidepresivă prin inhibarea enzimei monoamino-oxidaza (MAO) [5,8]. Majoritatea preparatelor antidepresive duc la creșterea disponibilității sinaptice a noradrenalinei și serotoninei, sau inhibă recaptarea monoaminelor. Anterior, a fost demonstrat efectul inhibitor al extractului din *H. perforatum* L. asupra absorbției sinaptomale a monoaminelor.

Feyzioglu B. et al. au studiat efectul antibacterian al hipericinei. Studiul a fost efectuat în două condiții diferite: expunerea la lumina naturală și la întuneric. Concentrația de hipericină de 64 mg/ml a inhibat creșterea *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) și *S. epidermidis* (ATCC 12228) în condiții fără lumină [9].

Derivații de floroglucinol sunt larg răspândiți în genul *Hypericum*. Doi compuși înrudiți hiperforină (2,0-4,5%) și adhidorforină (0,2-1,9%) sunt găsiți în *H. perforatum* L. Acești compuși chimici se găsesc numai în părțile reproductive (aproximativ 2% în flori, 4,5% în fructe imature și 4,4% în fructe mature) [5, 6].

S-a demonstrat *in vitro* că hiperforina inhibă sau modulează mai multe sisteme de neurotransmițătoare [5]. Mecanismul activității sale antidepresive este considerat inhibarea recaptării sinaptice a neurotransmițătorilor. Hiperforina este un inhibitor puternic al captării serotoninei (5-HT), dopaminei (DA), norepinefrinei (NE) și acidului gamma-aminobutiric (GABA) [9]. Hiperforina nu inhibă MAO-A și MAO-B [9]. Kurkin et al. au demonstrat acțiunea antidepresivă a hipericinei și hiperforinei, pentru ultimul a fost demonstrată și acțiunea neurotropică [3,4].

Silva et al. au demonstrat că hipericinele și hiperforinele nu au contribuit semnificativ la proprietățile antioxidante ale extractului etanolic din *H. perforatum* L. [8].

Pentru a demonstra proprietățile antidepresive a compușilor individuali sau a produselor extractive din plante medicinale, cercetătorii crează deferite modele de stres: testul înotului forțat (FST – forced swimming test), testul de suspendare a șoarecelui de coadă (TST – tail suspension test). Totalul de flavonoide din *H. perforatum* L. în dependență de doză, micșorează timpul nemișcării a șoarecilor în FST. Wan et al. au comparat efectul antidepresiv a extractelor alcoolice din *Hypericum sampsonii* Hance, *Hypericum faberi* R. Keller și *H. perforatum* L., supuse testelor FST și TST. S-a constatat că toate trei extracte pot scurta timpul nemișcării și rezistența depresivă la șoareci, iar *H. perforatum* L. a fost în mod evident mai eficient decât *H. faberi* R. Keller. Nöldner și al. au extras o serie de flavonoide din *H. perforatum* L., cum ar fi hiperozida, izoquercitrina și quercetin-3-O-miquelianin, toți compușii au demonstrat activitate antidepresivă evidentă. Acțiunea antidepresivă a hiperozidei a fost demonstrată și de cercetători din Federația Rusă [3]. În literatură sunt date

despre influența flavonoidelor asupra aminelor biogene (neurotransmițători monoaminici – NE, 5-HT și DA). Flavonoidele exercită efectul lor antidepresiv, prin creșterea conținutul de bioamine, imobilizând astfel reabsorbția lor de către sinaptozomi, în afară de aceasta ei blochează activitatea MAO [10, 12].

Unele flavonoide, precum hiperozida, quercetrina, izoquercetrina și amentoflavona pot provoca un efect sedativ, care ar putea implica atât benzodiazepinele cât și agoniștii receptorilor GABA [11, 12]. Silva B. et al. au studiat efectele compușilor fenolici prezenți în *H. perforatum* L. asupra excitotoxicității neuronale și disfuncției mitocondriale. Quercetolul, kaempferolul și biapigenina au redus semnificativ moartea neuronilor cauzată de acidul cainic. Acțiunea neuroprotectoare a fost corelată cu prevenirea dereglării calciului întârziat și cu menținerea potențialului electric transmembranar al mitocondriilor. Kaempferolul în combinație cu quercetina și biapigenina reduc peroxidarea lipidelor mitocondriale și pierderea potențialului electric transmembranar, cauzat de stresul oxidativ indus de ADP (adenozindifosfat) și fier. Activitatea neuroprotectoare a kaempferolului este mediată prin efectul antioxidant [8].

În literatura de specialitate sunt ilucidate date despre activitatea antibacteriană a compușilor chimici din clasa flavonoidelor împotriva bacteriilor gram-pozitive și gram-negative. Sursele bibliografice oferă date interesante privind mecanismul de acțiune a doi compuși (derivații flavonoluri): kaempferol și quercetol. Sa demonstrat că quercetolul crește permeabilitatea membranei citoplasmice a *Streptococcus pyogenes* care a dus la influența inhibitoare asupra acestei bacterii gram-pozitive. A fost observat efectul sinergic al quercetolului cu antibioticul ceftazidim [13]. Extractele polifenolice din *H. perforatum* L., obținute cu diverși solvenți, au demonstrat activitate antibacteriană împotriva *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 și *Candida krusei* ATCC 4243 [14]. Uleiul volatil din specia *H. perforatum* L. posedă proprietăți antibacteriene către: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas tolaasii*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, iar activitate antifungică către: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viride* [15].

Biflavonele sunt un grup de flavone dimere rar găsite în regnul vegetal. Trei compuși din acest grup: 3',8''-biapigenina (0,1-0,5%), amentoflavona și 6',8''-diquercetina [1] au fost identificate în *H. perforatum* L. Cu toate acestea, s-a demonstrat *in vitro* că amentoflavona se leagă cu receptorii benzodiazepinici ale creierului, dar nu penetrează bariera hemato-encefalică. Anterior a fost raportat că unele biflavonoide, inclusiv amentoflavona manifestă efect inhibitor asupra activității fosfolipazei A2 din grupa II. S-a constatat că amentoflavona inhibă ciclooxigenaza din epidermă fără a afecta lipoxigenaza (rezultate obținute în urma cercetarilor efectuate pe cobai). Activitatea

antiinflamatoare și analgezică a amentoflavonei, a fost confirmată la administrarea intraperitoneală prin ameliorarea edemului urechii șoarecelui, indus cu ulei de croton. De asemenea, s-a demonstrat activitatea antiinflamatoare puternică în modelul edemului lăbuței șobolanului indus de caragenan ($ED_{50}=42$ mg/kg) comparativ cu efectul antiinflamator a prednisolonului (35 mg/kg) și a indometacinei (10 mg/kg). Totodată, amentoflavona nu a prezentat activitate inhibitoare semnificativă împotriva artritei cronice induse la șobolani, dar a manifestat activitate analgezică puternică în testul crampelor induse cu acid acetic ($ED_{50} = 9,6$ mg/kg), comparativ cu efectul antiinflamator a indometacinei (3,8 mg/kg) [5]. A fost demonstrată acțiunea antidepresivă și anxiolitică pentru biapigenină [3, 4].

În *H. perforatum* L. se conțin taninuri condensate (derivății de catecol și leukoantocianidine), concentrația cărora variază de la 4,94-5,10% până la 10-12%, cu acțiune astringentă, antimicrobiană și antiinflamatoare. Proantocianidinele prezintă multe efecte biologice, inclusiv antioxidante, antivirale, antimicrobiene, vasoprotectoare și altele, dar nu a fost raportat nici într-o sursă bibliografică despre efectul antidepresiv [5].

Xantonele au fost găsite în toată planta la mai multe specii ale genului *Hypericum*. În *H. perforatum* L. se conțin 1,3,6,7-tetrahidroxixantona și kielcorina C la o concentrație de aproximativ 0,01% [5]. Xantonele găsite în părțile aeriene de *H. perforatum* L. de asemenea au demonstrat acțiune antidepresivă. Analiza fitochimică efectuată pe produsele vegetale de *H. perforatum* colectate din flora spontană a demonstrat că rădăcinile sunt principalele organe de acumulare a xantonelor. Contribuția xantonelor la activitățile farmacologice ale *H. perforatum* L. nu a fost luată în considerare din cauza faptului că această clasă de compuși se regăsește sub formă de urme în *Hyperici herba*. Dar totuși, acumularea xantonelor în rădăcinile de *H. perforatum* a fost corelată cu activitatea antifungică împotriva agenților patogeni vegetali și umani [16].

CONCLUZII

În ultimii ani, numeroase studii *in vitro* și *in vivo* au demonstrat eficacitatea produselor extricate de *H. perforatum* L. în tratamentul depresiei, infecțiilor bacteriene și virale, tulburărilor neurologice etc. Aceste rezultate terapeutice se datorează efectelor farmacologice ale acestei plante: antiseptice, antispastice, tonice, antioxidante, antidepresive și anestezice. În ciuda zecilor de studii clinice efectuate asupra proprietăților medicinale ale sunătoarei, totuși rămân întrebări în ceea ce privește valoarea terapeutică, mecanismele de acțiune și reacțiile adverse.

BIBLIOGRAFIE

1. Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Дубищев А.В., Кадацкая Д.В., Запесочная Г.Г., Жданов И.П. Исследование сырья и препаратов зверобоя. В: Фармация. 2005, Т. 53, № 3, с. 23-25. ISSN 0367-3014.
2. Зайцева Е.Н, Куркин В.А., Дубищев А.В., Правдивцева О.Е., Зими́на Л. Н. Препараты на основе травы зверобоя как средства коррекции экскреторной функции почек. В: Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2011, Том 13, №1(8), с. 1999-2002. ISSN 1990-5378.
3. Куркин В.А., Дубищев А.В., Правдивцева О.Е., Зими́на Л.Н. Изучение нейротропной активности новых лекарственных препаратов из травы зверобоя. В: Медицинский альманах. 2009, № 4 (9) ноябрь, с. 33-36. ISSN 2499-9954 (online).
4. Куркин В.А, Правдивцева О.Е., Зими́на Л.Н. Антидепрессантная активность препаратов травы зверобоя. В: Фармация. 2010, № 5, с. 40-41. ISSN 0367-3014.
5. Patočka J. The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. In: Journal of Applied Biomedicine. 2003, 1, p. 61-70. ISSN 1214-0287.
6. Saddiqe Z., Naeem I., Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. In: Journal of Ethnopharmacology. 2010, 131, p. 511-521. Doi:10.1016/j.jep.2010.07.034.
7. Butterweck V., Wall A., Liefänder-Wulf U., Winterhoff H., Nahrstedt A. Effect of the total extract and fraction of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. In: Pharmacopsychiatry. 1997, 30, 117-124. Doi: 10.1055/s-2007-979531.
8. Silva B., Olivera P. J., Dias A., Malva J. O. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. In: Neurotoxicity Research. 2008, 13 (3, 4), p. 265-279. ISSN 1476-3524 (Online). DOI: 10.1007/BF03033510
9. Feyzioğlu B., Demircili M. E., Özdemir M., Doğan M., Baykan M. Antibacterial effect of hypericin. In: African Journal of Microbiology Research. 2013, 7(11), p. 979-982. ISSN 1996-0808.
10. Franchi G.G., Nencini C., Collavoli E., Massarelli P. Composition and antioxidant activity in vitro of different St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts. In: Journal of Medicinal Plants Research. 2011, 5(17), p. 4349-4353. ISSN 1996-0875.
11. Greeson J. M., Sanford B., Monti D. A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. In: Psychopharmacology. 2001, 153, p. 402-41. ISSN 1432-2072.
12. Karioti A., Bilia A. R.. Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. In: International Journal of Molecular Sciences. 2010, 11, p. 562-594.
13. Süntar I., Oyardi O., Akkol E. K., Özçelik B. Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. In: Pharmaceutical Biology. 2016 Vol. 54, No. 6, p. 1065-1070. 1744-5116 (online).
14. Çelen G., Özkan S., Ayhan F. The phenolic compounds from *Hypericum perforatum* and their antimicrobial activities. In: Hacettepe Journal of Biology and Chemistry. 2008, 36 (4), p. 339-345. ISSN 2687-475X.
15. Crockett S. L. Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). In: Natural Product Communications. 2010, Vol. 5 (9), p. 1493- 506. ISSN 1555-9475 (online).
16. Oshingboye. A.D., Ogundipe O.T. Phenolic profile and biological activity of *Hypericum perforatum* L.: Can roots be considered as a new source of natural compounds? In: South African Journal of Botany, 2018, 117, p. 288-30. ISSN: 02546299.

CZU: 582.998.4:581.19:547.562

DYNAMICS OF THE ACCUMULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN TARAXACUM OFFICINALE ROOTS, LEAVES AND FLOWERS

DINAMICA ACUMULĂRII COMPUȘILOR FENOLICI ÎN RĂDĂCINI, FRUNZE ȘI FLORI DE PĂPĂDIE

Viktoryia Tsiarletskaia, Raman Lukashou

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Rezumat. A fost cercetată dependența conținutului de compuși fenolici din rădăcini, flori și frunze de *Taraxacum officinale* de perioada de colectare a materiei prime. Cel mai mare conținut de compuși fenolici a fost înregistrat în toate organele de *T. officinale* în fazele de început și de înflorire în masă (sfârșitul lunii aprilie – începutul lunii iunie). Această perioadă este recomandată pentru colectarea întregii plante. Acest lucru va face posibilă obținerea materiilor prime cu un conținut ridicat de compuși fenolici și va asigura prelucrarea fără deșeuri a materiilor prime.

Cuvinte cheie: *Taraxacum officinale*, compuși fenolici, dinamica acumulării.

Abstract. The dependence of the content of phenolic compounds in the roots, flowers and leaves of *Taraxacum officinale* on the period of raw material procurement has been investigated. The highest content of phenolic compounds was recorded in all organs of *T. officinale* in the phases of the beginning and mass flowering (late April – early June). This period is recommended for harvesting the entire plant. This will make it possible to obtain raw materials with a high content of phenolic compounds and ensure waste-free processing of raw materials.

Keywords: *Taraxacum officinale*, phenolic compounds, accumulation dynamics.

INTRODUCTION

The phenolic compounds of the *Taraxacum officinale* include flavonoids (quercetin, isorhamnetin, luteolin and their glycosides), phenolic acids (chlorogenic, caffeic, chicory, gallic acids), leucoanthocyanidins, catechins [1], coumarins (esculetin, cichoriin) [2].

This group of substances exhibits a variety of biological activities. Extracts from Common dandelion flowers, containing luteolin and cynaroside, absorb DPPH radicals and protect DNA from damage by hydroxyl radicals [3]. Extracts of the aerial part of plant with a high content of phenolic compounds exhibit anticoagulant activity and inhibit lipid peroxidation in platelets [4]. Dandelion polyphenols protect against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [5]. In studies on rats, extracts enriched with phenolic acids have been shown to reduce triglyceride and total cholesterol levels in the blood [6]. The hypoglycemic effect of *T. officinale* is associated with chlorogenic acid [3]. In vitro experiments established the effectiveness of phenolic compounds of dandelion against Herpes simplex virus 1 [2]. The inhibition of the growth of *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* in vitro is associated with the presence of phenolic compounds in the extracts [7].

It is known that the content of phenolic compounds in *T. officinale* depends on the place and year of harvesting [7]; however, there is no information on the dynamics of their accumulation in various plant organs during the growing season. This does not allow us to determine the optimal harvesting time for obtaining raw materials with a high content of biologically active substances.

MATERIALS AND METHODS

The roots, leaves, flowers of *T. officinale* were harvested from mid-April till mid-October every two weeks (except for flowers) and then subjected to air-shadow drying.

A sample of crushed raw materials weighing 0.200 g was extracted with ethyl alcohol with a concentration of 70% by volume for 120 minutes in a water bath at a temperature of 60°C and a ratio of raw materials and extracts of 1 to 50.

The content of phenolic compounds was determined by spectrophotometry. To 0.1 ml of the extract was added 0.15 ml of the Folin-Chocalteu reagent and 4.75 ml of 10% sodium carbonate solution, brought to 10.0 ml with purified water. After 30 minutes, the optical density of the solution was measured on a Solar spectrophotometer at a wavelength of 760 nm. A solution of 0.15 ml of Folin-Chocalteu's reagent, 4.85 ml of sodium carbonate, made up to 10.0 ml with purified water, was used as a compensation solution.

The recalculation was carried out by the method of the calibration graph for chlorogenic acid, which is the dominant phenolic compound of *T. officinale* [1].

RESULTS AND DISCUSSIONS

The content of phenolic compounds in the roots, leaves and flowers of *T. officinale* depends on the growing season.

The dynamics of the accumulation of phenolic compounds in the roots has a wave-like character (Figure 1).

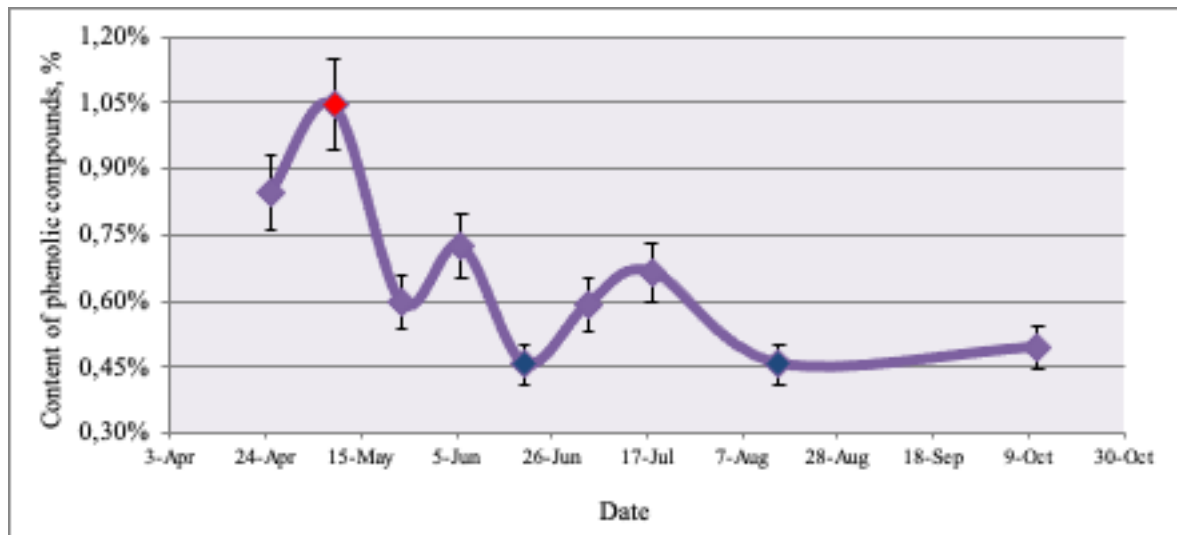


Figure 1. Dynamics of accumulation of phenolic compounds in roots

The highest value was recorded on May 9 – 1.05% (mass flowering), the minimum values – in June 20 and August 15 – 0.46%. Harvesting during the withering away of the aboveground part in October, as is traditionally accepted, leads to a decrease in the content of phenolic compounds by 2.3 times on comparable with mass flowering (Table 1). After the main maximum during flowering, the content of phenolic compounds fluctuates slightly (from 0.46 to 0.73).

Table 1. The middle content of phenolic compounds in the roots

Date	25-Apr	09-May	24-May	06-June	20-June	04-Jule	18-Jule	15-August	11-October
Content, %	0.84	1.05	0.60	0.73	0.46	0.59	0.67	0.46	0.49

The variability of the content of phenolic compounds in the leaves, as in the roots, has a wavy appearance with a decrease towards the end of the growing season (Figure 2). The maximum at the beginning of plant development is due to the fact that phenolic compounds are synthesized in the aerial part, which is actively developing during this period. The content of phenolic compounds in the leaves remained at a high level (more than 5%) throughout the spring and the first half of summer.

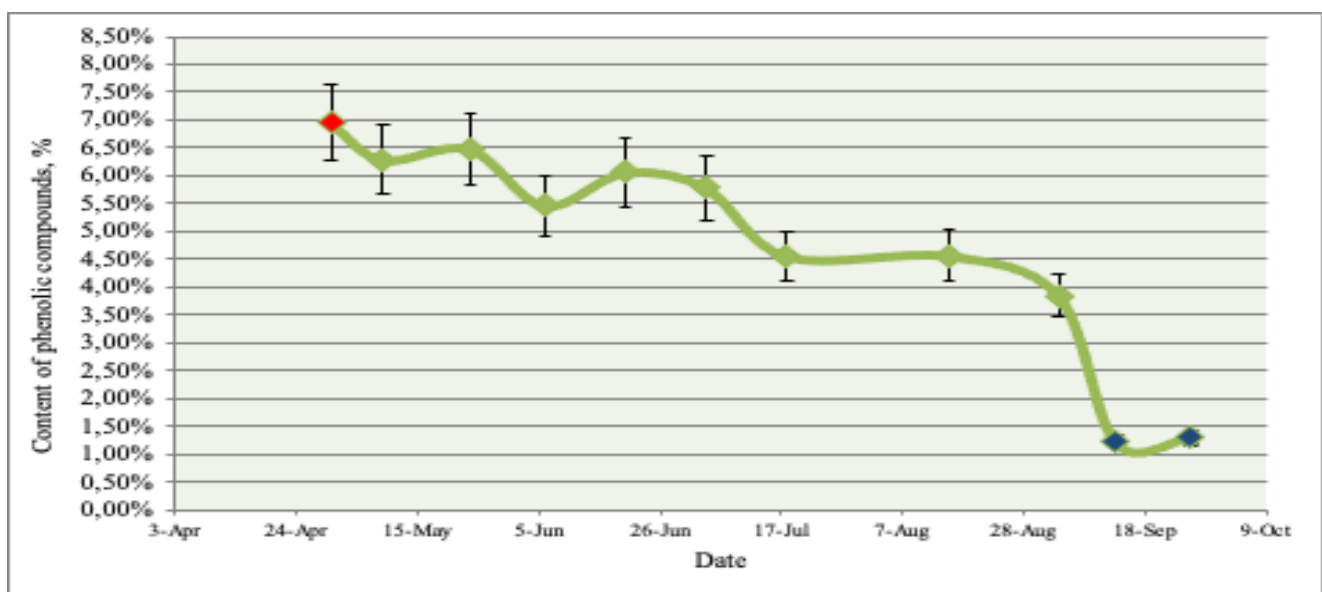


Figure 2. Dynamics of accumulation of phenolic compounds in leaves

The highest content of phenolic compounds was noted in the budding phase (April 30 – 6,95%), the minimum – in the dying off of the aboveground part (September 13 – 1.21%, September 26 – 1.30%). By the end of the growing season, the content of phenolic compounds in dandelion leaves decreased 5.5 times. If dandelion leaves are har-

vested before flowering, rather than traditionally during or after flowering, the content of phenolic compounds will increase by 1.3 times (Table 2). In the course of plant development, a gradual decrease in the content of phenolic compounds in the leaves is observed with the formation of a plateau.

Table 2. The middlecontent of phenolic compounds in the leaves

Date	30-April	9-May	24-May	6-June	20-June	4-Jule	18-Jule	15-August	3-September	13-September	26-Septemder
Content, %	6.95	6.29	6.49	5.46	6.06	5.78	4.55	4.56	3.85	1.21	1.30

Dandelion flowers were harvested in April and May. The content of phenolic compounds gradually increased from the budding phase to the mass flowering phase, after which it began to decrease (Figure 3).

The maximum value was noted in early May (4.65% on May 9), the minimum – in mid-April (23% on April 23). By the period of mass flowering, the content of phenolic compounds in flowers increased by 1.25 times (Table 3).

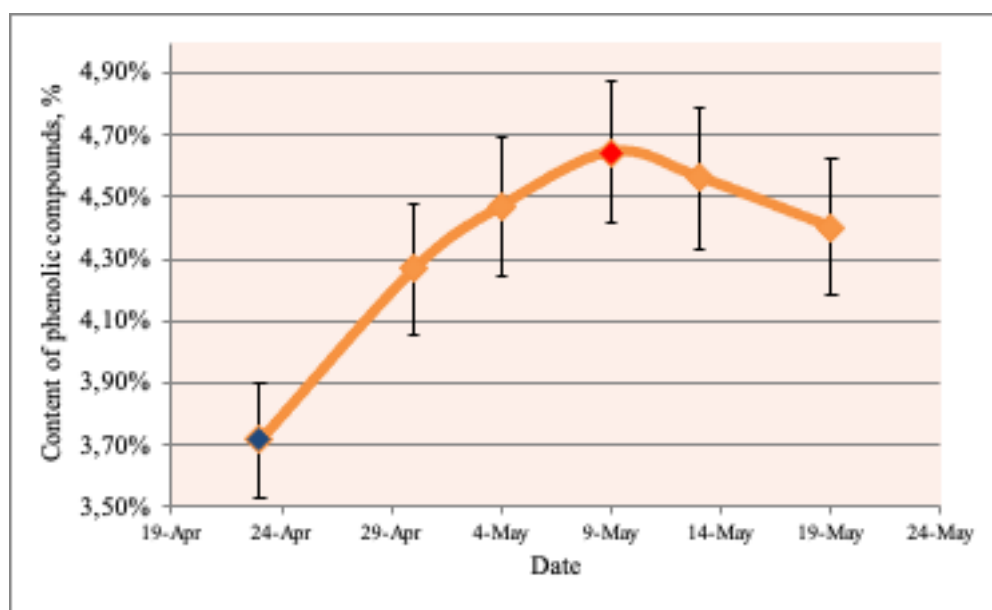


Figura 3. Dynamics of accumulation of phenolic compounds in flowers

Table 3. The middlecontent of phenolic compounds in flowers

Date	23-April	30-April	4-May	9-May	13-May	19-May
Content, %	3.72	4.27	4.47	4.65	4.56	4.40

The highest content of phenolic compounds is shown by dandelion leaves at the budding phase– 6.95%, which is 1.6 times more than the maximum content in flowers and 6.9 times more than the maximum content in the roots.

Redistribution of phenolic compounds between underground and aboveground parts is observed during the harvesting period. The maxima of the content of phenolic compounds in the aboveground part of the dandelion coincide with the minima in the underground part and vice versa. Thus, an increase in the content of phenolic compounds in the leaves on May 24, June 20, and August 15 was accompanied by its decrease in the roots. An increase in the content in the roots on May 9, June 6, and July 18 occurred simultaneously with a decrease in the concentration of phenolic compounds in the leaves (Figure 4). The maximum content in flowers falls on the minimum in the leaves.

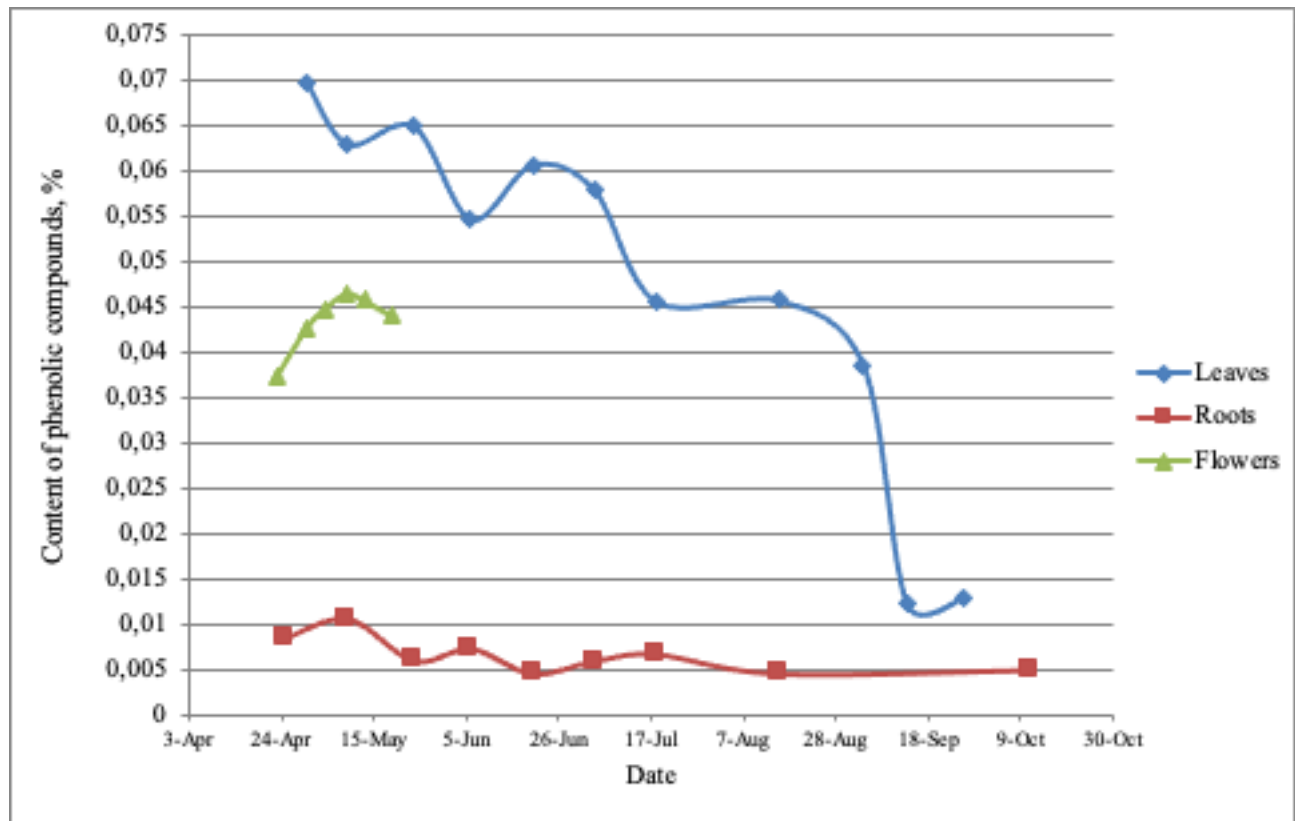


Figure 4. Comondynamics of accumulation of phenolic compounds in roots, flowers and leaves

In general, the roots, leaves and flowers of *T. officinale* contain the most phenolic compounds during the mass flowering (9 May), the budding phase (30 April) and mass flowering (9 May).

CONCLUSIONS

The highest content of phenolic compounds was shown by roots (1.05%) and flowers (4.65%) harvested in early May (mass flowering); leaves (6.95%), harvested at the end of April (the budding phase). By the end of the growing season, the content of phenolic compounds in the leaves decreased 5.5 times, in the roots - 2.3 times. The richest source of phenolic compounds are leaves: the content is 1.6 times higher than in flowers and 6.9 times higher than in roots. Thus, the period with the highest phenolic content in dandelion differs significantly from the traditional harvesting period. Concerning, it is necessary to revise its harvesting time.

REFERENCES

1. Lukashou, R. Dandelion. Part 1. The Component Composition / R. Lukashou, N. Gurina // Recipe. - 2019. - № 1. - P. 71-80.
2. González-Castejón, M. Diverse biological activities of dandelion / M. González-Castejón, F. Visioli, A. Rodriguez-Casado // Nutrition Reviews. - 2012. - № 70 (9). - P. 534-547. Doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00509.x
3. Lukashou, R. Dandelion. Part 2. Pharmacological Properties / R. Lukashou, N. Gurina // Recipe. - 2019. - № 2. - P. 260-265.
4. Assessment of effects of phenolic fractions from leaves and petals of dandelion in selected components of hemostasis / B. Lis, D. Jędrejek, A. Stochmal et al. // Food Research International. - 2018. - № 107. - P. 605-612. Doi:10.1016/j.foodres.2018.03.012
5. Dandelion polyphenols protect against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice via activation of the Nrf-2/HO-1 pathway and inhibition of the JNK signaling pathway / R. Yong-Shen, Z. Yao, D. Huan et al. // Chinese Journal of Natural Medicines. - 2020. - № 18 (2). - P. 103-113. Doi: 10.1016/S1875-5364(20)30011-X
6. Phenolic Fractions from Dandelion Leaves and Petals as Modulators of the Antioxidant Status and Lipid Profile in an In Vivo Study / M. Majewski, B. Lis, J. Juśkiewicz et al. // Antioxidants. - 2020. - № 9. - P. 1-13. Doi:10.3390/antiox9020131
7. Isolation and Identification of Compounds from Bioactive Extracts of *Taraxacum officinale* Weber ex F. H. Wigg. (Dandelion) as a Potential Source of Antibacterial Agents / K. Díaz, L. Espinoza, A. Madrid et al. // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. - 2018. - P. 1-8. Doi: 10.1155/2018/2706417

CZU: 615.322:582.998

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PURPLE CONEFLOWER HERB EXTRACTS, DEPENDING ON THE COMPOSITION OF THE EXTRAGENT

ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A EXTRACTELOR DIN PĂRȚI AERIENE DE ECHINACEA PURPURIE, ÎN FUNCȚIE DE COMPOZIȚIA EXTRAGENTULUI

Dzianis Novash, Raman Lukashou

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Rezumat. S-a cercetat dependența efectului antioxidant față de concentrația acizilor hidroxicinamici din extractele din părți aeriene de Echinacea purpurea, obținute la utilizarea extragenților de diferită compoziție. Extractele obținute pe bază de propan-2-ol 20%, etanol 20%, metanol 40%, acetonă 40%, propilenglicol 40% și dimetilsilfoxid 40% în calitate de extragenți, au prezentat o activitate antioxidantă ridicată în combinație cu un conținut ridicat de acizi hidroxicinamici. Acești solvenți pot fi folosiți la elaborarea formelor farmaceutice.

Cuvinte cheie: Echinacea purpurea, activitate antioxidantă, acizilor hidroxicinamici.

Abstract. The dependence of the antioxidant effect on the concentration of hydroxycinnamic acids in extracts from Echinacea purpurea herb obtained with the use of extractants of different composition was investigated. Extracts obtained using 20% propan-2-ol, 20% ethanol, 40% methanol, 40% acetone, 40% propylene glycol and 40% dimethyl sulfoxide as an extractant have high antioxidant activity in combination with a high content of hydroxycinnamic acids. These solvents can be offered for preparing dosage forms.

Keywords: Echinacea purpurea, antioxidant activity, hydroxycinnamic acids.

INTRODUCTION

Echinacea purpurea herb is characterized by the presence in its composition of caffeic, caftaric, chicory, chlorogenic, ferulic, para-hydroxycumaric and other acids belonging to the hydroxycinnamic group [1,2].

This group of substances has a wide spectrum of pharmacological action. There are studies carried out *in vitro*, illustrating antiviral, immunomodulatory [1], anti-inflammatory [3] antitumor [4] and well-expressed antioxidant [1] activity of the hydroxycinnamic acid group in extracts and juices from Echinacea purpurea herb. The spectrum of activity of Echinacea purpurea herb is even wider due to other groups of biologically active substances (polysaccharides, alkylamides, etc.), which determines the widespread use of this type of plant raw material for the production of medicines and biologically active food additives [5].

Now, due to the coronavirus pandemic, interest in this plant has increased, because there are data linking the biologically active substances, namely chlorogenic and caffeic acids, which belong to the group of hydroxycinnamic acids (HCA), with the ability to inhibit the angiotensin-converting enzyme, thereby preventing excessive inflammation, especially in the kidneys and the cardiovascular system, which occurs as a result of binding surface spike S of SARS-CoV-2 virus with angiotensin-converting enzyme 2 [6].

For the most complete processing of the medicinal plant raw materials of Echinacea and maximizing the efficiency of its use in medicine, organic solvents of various nature and their aqueous solutions are used, which provide the most complete extraction of hydroxycinnamic acids from medicinal plant materials. For the production of drugs based on Echinacea, only ethanol and its aqueous

solutions are used, although a number of literature sources use methanol, ethyl acetate, acetone and other solvents to obtain dry extracts. Therefore, it is advisable to expand the list of studied extractants: volatile – for obtaining dry extracts, viscous and / or non-volatile – for the development of medicines for local and external use.

Since hydroxycinnamic acids are powerful antioxidants capable of breaking free radical oxidation chain reactions by trapping radicals [7], it is rational to research the antioxidant activity (AOA) of the obtained extracts in the study of extraction and compare them with each other and with the standards of caffeic and ascorbic acids.

MATERIALS AND METHODS

The object of our research was Echinacea purpurea herb produced by «Biotest» - pharmaceutical company of Belarus (series 020718).

The following solvents were selected for the work: methanol, ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol, ethylene glycol, propylene glycol, glycerin, dimethyl sulfoxide (DMSO), acetonitrile, acetone and their aqueous solutions with a volume fraction of the organic component 20%, 40%, 60%, 80%, and 100%, water, and standards of caffeic and ascorbic acids.

The analysis was carried out on a Solar PB2201 series spectrophotometer using the built-in computer program for constructing and analyzing absorption spectra.

For extraction, the plant raw material weighing 0.100 ± 0.005 g (accurately weighed) and 5.00 ± 0.01 ml of the given composition solvent was taken. The extraction process was carried out in a water bath at a temperature of 60 °C for 1.5 hours. The resulting extract was filtered through cotton wool.

To determine the antioxidant activity, we used a spec-

trophotometric method with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), which is reduced upon contact with an antioxidant, as a result of which the color intensity decreases [8]. The test solution is prepared by adding to 0.600 ± 0.001 ml of the obtained extract 4.20 ± 0.01 ml of 0.01% DPPH solution in methanol. The reaction time is 30 minutes. Methanol is used as a reference solution. Also, for this technique, it is necessary to measure the optical density (A_0) of a solution without antioxidants, prepared by adding 0.600 ± 0.001 ml of methanol to 4.20 ± 0.01 ml of 0.01% DPPH solution.

Measurement of optical density is carried out at a wavelength of 517 nm.

Antioxidant activity of extracts (AOA) in percent is calculated by the formula:

$$AOA = (A_0 - A_1) * 100 / A_0;$$

when A_0 – optical density of DPPH solution without antioxidants;

A_1 – optical density of the test solution.

Data on the efficiency of extraction with aqueous-organic solvents of hydroxycinnamic acids were taken from early publications. [9,10].

The results were processed using the Microsoft Office Excel 2015 computer program, the Data Analysis package. The results are presented as mean values \pm half-width of the confidence interval ($p \leq 0,05$).

RESULTS AND DISCUSSIONS

In Figure 1 shows the results of measuring the antioxidant activity in the obtained aqueous-organic extracts.

The table 1 below shows the numerical data obtained from the experiment.

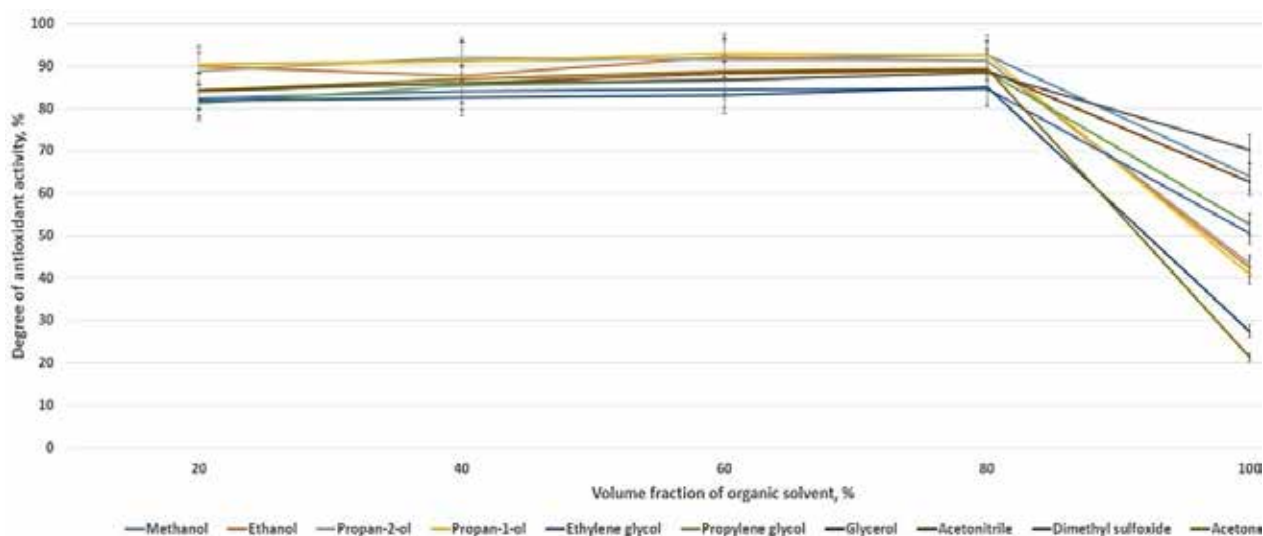


Figura 1. The graph of the dependence of the degree of AOA (%) on the nature and volume fraction of solvents (%)

Table 1. AOA of aqueous-organic extracts

Volume fraction	Methanol	Ethanol	Propan-2-ol	Propan-1-ol	Propyleneglycol
20%	90,39%	89,92%	88,78%	90,36%	81,34%
40%	91,29%	87,75%	92,10±1,66%	91,20%	85,51%
60%	91,84%	92,21±1,06%	91,57%	93,02±0,94%	86,67%
80%	92,67±1,96%	91,37%	91,40%	92,66%	88,63±0,27%
100%	64,06%	42,47%	43,30%	40,84%	52,69%
Volume fraction	Ethylenglycol	Glycerol	Acetonitrile	DMSO	Acetone
20%	82,35%	81,81%	84,03%	84,25%	84,23%
40%	84,05%	82,51%	86,05%	85,93%	86,96%
60%	84,58%	83,22%	88,21%	86,79%	88,78%
80%	84,72±0,44%	85,06±1,73%	89,13±1,23%	88,47±0,02%	89,49±0,46%
100%	50,65%	27,51%	62,73%	70,29%	21,32%

From the above data, it follows that water-organic extracts have a high antiradical activity (the degree of antioxidant activity ranges from 81.34% to 93.02%). When using pure organic solvents as an extracting agent, the degree of antioxidant activity decreases by 1.26-4.20 times. Such a sharp decline in activity can be associated with a decrease in the extracting capacity of absolute organic solvents in relation to hydroxycinnamic acids. Below is a graph illustrating the extraction capacity of solvents for hydroxycinnamic acids (the data for the construction were taken from our two earlier publications [9,10]). Despite the poor extracting ability of absolute organic extractants, the antioxidant activity still remains relatively high (probably due to the antioxidant action of other classes of phenolic compounds that fall into the extraction due to the low selectivity of the extraction process). From the above results, it follows that the antioxidant activity of water-organic extracts does not statistically differ from each other, in contrast to the antiradical properties of organic extracts. They differ significantly, and

these differences are statistically significant. This allowed us to obtain a number of absolute solvents in order of increasing AOA degree: acetone = glycerin <propan-1-ol = propan-2-ol = ethanol <ethylene glycol = propylene glycol <methanol = acetonitrile <DMSO.

Since the antioxidant activity of aqueous-organic extracts is at the same level, for further research we selected extractants that have the best extraction ability in relation to HCA: DMSO (40%), acetone (40%), methanol 40%, ethanol 20%, propane -2-ol 20%, propylene glycol 40%. For these extractants, we studied the dependence of the antioxidant effect on the dose in order to obtain and compare the EC_{50} (the concentration that creates 50% of the maximum antioxidant effect) with each other and with solutions of antioxidant standards (ascorbic and caffeic acids). The lower the EC_{50} , the more pronounced antiradical properties the antioxidant has. Standardization of extracts for the group of hydroxycinnamic acids (in terms of caffeic acid in $\mu\text{mol} / \text{L}$) was performed and published earlier [9,10] (Figure 2).

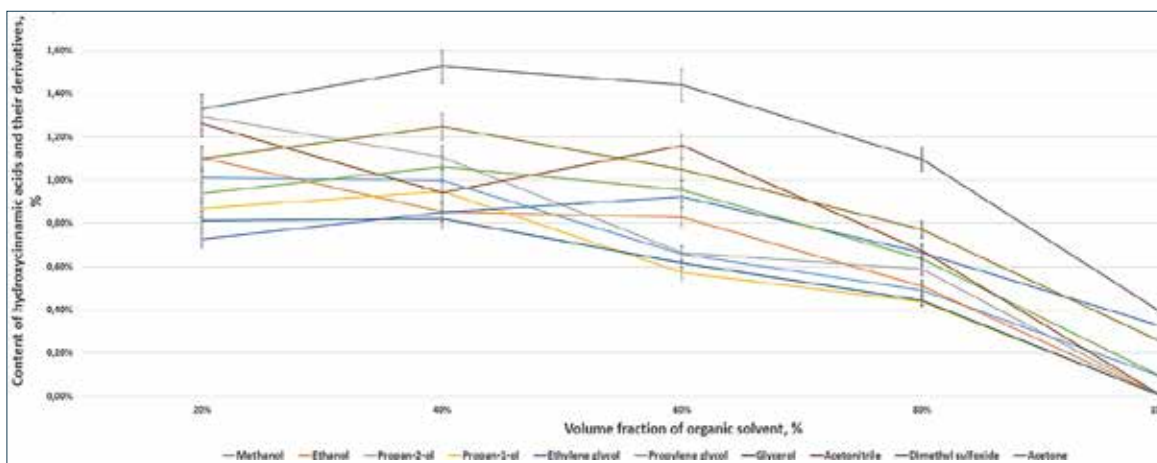
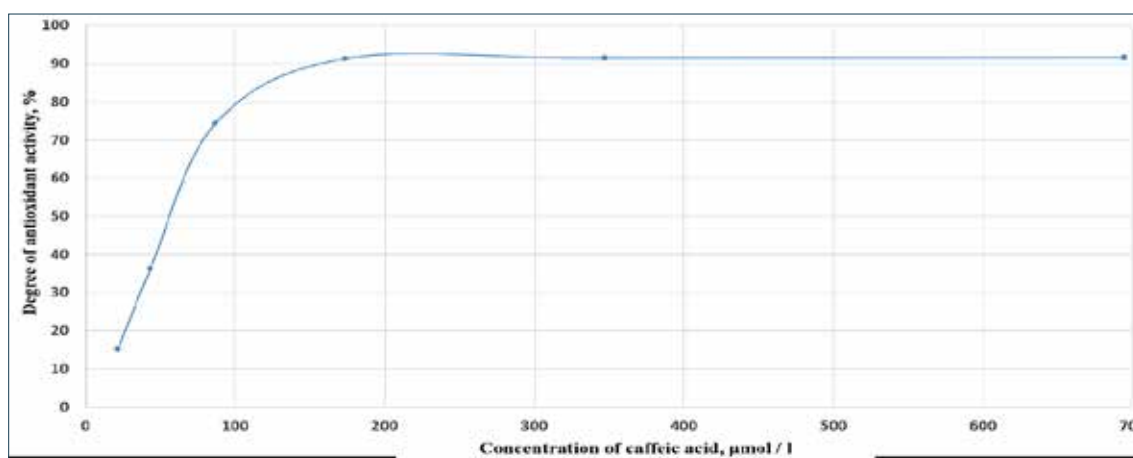


Figure 2. Graph of dependence of HCA content (%) on the nature and volume fraction of the organic component of the extracting agent (%)



Figures 3 and 4 show graphs of the dependence of the antioxidant effect on the concentration of caffeic acid.

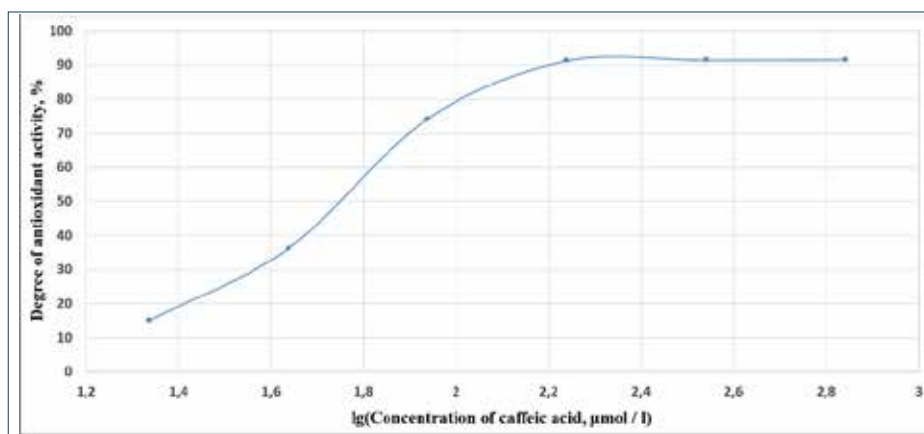


Figure 3. Graph of the dependence of the antioxidant effect on the concentration of caffeic acid (hyperbolic dependence)

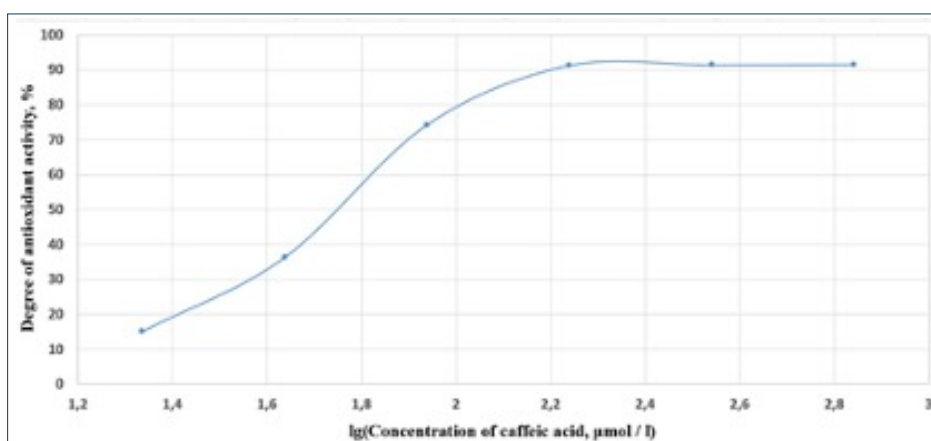


Figure 4. Graph of the dependence of the antioxidant effect on the concentration of caffeic acid (S-shaped dependence)

In standard coordinates, the dependence is hyperbolic; at high values of the concentration of caffeic acid, the antioxidant effect reaches a plateau, taking on a maximum value. In semi-logarithmic coordinates, we observe an S-shaped relationship through which we find the concentration of antioxidant that creates 50% of the maximum effect. Similar calculations were carried out for solutions of the ascorbic acid standard and extracts obtained using the extractants selected by us (tables 3 and 4).

Table 2. Concentrations of standard solutions creating 50% of the maximum antioxidant effect

Antioxidant Standards Solutions	EC ₅₀ , μmol / l
Ascorbic acid	20,23
Caffeic acid	51,52

Table 3. Concentrations of extracts producing 50% of maximum antioxidant effect

Extractant	EC ₅₀ (in terms of caffeic acid in μmol / l)
Methanol (40%)	17,29
Ethanol (20%)	18,95
Propan-2-ol (20%)	20,95
Propyleneglycol(40%)	19,23
DMSO (40%)	26,86
Acetone (40%)	27,76

From the data given in Tables 2, 3 and the results of checking the statistical significance of differences in antioxidant activity using a two-sample t-test with different dispersions, we see that ascorbic acid has 2.55 times stronger antioxidant effect compared to caffeic acid, but

the same as the obtained by us aqueous-alcoholic extracts. Extracts, for which 40% DMSO and 40% acetone were used, have a slightly less strong antioxidant effect compared to ascorbic acid (EC_{50} is significantly higher in extracts), but stronger than caffeic acid. They do not differ from each other.

Thus, we obtained a series of antioxidant activity of the extraction in comparison with the antioxidant standards: ascorbic acid = methanol (40%) = ethanol (20%) = propan-2-ol (20%) = propylene glycol (40%) > DMSO (40%) = acetone (40%) >> caffeic acid.

The stronger antioxidant activity of the extracts in comparison with caffeic acid can be explained by the nonselectivity of the extraction, as a result of which other classes of compounds (for example, other phenolic compounds), also possessing AOA, got into the extract.

Thus, taking into account the high antioxidant activity of the extracts and the good extracting ability (the HAC content is more than 1%), we can offer 20% propan-2-ol, 20% ethanol, 40% methanol and 40% acetone, 40% propylene glycol and 40% DMSO for obtaining dosage forms. In this case, the choice of a solvent will depend on the resulting dosage form. For example, for the manufacture of tablets, volatile extractants (propan-2-ol, ethanol, methanol, acetone) are suitable, since a dry extract is needed as the main component. Viscous propylene glycol or low volatility DMSO can be used for the outer molds. The choice of solvent will also depend on the penetration of HCA through biological barriers. Therefore, further research will focus not only on increasing the level of extraction, including through pretreatment of medicinal plant raw materials, but also on the study of the penetration of HCA.

CONCLUSIONS

The antioxidant activity of water-organic extracts of *Echinacea purpurea* herb ranges from 81.34% to 93.02%, and when using absolute organic extractants, the antioxidant activity decreases by 1.26–4.20 times. The antioxidant properties of 100% organic extracts differ significantly in contrast to hydroalcoholic ones. We have obtained a number of absolute solvents in order of increasing AOA degree: acetone = glycerol < propan-1-ol = propan-2-ol = ethanol < ethylene glycol = propylene glycol < methanol = acetonitrile < DMSO.

Based on the calculation of EC_{50} (concentration creating 50% of the maximum antioxidant effect), a number of antioxidant activities of the extracts we selected were obtained: ascorbic acid = methanol (40%) = ethanol (20%) = propan-2-ol (20%) = propylene glycol (40%) > DMSO (40%) = acetone (40%) >> caffeic acid. That is, the antioxidant properties of the extracts are on a par with the classic antioxidant (ascorbic acid).

REFERENCES

1. Assessment report on *Echinacea purpurea* (L.) Moench., herbaceus / European medicines agency. – 2014. – P. 1–73.
2. Lukashou, R. Comparative phytochemical analysis of flowers of *Rudbeckia hirta* L. and *Echinacea purpurea* L. / R. Lukashou, D. Moiseev // Collection of scientific works of students of the Republic of Belarus "NIRS 2011". – Minsk, 2012. – P. 344–348.
3. Effects of cichoric acid extract from *Echinacea purpurea* on collagen-induced arthritis in rats / L. Jiang [et al.] // *Am. J. Chin. Med.* – 2014. – № 42(3). – P. 679–692. Doi: 10.1142/S0192415X1450044X.
4. Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis / Y.-L. Tsai [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2012. – № 143. – P. 914–919. Doi:10.1016/j.jep.2012.08.032
5. Lukashou, R. Review of the market of phytopreparations based on plants of the genus *Echinacea* in the Republic of Belarus / R. Lukashou, O. Veremchuk, A. Moiseeva // *Pharmacy Bulletin*. – 2015. – № 3 (69). – P. 31–39.
6. Anti-COVID-19 drug candidates: A review on potential biological activities of natural products in the management of new coronavirus infection / A. Prasansuklab [et al.] // *J. Tradit. Complement. Med.* – 2020. – № 11(2). – P. 144–157. Doi: 10.1016/j.jtcm.2020.12.001
7. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview / J. Teixeira [et al.] // *BioMed. Research International*. – 2013. – Article ID 251754. Doi: 10.1155/2013/251754
8. The physical and chemical methods for testing antioxidative activity of herbal raw material and its conversion products / S.P. Zavadskiy [et al.] // *Drug development & registration*. – 2017. – Vol. 2. – P. 214–221.
9. Novash D. S. Influence of nature and volume fraction of alcohols on the content of hydroxycinnamic acids in extracts from the herb *Echinacea purpurea* [Electronic resource] / D. S. Novash, R. I. Lukashou // *Innovations in medicine and pharmacy – 2020: materials distance scientific-practical conf. students and young scientists, Minsk, 12 October. 2020* / ed. S. P. Rubnikovich, V. Ya. Khryshchanovich. – Minsk, 2020. – P. 801–804.
10. Novash, D.S. Influence of the nature and composition of the solvent on the efficiency of extraction of hydroxycinnamic acids and their derivatives from the herb *Echinacea purpurea* / D. Novash // *Modern advances in pharmaceutical science in the creation and standardization of medicines and dietary supplements that contain components natural origin*. – 2021: Proceedings of the III International Scientific and Practical Internet Conference / D. S. Novash. – Kharkov, 2021. – P. 144–145.

CZU: 582.998.1:547.9

THE PENETRATING ABILITY OF SILYBUM MARIANUM FLAVOLIGNANS IN VITRO | CAPACITATEA PENETRANTĂ A FLAVOLIGNANILOR DIN SILYBUM MARIANUM IN VITRO

Ilya Soltan, Raman Lukashou

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Rezumat. În articol sunt prezentate rezultatele determinării capacității de penetrare a flavolignanilor din armurariu, utilizând modelele *in vitro*. Cea mai bună capacitate de penetrare a flavolignanilor este asigurată de combinația extractului uscat de armurariu cu suma saponinelor totale de lemn dulce (89,57% masă), standardului de silimarină cu aceleași saponine (85,75% masă), extractului uscat de armurariu cu lecitină de soia (84,37% masă). La utilizarea dodecilsulfatului de sodiu (SDS), are loc o diferențiere clară a curbelor de absorbție, fapt ce permite utilizarea SDS ca model pentru studierea absorbției flavolignanilor.

Cuvinte cheie: *Silybum marianum*, capacitate de penetrare, flavolignani.

Abstract. The article presents the results of determining the penetrating ability of milk thistle flavolignans using *in vitro* models. The best penetrating ability of flavolignans is provided by a combination of milk thistle dry extract with the total licorice saponins (89.57% by weight), standard of silymarin with saponins (85.75% by weight), dry extract with soy lecithin (84,37% by weight). With the use of sodium dodecyl sulfate (SDS), a clear differentiation of the absorption curves occurs, which may allow the use of SDS as a model for studying the absorption of flavolignans.

Keywords: Milk thistle, penetrating ability, flavolignans.

INTRODUCTION

Dosage forms based on milk thistle fruits are widely represented on the modern pharmaceutical market and are used for pharmacotherapy of liver diseases such as alcoholic and non-alcoholic cirrhosis, drug liver pathology (DIL), viral hepatitis. The antitoxic, antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic effects of silymarin and positive effect on the processes of cellular regeneration of hepatocytes have been well studied.

Recent studies indicate the promise of using milk thistle flavolignans in the treatment of iron overload caused by β -thalassemia major, where silymarin is used as an adjuvant to standard iron chelators [1]. Research is also underway regarding its use in the complex therapy of prostate cancer [2].

The activity of silymarin against SARS-CoV-2 infection is currently being studied. It has been proven to work on multiple targets at once in the fight against COVID-19. First, silibinin prevents the development of a cytokine storm in severe disease by directly inhibiting STAT3. Secondly, it is an inhibitor of RNA-dependent RNA polymerase, allowing effective suppression of viral replication, thereby reducing viral load [3]. Thirdly, during COVID-19 therapy, drugs can be used that negatively affect the liver, which justifies the use of silymarin as a hepatoprotector.

However, milk thistle flavolignans have low oral bioavailability (the absolute bioavailability of silibinin is about 0.95%) [4]. Therefore, this work will consider methods for increasing the bioavailability of silymarin and the nature of the penetrating ability of flavolignans through semi-permeable membranes *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

The objects of research were a dry extract based on

water-acetone extraction from crushed plant raw materials (*Silybum marianum* fructus manufactured by Biotest Ltd), «Legalon® 140» capsules, and a standard sample of silymarin for thin layer chromatography (TLC).

Dialysis membranes were used to study the penetrating ability; Phosphate buffered saline with the addition of ursodeoxycholic acid and pancreatin, pH = 7.4, solution volume 3.6 ml, was used to simulate the intestinal environment. For the model of systemic blood flow, a similar buffer was used that did not contain bile acids and enzymes, pH = 7.4, solution volume 18 ml.

Soy lecithin, sodium dodecyl sulfate (SDS), as well as the total triterpene saponins obtained by extraction with acetone and nitric acid (20:1), followed by precipitation of the total saponins with an aqueous solution of ammonia from plant raw materials (*Glycyrrhizae radices*).

The incubation was carried out at 38.0 °C for 6 hours. Sampling for spectrophotometry was carried out after 30, 60, 90, 120, 180, 270 and 360 minutes.

The content of silymarin was determined spectrophotometrically using the methodology of the State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus. The optical density was measured at a wavelength of 289 nm. The concentration (mg / ml) of silymarin was calculated using the formula obtained on the basis of the calibration graph:

$$X, \% = \frac{A * 0,3 - 0,0017}{0,7511}$$

where A is the optical density of the test solution.

The data obtained was processed in Microsoft Office Excel 2016, the Data Analysis package.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Figure 1 shows the dependence of the concentration

of penetrated flavolignans on the incubation time without the addition of surfactants. The charts have two minimums: at 60 and 120 minutes. At 90 minutes, a peak is observed, then, starting from 180 minutes, the concentration of penetrated silymarin increases, reaching its ma-

ximum at 270 minutes, after which it reaches a plateau.

Table 1 shows the percentage of penetration of silymarin in the test samples. It follows from it that the greatest penetrating ability is possessed by Legalon® 140 (69.83%).

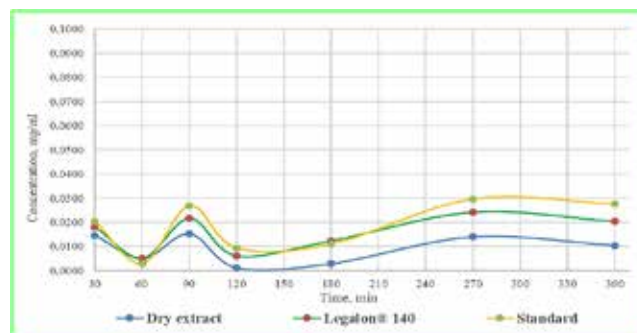


Figure 1. Graphical dependence of the concentration (mg / ml) of penetrated flavolignans from time (min)

Table 1. Mass fraction of flavolignans passed through the membrane

	Initial weight of silymarin in solution, mg	Peak mass of penetrated flavolignans, mg	Percent penetration
Dry extract	1.4523	0.2748	18.92%
Legalon® 140	0.6231	0.4351	69.83%
Standard	1.2289	0.5430	44.18%

Further, the stability of flavolignans in a buffer without the use of a membrane was investigated. Figure 2 shows the dependence of the concentration of flavolignans on the incubation time. It follows from this that the concentration of flavolignans decreases sharply at 60 minutes, then increases again at 90 minutes and gradually decreases with further incubation.

Figure 3 shows the dependence of the concentration of penetrated flavolignans on the incubation time after adding 3% (by weight) soy lecithin to the test solutions, followed by filtration. The penetration curves for the dry extract and the standard of silymarin have the minimum concentration values at the points corresponding to 30

minutes of incubation, then a peak is observed at 90 minutes, after which the concentration decreases again and gradually reaches a plateau. Schedule for Legalon® 140 has a slightly different character. It is observed at least at 30 minutes, however, in the time interval of 60-360 minutes, fluctuations in concentration indicators are insignificant.

Table 2 shows the percentage of silymarin penetration in the test samples after the addition of soy lecithin. It follows from it that the greatest penetrating ability is possessed by dry extract (84.37%).

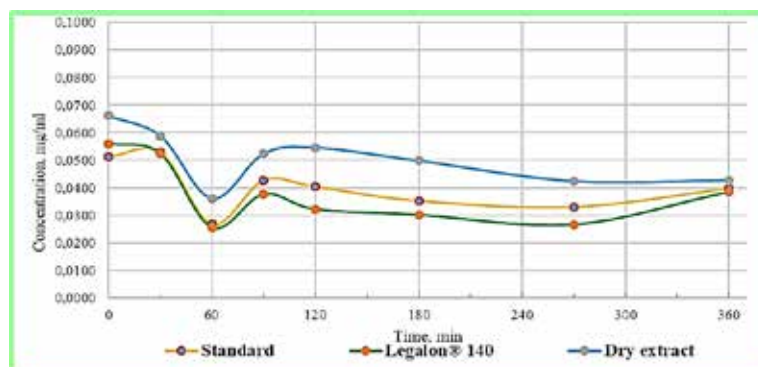


Figure 2. Dependence of the concentration (mg / ml) of flavolignans on the incubation time (min)

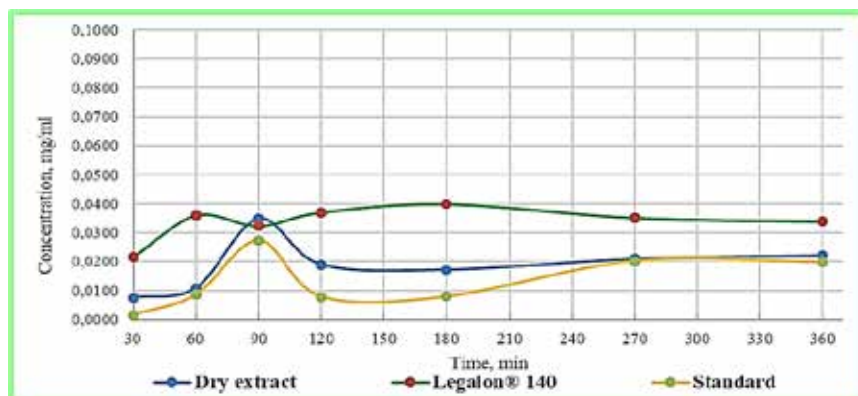


Figure 3. Graphical dependence of the concentration (mg / ml) of penetrated flavonoids on the time (min) after the addition of soy lecithin

Table 2. Mass fraction of flavonoids passed through the membrane after adding soy lecithin

	Initial weight of silymarin in solution, mg	Peak mass of penetrated flavonoids, mg	Percent penetration
Dry extract	0.7453	0.6289	84.37%
Legalon® 140	1.5602	0.7164	45.92%
Standard	0.7818	0.4905	62.74%

Figure 4 shows the dependence of the concentration of penetrated flavonoids on the incubation time after adding 3% (by weight) sodium dodecyl sulfate to the test solutions, followed by filtration. The graphs have a minimum concentration at 30 minutes, a peak is observed at 120 minutes, after which there is a slight decrease in con-

centration with a subsequent increase. No plateau at 360 minutes is observed.

Table 3 shows the percentage of penetration of silymarin in the test samples after the addition of sodium dodecyl sulfate. It follows from it that dry extract has the greatest penetrating ability (15.93%).

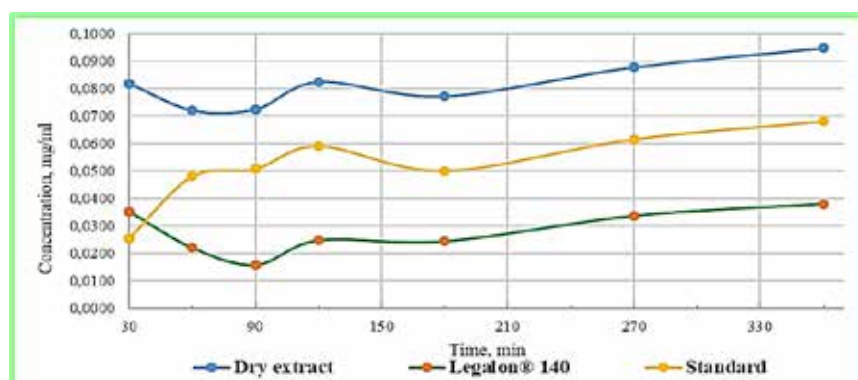


Figure 4. Graphical dependence of the concentration (mg / ml) of penetrated flavonoids versus time (min) after the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS)

Table 3. Mass fraction of flavonoids passed through the membrane after adding sodium dodecyl sulfate (SDS)

	Initial weight of silymarin in solution, mg	Peak mass of penetrated flavonoids, mg	Percent penetration
Dry extract	1.7988	0.2865	15.93%
Legalon® 140	2.9530	0.0817	2.77%
Standard	2.3448	0.1905	8.13%

Figure 5 shows the dependence of the concentration of penetrated flavolignans on the incubation time after adding 3% (by weight) of the total licorice saponins to the test solutions, followed by filtration. Penetration graphs for Legalon® 140 and standard have minimum concentration values at 60 and 120 minutes, a peak is observed at 90 minutes. Schedule for dry extract has a maximum concentration at 30 minutes, minimum - at 60. The depen-

dence after 120 minutes for three samples is similar. At first, an increase in concentration is observed up to 270 minutes, after which it decreases slightly.

Table 4 shows the percentage of silymarin penetration in the test samples after adding total of the licorice saponins. It follows from it that dry extract has the greatest penetrating ability (89.57%).

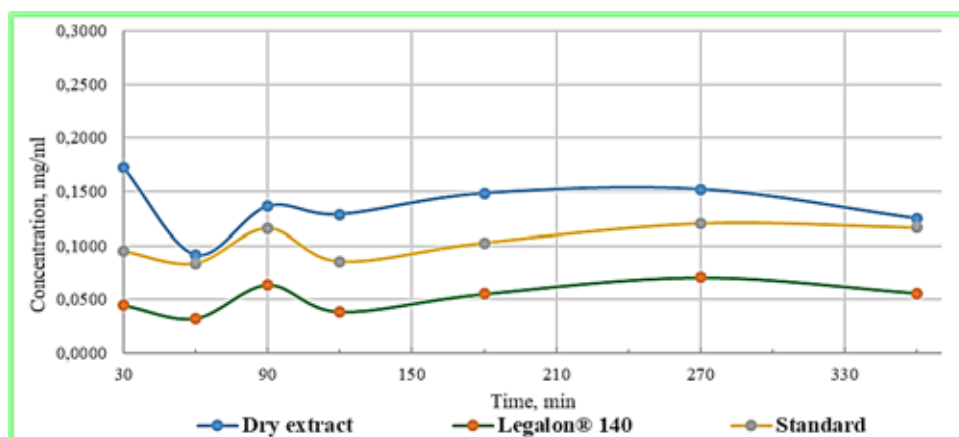


Figure 5. Graphical dependence of the concentration (mg / ml) of penetrated flavolignans on time (min) after adding the total licorice saponins

Table 4. Mass fraction of flavolignans passed through the membrane after adding the sum of licorice saponins

	Initial weight of silymarin in solution, mg	Peak mass of penetrated flavolignans, mg	Percent penetration
Dry extract	3.4687	3.1068	89.57%
Legalon® 140	1.4277	1.1879	83.20%
Standard	2.4406	2.0927	85.75%

Table 5 shows the penetration rates (in percent) of silymarin from pure samples and after the addition of various surfactants. It follows from this that the addition of soy lecithin increases the penetrating ability of flavolignans by an average of 45.20%, total licorice saponins - by

94.47% compared to the initial parameters. The addition of sodium dodecyl sulfate, on the other hand, reduces the passage of silymarin through the semipermeable membrane by 79.82% compared to the initial one.

Table 5. Percentage of penetration of flavolignans through the membrane

	Dry extract	Legalon® 140	Standard	Average
No surfactant added	18.92%	69.83%	44.18%	44.31%
With added soy lecithin	84.37%	45.92%	62.74%	64.34%
With the addition of SDS	15.93%	2.77%	8.13%	8.94%
With the addition of the total licorice saponins	89.57%	83.20%	85.75%	86.17%

CONCLUSIONS

In the course of the work, it was experimentally found that the addition of various surfactants to varying degrees affects the penetrating ability of flavolignans in vitro.

The best penetrating power is provided by a combination of dry extract with the total licorice saponins (**89.57%** by weight), standard of silymarin with saponins (**85.75%** by weight), dry extract with soy lecithin (**84.37%** by weight).

Samples with sodium dodecyl sulfate have the lowest penetration rates. Legalon® 140, standart and dry extract have penetration rates of 2.77%, 8.13% and 15.93% by weight, respectively. The addition of SDS shifts the peaks from 90 to 120 minutes, and there is also a clear differentiation of the curves, which may allow the use of sodium dodecyl sulfate as a model for studying the absorption of silymarin.

The use of combined drugs based on milk thistle with lecithin, or milk thistle with licorice saponins has two rationales. Firstly, it will help to increase the bioavailability of silymarin in the gastrointestinal tract, which is rather low due to the poor solubility of flavolignans in water. Secondly, glycyrrhizic acid in the total licorice saponins, as well as phospholipids in lecithin, are themselves used for the prevention and treatment of liver diseases, and the combination of these substances can significantly increase the therapeutic effect of drugs based on them.

REFERENCES

1. Moayedi B, Gharagozloo M, Esmaeil N, Maracy MR, Horfar H, Jalaeikar M. A randomized double-blind, placebo-controlled study of therapeutic effects of silymarin in β -thalassemia major patients receiving desferrioxamine. *Eur J Haematol.* 2013 Mar;90(3):202-9. doi: 10.1111/ejh.12061. Epub 2013 Jan 20. PMID: 23278124.
2. Vidlar A, Vostalova J, Ulrichova J, Student V, Krajicek M, Vrbkova J, Simanek V. The safety and efficacy of a silymarin and selenium combination in men after radical prostatectomy - a six month placebo-controlled double-blind clinical trial. *Biomed Pap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub.* 2010 Sep;154(3):239-44. doi: 10.5507/bp.2010.036. PMID: 21048810.
3. Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Buxó M, Brunet J, Encinar JA, Menendez JA. Silibinin and SARS-CoV-2: Dual Targeting of Host Cytokine Storm and Virus Replication Machinery for Clinical Management of COVID-19 Patients. *J Clin Med.* 2020 Jun 7;9(6):1770. doi: 10.3390/jcm9061770. PMID: 32517353; PMCID: PMC7356916.
4. Wu JW, Lin LC, Tsai TH. Drug-drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics. *J Ethnopharmacol.* 2009 Jan 21;121(2):185-93. doi: 10.1016/j.jep.2008.10.036. Epub 2008 Nov 8. PMID: 19041708.

CZU: 582.998.2:543.062

FLAVONOIDS QUANTIFICATION OF YARROW HERB | DETERMINAREA CANTITATIVĂ A FLAVONOIDELOR DIN PĂRȚI AERIENE DE COADA ȘORICELULUI

Karolina Karchevskaya, Raman Lukashou

Belarusian State Medical University, Organization of pharmacy department

Autor corespondent: karolinakarchevskaya@gmail.com

Rezumat. În acest articol sunt prezentate rezultatele elaborării tehnicii de determinare cantitativă a flavonoidelor din părți aeriene de coada șoricelului. În urma realizării studiului, s-a constatat că optimal este adăugarea la extractul cercetat a unei soluții apoase de 4% de clorură de aluminiu într-un volum de 200 μ l pentru prepararea soluției probă și a acidului acetic glacial într-un volum de 10 μ l pentru prepararea atât a soluției probă, cât și a soluției de compensare. Timpul optim de reacție între flavonoide și clorura de aluminiu este de 60 de minute.

Cuvinte cheie: flavonoide, spectrofotometrie, *Achillea millefolium*, luteolin-7-O-glucozid, determinare cantitativă.

Abstract. This article presents the results of the technique choice for the quantitative determination of herb yarrow flavonoids. As a result of the study, it was found that the optimal is the addition to investigate extract of a 4% aqueous solution of aluminum chloride in a volume of 200 μ l for the preparation of the test solution and glacial acetic acid in a volume of 10 μ l for the preparation of both the test solution and the compensation solution. The optimal reaction time between flavonoids and aluminum chloride is 60 minutes.

Keywords: flavonoids, spectrophotometry, *Achillea millefolium*, luteolin-7-O-glucoside, quantitation.

INTRODUCTION

A number of pharmacological effects of the herb yarrow are due to the presence of flavonoids, the predominant among which are the 7-O-glucosides of apigenin and luteolin [1]. However, in a number of national (Belarus, Ukraine, Kazakhstan, Great Britain) and the European Pharmacopoeias, it is proposed to standardize it only by the content of essential oil. Based on this, the data obtained can be used in the development of a technique for the quantitative determination of flavonoids in this plant raw material.

MATERIALS AND METHODS

The object of the study was a yarrow herb harvested during the period of mass flowering in places of natural growth in 2020 in the vicinity of Baranovichi. Prior to research, the plant raw materials were stored in paper bags.

For the extraction of flavonoids, we took a weighed portion of $0,05 \pm 0,003$ g of yarrow herb, preliminarily crushed and sifted through a sieve with aperture size of 180 μ m. For work, we took a fraction that passed through a sieve. For extraction, 80% methanol was used in an amount of $5,00 \pm 0,250$ ml. Extraction was carried out in a water bath for 60 min at 80 °C in tightly sealed vials with a screw cap. The above presented extraction parameters were selected experimentally in previous studies [2, 3, 4]. After extraction, the obtained extract was filtered, the resulting filtrate was used for the quantitative determination of flavonoids.

To prepare the test solution, $200 \pm 10,0$ - $1400 \pm 70,0$ ml (with a step of $200 \pm 10,0$ ml) 1-5% (with a step of 1%) aqueous aluminum chloride solution, as well as $10,0 \pm 0,500$; $25,0 \pm 1,25$; $50,0 \pm 2,50$; $75,0 \pm 3,75$ and $100 \pm 5,00$ μ l of glacial

acetic acid were added to $100 \pm 5,00$ μ l of the extract and made up to $5,00 \pm 0,250$ ml with water.

To prepare a compensation solution, $10,0 \pm 0,500$; $25,0 \pm 1,25$; $50,0 \pm 2,50$; $75,0 \pm 3,75$ and $100 \pm 5,00$ μ l of glacial acetic acid were added to $100 \pm 5,00$ μ l of the extract, after which the resulting mixture was brought to $5,00 \pm 0,250$ ml with water. After 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 min, the optical density of the test solution was measured at 400 nm against the compensation solution.

The content of the sum of flavonoids (X, %) in terms of luteolin-7-O-glucoside was calculated using the formula 1.1:

$$X, \% = \left(\frac{A \cdot 10,0174}{0,3474} \right) \times 0,5/m \quad (1)$$

where A - is the optical density of the test solution;
m - is the mass of the sample of crushed raw materials, g.

The obtained experimental data were processed using Microsoft Excel 2016.

Tables 1 and 2 show the results of selecting the optimal concentration and volume of an aqueous solution of $AlCl_3$, respectively.

Based on the data obtained in tables 1 and 2, it can be said that with an increase in the concentration of the $AlCl_3$ solution, the content of flavonoids increases and, starting from a concentration of 4%, reaches a plateau. No significant differences in the content of flavonoids when using different volumes of $AlCl_3$ are observed, which is confirmed by the value of Student's t-criterion between the content of flavonoids when adding 200 μ l of aluminum chloride solution and 1400 μ l, which is equal to $0,41 > 0,05$.

Table 1. Dependence of the content of flavonoids (%) on the concentration of the AlCl_3 solution used in the quantitative determination of flavonoids

Concentration of an aqueous solution of AlCl_3 , %	Flavonoid content, %
1	3,59±0,180
2	3,59±0,180
3	3,57±0,179
4	3,78±0,189
5	3,76±0,188

Table 2. Dependence of the content of flavonoids (%) on the volume of the AlCl_3 solution used in the quantitative determination of flavonoids

Volume of added AlCl_3 solution, μl	Flavonoid content, %
200	3,82±0,191
400	3,78±0,189
600	3,87±0,194
800	3,73±0,187
1000	3,77±0,189
1200	3,61±0,181
1400	3,79±0,190

Thus, according to the results of this experiment, we can say that the optimal use for the quantitative determination of flavonoids is the use of a 4% aqueous solution of AlCl_3 in a volume of $200 \pm 10,0 \mu\text{l}$.

Table 3 shows the results of the selection of the optimal volume of glacial acetic acid.

Table 3. Dependence of the content of flavonoids (%) on the volume of a solution of glacial acetic acid used in the quantitative determination of flavonoids

Glacial acetic acid volume, μl	Flavonoid content, %
200	4,85±0,243
400	4,39±0,220
600	3,82±0,191
800	3,89±0,195
1000	3,69±0,185

As can be seen from the data obtained, with an increase in the amount of added glacial acetic acid, the content of flavonoids decreases, because acid is a stop agent in the reaction between flavonoids and aluminum chloride. Its use is optimal in a volume of $10,0 \pm 0,500 \mu\text{l}$.

Table 4 shows the results of the selection of the optimal reaction time between flavonoids and aluminum chloride.

Table 4. Dependence of the content of flavonoids (%) on the reaction time between flavonoids and aluminum chloride

Reaction time, min	Flavonoid content, %	Reaction time, min	Flavonoid content, %
5	4,44±0,222	50	4,97±0,249
10	4,60±0,230	60	5,00±0,250

15	4,70±0,235	70	5,02±0,251
20	4,76±0,238	80	5,05±0,253
30	4,86±0,243	90	5,06±0,253
40	4,93±0,247	100	5,07±0,254

Based on the results obtained, it can be seen that with an increase in the reaction time, the content of flavonoids increases due to the formation of a larger amount of complexes between flavonoids and aluminum chloride. The peak in the percentage of flavonoids is observed at 60 minutes ($5,00 \pm 0,250\%$), then it reaches a plateau. Student's t-test between the content of flavonoids at a reaction time of 60 and 100 minutes is $0,30 > 0,05$, which indicates that there is no statistically significant change in the amount of flavonoids from 60 minutes to 100 minutes.

CONCLUSIONS

For the quantitative determination of yarrow flavonoids, it is optimal to add, for the preparation of the test solution, a 4% aqueous solution of aluminum chloride in a volume of $200 \pm 10,0 \mu\text{l}$ and glacial acetic acid in a volume of $10,0 \pm 0,500 \mu\text{l}$ for the preparation of both the test solution and the compensation solution, the optimal reaction time is between flavonoids and aluminum chloride is 60 minutes.

REFERENCES

1. Ali, S.I. Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L.: A Review / S.I. Ali, B. Gopalakrishnan, V. Venkatesalu //

Phytotherapy Research. – 2017. – № 31(8). – P. 11-33.

2. Karchevskaya, K.I. The optimal time for the extraction of flavonoids from herb yarrow / K. I. Karchevskaya // Student medical science of the XXI century: materials of the XX International scientific-practical conference of students and young scientists / ed. A. T. Shchastny. – Vitebsk, 2020. – P. 721-723.
3. Karchevskaya, K.I. Optimization of the extraction of flavonoids from the herb yarrow / K.I. Karchevskaya // Innovations in medicine and pharmacy-2020: materials of a remote scientific-practical conference of students and young scientists. – Minsk, 2020. – P. 784-787.
4. Karchevskaya, K. I. Extraction of flavonoids from herb yarrow / K. I. Karchevskaya // "Actual problems of modern medicine and pharmacy - 2020": materials of the LXXIV scientific and practical conference of students and young scientists with international participation / ed. A. V. Sikorsky, V. Y. Khryshchanovich. – Minsk: BSMU, 2020. – P. 1168-1172.

CZU: 615.322:616.311.2-002

PHYTOTHERAPY | FITOTERAPIA
IN TREATMENT OF GINGIVITIS | ÎN TRATAMENTUL GINGIVITEI

Nadezhda Krautsova-Kukhmar, Natallia Shakavets, Olga Mushkina, Tatyana Kidyasova

Belarusian State Medical University

Rezumat. Gingivita este cea mai frecventă boală a țesuturilor parodontale la copii. Medicamentele pe bază de plante sunt adesea folosite pentru a trata această patologie. Gelul cu conținut de tinctură de frunze de arin negru reprezintă unul dintre aceste medicamente. *Scopul lucrării* este de a evalua eficacitatea unui fitogel în tratamentul gingivitei experimentale. *Materiale și metode.* 42 animale au fost selectate pentru a simula gingivita experimentală. Au fost împărțite aleatoriu în 6 grupuri după apariția semnelor clinice de inflamație. Gelul cu conținut de tinctură de frunze de arin negru și gelul ce conține metronidazol au fost utilizate pentru tratament în decurs de 2 și 4 zile. Toți șobolanii au fost biopsiați pentru examinare histologică în a 8-a și a 10-a zi de la începutul experimentului. *Rezultate.* Semnele clinice ale inflamației au dispărut în ambele grupuri în a 2-a zi. Semnele histologice ale inflamației din grupul cu gel ce conține metronidazol au persistat în a 4-a zi. Regenerarea structurii gingiei din grupul cu gel care conține tinctură de frunze de arin negru a fost determinată în a 4-a zi după aplicare. *Concluzii.* Gelul cu conținut de tinctură de frunze de arin negru este un medicament eficient în tratamentul gingivitei experimentale.

Cuvinte cheie: gingivită experimentală, gel cu conținut de tinctură de frunze de arin negru, gel cu conținut de metronidazol.

Abstract. Gingivitis is the most common disease of periodontal tissues in children. Herbal drugs are often used to treat this pathology. One of them is a gel containing tincture of black alder leaves. *The aim of the work* is to evaluate the effectiveness of a phytogel in the treatment of experimental gingivitis. *Materials and methods.* 42 animals were selected to simulate experimental gingivitis. They were randomly divided into 6 groups after the onset of clinical signs of inflammation. A gel containing tincture of black alder leaves and a gel containing metronidazole were used for treatment during 2 and 4 days. All rats were biopsied for histological examination on the 8th and 10th day from the beginning of the experiment. *Results.* The clinical signs of inflammation disappeared in both groups on the 2th day. The histological signs of inflammation in the group with gel containing metronidazole persisted on the 4th day. The regeneration of the gum structure in the group with gel containing tincture of black alder leaves was determined on the 4th day after application. *Conclusions.* Gel containing tincture of black alder leaves is an effective drug in the treatment of experimental gingivitis.

Keywords: experimental gingivitis, gel containing tincture of black alder leaves, gel containing metronidazole.

INTRODUCTION

Gingivitis is the most common pathology among inflammatory diseases of the marginal periodontium tissues. Periodontal diseases are a set of common oral infections caused by a variety of bacterial colonizers inside and around the gingival tissues. Gingivitis is an early inflammatory response that is initiated by the bacterial toxins in dental plaque. It occurs by redness and edema in the gingival tissue without periodontal attachment loss. The pathogenesis of gingivitis is a complex of microcirculatory and connective tissue reactions to damage to cells and blood vessels by toxins produced by microorganisms of dental plaque. Usually treatment of gingivitis consists of professional oral hygiene and the usage of medications. A gel containing metronidazole and chlorhexidine is very often used for gingivitis treatment in Belarus, but it has limitations in its application in children [1].

The medicinal plants are widely used for the treatment of various types of dental pathology. Biologically active natural compounds are easily included into the metabolic processes of the body, have a wide spectrum of therapeutic action, a good tolerance and the low cost. People of

different age groups are able to use them with a minimum number of side effects.

The abundant chemical composition of plants, including various classes of compounds, determines their polyvalent action and effects on the pathological process [2,3,4]. The development of new effective and safe herbal medicines that provide a comprehensive pharmacological effect on all parts of pathogenesis is still relevant. Herbal drugs, according to their structure, have anti-inflammatory, hemostatic, wound healing and antimicrobial effects in gingiva therapy. The drugs with black alder contain tannins, flavonoids, phenol carboxylic acids. A decoction of fresh alder leaves, bark and cones is used in treatment of stomatitis and gingival bleeding in traditional medicine [1, 6]. Black alder leaves are used as diaphoretic, as well as in skin diseases therapy [5]. Experimental studies have confirmed the presence of anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant properties of extracts from black alder leaves [7,8,9].

Taking into account the experience of traditional medicine, the chemical composition and the results of studying the pharmacological activity the tincture from the leaves of black alder was used to obtain a soft dosage form-gel. It

was used in experiment for the treatment of inflammatory diseases of the marginal periodontium tissues.

The **aim of the work** is to evaluate the effectiveness of a phyto-gel in the treatment of experimental gingivitis.

MATERIALS AND METHODS

The principles of bioethics were followed in accordance with the regulatory documents during the experimental study: "International Recommendations (Code of Ethics) for the conduct of biomedical research using animals" [10], "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes" [11], "Rules for working with experimental animals" (approved by the Academic Council of the Moscow State Medical Institute on 04.24.1996) [12], "Good laboratory practice" [13]. The research protocol was approved at the ethical commission meeting of the Belarusian State Medical University before the experiment.

42 white Wistar rats aged 3 months were selected to simulate experimental gingivitis. They were randomly divided into 6 groups after the onset of clinical signs of inflammation: group 1A - animals that were treated with experimental gingivitis with a single application of a gel containing tincture of black alder leaves for 2 days; group 2A - animals that were treated with experimental gingivitis with a single application of a gel containing metronidazole for 2 days; group 3A - animals with experimental gingivitis (control group), group 1B - animals that were treated with experimental gingivitis with a single use of a gel containing tincture of black alder leaves for 4 days; group 2B - animals treated with experimental gingivitis with a single use of a gel containing metronidazole for 4 days; group 3B - animals with experimental gingivitis (control group). In animals 1A-3A of groups a biopsy was taken on the 8th day from the start of the experiment, in group 1B-3B on the 10th day from the start of the experiment.

The animal was injected once in the region of central incisors into the submucosal layer of gingiva with the drug "Vipraxin" (an aqueous solution of viper venom) in a volume of 0.2 ml to simulate experimental gingivitis. Therapeutic drugs (a gel containing tincture of black alder leaves and a gel containing metronidazole) were applied in a thin layer to the area of inflammation after the appearance of clinical signs of gingivitis (6 days from the beginning of the experiment).

All animals were fed a standard diet. A biopsy was taken in the area of the right lower incisor sized 1.0 × 1.0 cm. For histology material was kept in 10% neutral formalin. Later it was stained with hematoxylin and eosin. Micro-preparations were investigated using optical microscope and photographed (digital camera Levenhuk).

RESULTS AND DISCUSSIONS

It was found that in the groups 1A and 2A clinical signs of inflammation decreased by the 2nd day of the use of drugs: in both groups there was only slight hyperemia of the marginal gingiva of the central incisors without signs of bleeding.

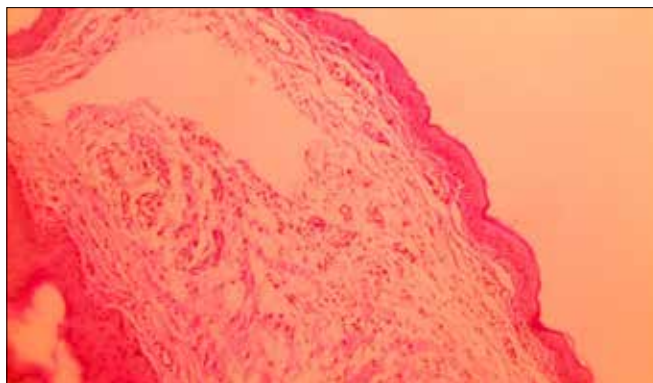


Figure 1. Rat gingival mucosa on the 8th day from the beginning of experiment. Vesiculation of stratum basale cells cytoplasm. Disintegration of cells of the stratum spinosum and stratum granulosum of the epithelium. Intracellular focal edema of the stratum granulosum of the epithelium. Vascular fullness (venous). Microscopical examination, H&E stain. Original magnification, x200.

In the histological preparations of gingiva in the group 1A (Figure 1) and the group 2A (Figure 2) was noted the restoration of connective tissue layer, however, structural changes in the epithelial cells of the stratum basale were preserved, while in the group 2A the number of such cells was more. Also in this group was defined disintegration of the cells of the stratum spinosum and stratum granulosum. There was a decrease in the smoothness of the papillae of the surface layer of the mucosal lamina propria in both groups, which remained swelling, infiltrated by single lymphocytes, mast and plasma cells. In the group 1A isolated areas of defibrination and fragmentation of fibrous structures were determined, while in the group 2A the number of such changes was higher. Both groups retained connective tissue vascular fullness.

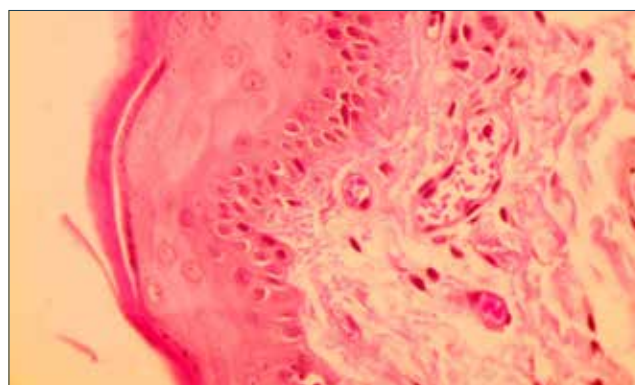


Figure 2. Rat gingival mucosa on the 8th day from the beginning of experiment. Vesiculation of stratum basale cells cytoplasm. Disintegration of cells of the stratum spinosum and stratum granulosum. Edema and infiltration by lymphocytic cells. Vascular fullness (venous). Microscopical examination, H&E stain. Original magnification, x400.

In the 3A group where no treatment was performed both clinical and histological signs of inflammation were noted. Redness and swelling of the marginal gingiva and gingival papilla, slight smoothness of the contour was visually preserved, bleeding was noted during touching. In histological preparations of gingiva intracellular edema of the stratum spinosum was determined, cell nuclei were shifted to the periphery, marked smoothness of the papillae of the surface layer of the mucosal lamina propria, edema, significant infiltration by cells of the lymphocytic range was noted. Areas of defibrination and fragmentation of fibrous structures, numerous vascular fullness was determined (Figure 3).

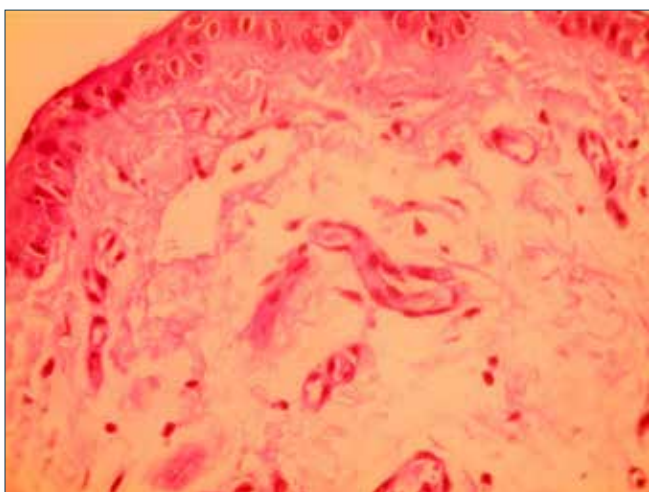


Figure 3. Rat gingival mucosa on the 8th day from the beginning of the experiment. Smoothness of the papillae of the mucosal lamina propria. Edema and infiltration by lymphocytic cells. Defibrination of fibrous structures. Microscopical examination, H&E stain. Original magnification, x400.

There was a complete disappearance of clinical signs of inflammation after using of drugs for 4 days in the 1B group and the 2B group: the gingiva had a gentle pink color, without changing the shape and contour, bleeding was absent.

In histological preparations of gingiva of animals from group1B the complete restoration of the gum structure was noted. The stratum basale was represented by layers of short cells located in places in the form of a stockade. The cells of the stratum spinosum were unbalanced arranged, there was no swelling of the epithelium. The mucosal lamina propria recovered completely and was represented by a fibrous connective tissue with a large amount of collagen and elastic fibers. Not numerous vascular fullness was preserved (Figure 4).

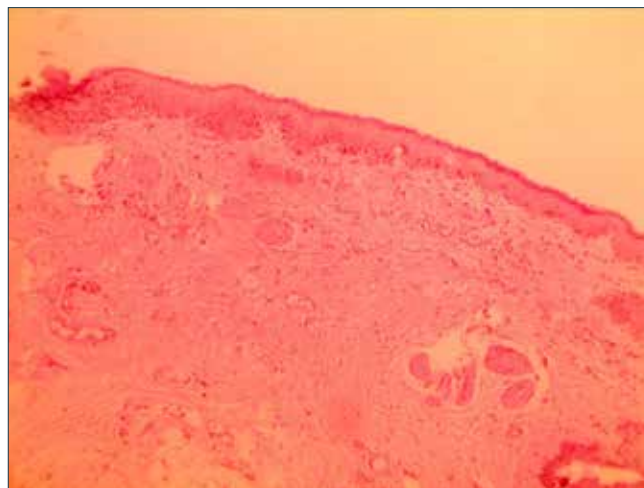


Figure 4. The mucous membrane of rat gingiva on the 10th day from the beginning of experiment. The stratum basale is represented by cells in the form of a stockade. The mucosal lamina propria is predominantly wide and low. Microscopical examination, H&E stain. Original magnification, x200.

In group2B intracellular edema of the epithelium of the stratum spinosum was noted. The process of reparation of connective tissue papillae of mucosal lamina propria was determined but swelling and vascular fullness (venous) persisted, endothelial cells were rounded, swollen. There were cell infiltrations, but defibrination of fibrous structures decreased (Figure 5).

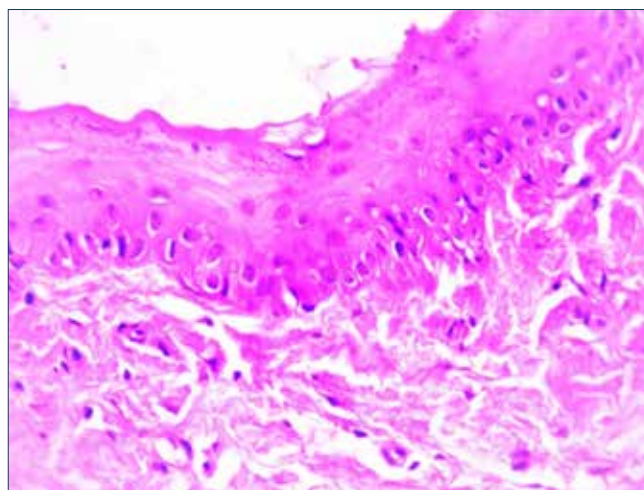


Figure 5. The mucous membrane of rat gingiva on the 10th day from the beginning of experiment. Slight edema and infiltration by lymphocytic cells. Vascular fullness. Slight defibrination of fibrous structures. Microscopical examination, H&E stain. Original magnification, x400.

Only slight redness of marginal gingiva and smoothness of its contour were noted during visual inspection of the gingiva in group 3B, bleeding was absent. All the signs of the inflammatory process were preserved in histological preparations: changes in epithelial cells of the stratum basale, disintegration of cells of the stratum spinosum and stratum granulosum. The smoothness of the mucosal lamina propria papillae, edema and infiltration by lymphocytic cells were determined. There were defibrination and fragmentation of fibrous structures with the vascular fullness of numerous vessels of connective tissue (Figure 6).

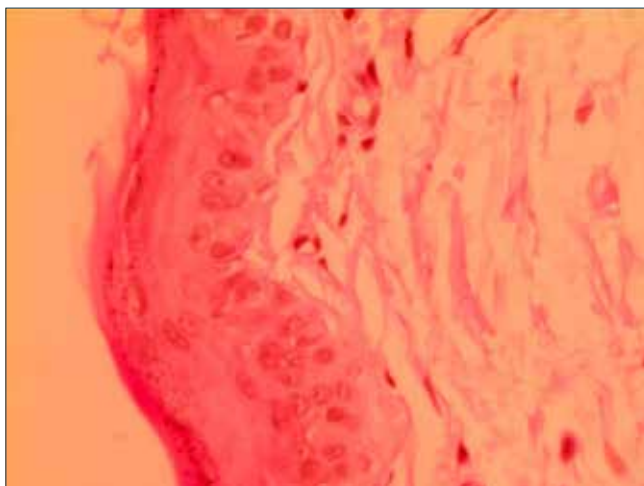


Figure 6. The mucous membrane of rat gingiva on the 10th day from the beginning of experiment. Disintegration of stratum spinosum cells. Smoothness of mucosal lamina propria papillae. Edema and infiltration by lymphocytic cells. Fragmentation of fibrous structures. Microscopical examination, H&E stain. Original magnification, x400.

CONCLUSIONS

It was found that after using a gel containing tincture of black alder leaves the restoration of gingival structure occurred after 4 days, while the use of a gel containing metronidazole did not lead to the disappearance of histological signs of inflammation. Thus, the high efficiency of the gel containing tincture of black alder leaves in the treatment of experimental gingivitis was established.

REFERENCES

1. Ilyina, T.A. Medicinal plants of Russia / T.A. Ilyina. – M.: Eksmo, 2006. – 189 p.
2. Gurina N.S. Promising directions in the study of medicinal plants / N.S. Gurina, O. V. Mushkina, A.S. Bakun et al. // Mat. int. Conf., dedicated to the 60th anniversary of the pharmaceutical. Faculty of Modern Achievements of Pharmaceutical Science and Practice. – Vitebsk, 2019. – p. 60–63.
3. Karomatov Inomzhon Medicinal properties of alder / I.D. Karomatov, D.K. Aslanova // Biology and Integrative Medicine. – 2017. – No. 5. – p. 63–68.
4. G.V. Nesterov Influence of the fermentation process on the quality indicators of alder leaves of the species *Alnus Incana* (L.) and *Alnus Glutinosa* (L.) Gaerth / Nesterov G.V., Litvinova T.M., Kondrashev S.V. // Pulse. – 2020. – No. 22 (3). – p. 67–71.
5. Zuzuk BM Alder, alder *Alnusincan* (L.), Moench. Analytical review / BM Zuzuk [etc.] // Pharmacist. – 2007. – № 9. – p. 37–41
6. Dhaifallah Alshehria Treatment efficacy of photoactivated disinfection versus *Salvadora persica* gel in experimental gingivitis / Dhaifallah Alshehria, Ali Alqerbanb, Abdulaziz Samran // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2020. – V. 29.
7. Mushkina O.V. Influence of extracts from the leaves of gray alder and black alder on the biochemical parameters of blood in generalized inflammation / O.V. Mushkin, S.A. Gurin // Bulletin of Vitebsk State University. – 2010. – No. 5 (59). – pp. 45–48.
8. Mushkina O.V. Antimicrobial activity of biologically active substances from *Alnusglutinosaleaves* / O.V. Mushkina, D.M. Petrovich, N.S. Gurin, I.I. Generalov // Actual problems of modern medicine and pharmacy: materials 59 total. scientific and practical conf. stud. and young scientists. – Vitebsk, 2007. – p. 218 – 220.
9. Mushkina O.V., Activity and total phenolic content of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* leaves / O.V. Mushkina, N. S. Gurina, M.M. Konopleva et al. // Acta scientiarum polonorum. Hortorum Cultu. – 2013. – V. 12(3). – p. 3–11.
10. International guidelines (code of ethics) for the conduct of biomedical research using animals. – 2018.
11. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. – 2020.
12. Denisov S.D. Requirements for a scientific experiment using animals / S.D. Denisov, T.S. Morozkina // Health. – 2001. – No. 4. – p. 40–42.
13. Technical Code of Good Practice “Good Laboratory Practice”, approved by the Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated March 28, 2008 No. 56

CZU: 615.322.074:582.949.26+547.597

THERAPEUTIC POTENTIAL AND PREVENTIVE EFFECTS
OF MAJOR TRITERPENIC SECONDARY METABOLITES
FROM LAVANDULA ANGUSTIFOLIAPOTENȚIALUL TERAPEUTIC ȘI EFECTE PREVENTIVE ALE
METABOLITELOR TRITERPENICE SECUNDARE MAJORI-
TARE DIN LAVANDULA ANGUSTIFOLIAAdina Organ¹, Vladilena Ghîrbu², Maria Cojocaru-Toma¹, Veaceslav Kulcițki²Scientific supervisors: assoc. prof. Tamara Cotelea¹ & prof. Nicon Ungur²¹Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy of the Republic of Moldova,²Institute of Chemistry, Chișinău, Republic of MoldovaAutor corespondent: aorgan@mail.ru

Rezumat. Acizii ursolic și oleanolic se găsesc pe scară largă în diverse plante sunt triterpenoide pentaciclice naturale eficiente cu rol profilactic și terapeutic în diferite boli, precum scleroza multiplă, tulburări metabolice, diabet și diferite tipuri de cancer.

Acest reviu al literaturii prezintă cele mai recente rapoarte privind impactul acizilor ursolic și oleanolic și mecanismul biologic al activităților lor. Astfel reviuul prezintă date care propun că acizii ursolic și oleanolic sunt o alternativă potențială și complementară pentru tratamentul și managementul mai multor maladii.

Cuvinte cheie: *Lavandula angustifolia*, polifenoli, acid ursolic, acid oleanolic.

Summary. Ursolic and oleanolic acids are widely found in diverse plants and are natural effective pentacyclic triterpenoids with prophylactic and therapeutic roles in various diseases such as multiple sclerosis, metabolic disorders, diabetes and different cancers.

This review presents the latest reports on the impacts of ursolic and oleanolic acids and the biological mechanism of their activities. Thus, this review presents data proposing that ursolic and oleanolic acids are potential alternative and complementary therapies for the treatment and management of several diseases.

Keywords: *Lavandula angustifolia*, polyphenols, ursolic acid, oleanolic acid.

INTRODUCTION

Medicinal plants play a major role in medicine as a prime material for perfume industry, cosmetics, or phytotherapy. Herbs contain many active compounds that exhibit multidirectional phytotherapeutic activity and are used in the treatment and prevention of cardiovascular, respiratory, gastrointestinal diseases, urinary infections, as well as in chronic diseases of children and elderly people.

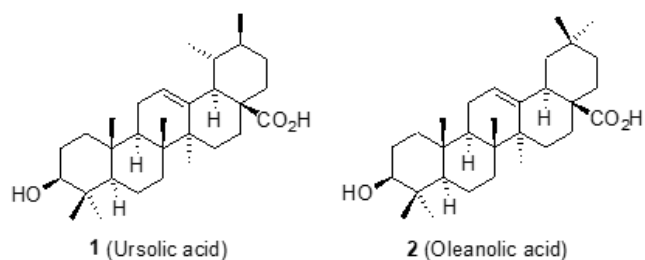
Considerable attention has been paid to the bioactive compounds in herbs and spices in an effort to reveal their potential contribution to health and the preservation of food quality. Several previous studies have suggested that polyphenols from natural sources could be a potential alternative to the use of synthetic antioxidants. Natural antioxidants from various botanical sources have been regularly reviewed by focusing on a single species, genus, origin, popularity, applications, bioactivities, selected phytochemical groups of antioxidants [1].

Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill, family Lamiales) is a plant with a number of beneficial properties for the human body. Besides its application in herbal treatment, lavender is widely used in the cosmetic, perfume, food, and aromatherapeutic industries. Plant contains essential oil, polyphenols, ursolic and oleanolic acids, anthocyanins, phytosterols, coumarin and tannins [2,3].

Polyphenols are a large group of natural compounds that are widely distributed in the plant kingdom, as con-

stituents of medicinal herbs and are integral part of the human diet. Within the last few years extensive research has revealed that including of certain fruits and vegetables rich in polyphenols in a diet can reduce the risk of acquiring specific cancers [4]. Polyphenolic extracts are attractive ingredients for pharmaceutical and cosmetic industry due to their beneficial biological properties. These compounds may reduce the risk of the development of several diseases due to a complex effect but many authors claim that some of their properties may be related both to their antioxidant capacity and other biological activities [5].

Ursolic (1) and oleanolic (2) acids are secondary plant metabolites that are known to be involved in the plant defence system against water loss and pathogens. Nowadays these triterpenoids are also regarded as potential pharmaceutical compounds and there is mounting experimental data that either purified compounds or triterpenoid-enriched plant extracts exert various beneficial effects, on model systems of both human or animal origin. Some of those effects have been linked to the ability of ursolic and oleanolic acids to modulate intracellular antioxidant systems and also inflammation and cell death-related pathways. Ursolic and oleanolic acids are common phytochemicals naturally found in various plants, the wax-like coatings of fruits and many medicinal herbs – lavender, rosemary, oregano in the form of free acids or aglycones for triterpenoid saponins. For a long time, these compounds were considered to be biolog



ically inactive, but in recent years they have attracted the interest of medical scientists because of their pharmacological effects combined with low toxicity.

Herb mixtures are widely used in traditional medicine of many cultures and their clinical potential is well established. Many of them contain ursolic, oleanolic acids and their derivatives [6].

Ursolic acid (1) and its isomer oleanolic acid (2) share many pharmacological effects, including neuroprotection, antimicrobial, antifungal, antiulcer, antiparasitic, anticancer, sedation, hepatoprotection, anti-inflammation, anti-oxidation and regulating blood glucose [7,8].

The aim of this work was bibliographic evaluation of pharmaceutical properties and therapeutic potential of ursolic (1) and oleanolic (2) acids in context of the pharmaceutical reevaluation of dried waste of *Lavandula angustifolia* cultivated in Republic of Moldova.

MATERIALS AND METHODS

Generalization and analysis of bibliographic data, selected from international databases: PubMed, Medline, Environmental Issues & Policy Index, Google Scholar, etc., about chemical composition of *Lavandula angustifolia* Mill species, important role of phenolic compounds, inclusive of ursolic and oleanolic acids, active principles with therapeutic potential and pharmacological activities.

RESULTS AND DISCUSSION

Anticancer potential. Ursolic acid was examined for its ability to inhibit the breast cancer cells by modulating different signaling cascades such as PI3K/Akt/mTOR-, ERK- and EGFR-related signaling cascades. UA also arrests BC cells by inhibiting tumor growth, metastasis and angiogenesis, induces apoptosis, arrest cell cycle thereby reducing the tumor size [9].

Prof. Sen A. *et al.* [10] evaluated anti-cancer effects of oleanolic acid. The molecular mechanisms of this substance are diverse, such as inhibiting the proliferation of cancer cells, preventing cancer cell migration and invasion, restraining angiogenesis, and inducing autophagy and apoptosis. Although a very large number of *in vitro* studies have been carried out showing the inhibition of carcinogenesis, only a few *in vivo* studies have confirmed that oleanolic acid is promising anti-cancer agent.

Another research on anti-cancer effects of oleanolic acid was evaluated. Prof. Zibera *et al.* [11] studied oleanolic acid inducing both extrinsic and intrinsic apoptosis in human lung cancer cells by multiple signaling pathways. Oleanolic acid activated intrinsic apoptosis, as observed by the up-regulation of caspase-3 and caspase-9, poly

(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage, release of cytochrome c, as well as increase in Bax/Bcl-2 expression ratio.

Anti-inflammatory potential. Prof. Kashyap *et al.* [2] have determined the anti-inflammatory therapeutic potential of ursolic and oleanolic acids.

The administration of oleanolic acid enhanced the development of serum antibody immunoglobulin G in mice and showed the marked inhibition of the hemolytic activity of the total complement by the classical pathway in guinea pigs. In integration, the similar passive cutaneous anaphylaxis in mice or rats and the degranulation of mast cells of calvarial periosteum in rats was significantly obviated by oleanolic acid along with the reduction in capillary permeability and type I allergic reaction. In a similar way, the anti-inflammatory activity of ursolic acid was analyzed by utilizing different *in vitro/in vivo* inflammatory models like croton oil-induced oedema in albino swiss mice.

Prof. Tsao *et al.* [12] evaluated the anti-inflammatory effect of oleanolic acid on bronchial epithelial cells.

Cigarette smoke or particulate matter could stimulate the release of hydrogen peroxide in airway epithelial cells, which contributes to apoptotic, oxidative, and inflammatory stress in those cells. In present study, pretreatment with oleanolic acid markedly protected two human bronchial epithelial cell lines (16HBE and BEAS-2B cells) against hydrogen peroxide induced oxidative and inflammatory injury, which in turn enhanced cell survival. In addition, it was found that this compound was able to mediate protein expression of NADPH oxidase, COX-2, NF- κ B, and MAPK in these bronchial epithelial cells. Furthermore, this triterpenic acid treatments alone, without hydrogen peroxide, did not affect the growth of these test cells. These findings implied that oleanolic acid might be safe and benefit respiratory epithelium stability and functions.

Antidiabetic potential. The triterpenoic acids were examined for protective effects in diabetes type 2 by Portuguese scientists [13]. The results of the experiment show that ursolic and oleanolic acids reduce the absorption and uptake of glucose, lower endogenous glucose production, increase insulin biosynthesis, secretion, and sensitivity, and protect against diabetic complications. These protective effects occur without noticeable hepatotoxicity, at the dose used in the experimental studies, as indicated by the decreased values of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase measured. This relevant fact is contrary to most currently used antidiabetic drugs, including sulfonylureas, α -glucosidase inhibitors, biguanides, and thiazolidinediones, which can cause liver toxicity.

Antihypertensive potential. The anti-hypertensive effects of oleanolic and ursolic acids may be mainly attributed to their potent anti-hyperlipidemic and anti-oxidant effects, combined with diuretic, natriuretic, and saluretic effects, mostly due to the inhibition of Na⁺ and K⁺ reabsorption in the early portion of the distal tubule. However, it was also reported that the anti-hypertensive and antiatherogenic properties of these compounds may also result from their effects on endothelium-dependent

vasorelaxation. Impaired endothelial function, due to decreased bioavailability of NO (nitric oxide), is a hallmark of atherosclerosis. In contrast, an increase in NO induces vasorelaxation, preventing the development of atherosclerosis. In this context, ursolic acid displayed vasorelaxing properties, mediated by an increase of NO release and relaxation by activation of endothelial nitric oxide synthase [7].

Neuroprotective potential. Mild to severe defects in the nervous system typically result due to oxidative stress and excitotoxicity. An imbalance in cellular homeostasis may permanently reduce cognitive function and cause brain damage, resulting in various brain diseases. Ursolic acid inhibits oxidative stress and excitotoxicity, suggesting that it may play a protective role in various brain diseases induced by oxidative stress and excitotoxicity. In addition, suppresses apoptotic signaling and exerts anti-inflammatory effects in the brain. Ursolic acid significantly reduces free radical levels in rat neuronal cultures. In addition, it attenuates reactive oxygen species (ROS) levels in the brain. It was found that UA increases the levels of antioxidant components, such as glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSH) ratio, catalase (CAT) activity, and superoxide dismutase (SOD) activity in a rat model of subarachnoid hemorrhage [14].

Despite the fact that triterpenoid acids have applications in medicine and research, the obtaining and synthesis of these compounds still remains a growing need. The study of waste of *Lavandula angustifolia* can be a solution. Therefore, after obtaining the essential oil from *Lavandula angustifolia* aerial parts, the waste may contain an amount of some unknown compounds not studied yet. In this context the study of the extracts obtained from dried waste of *Lavandula angustifolia* especially for content of ursolic acid and oleanolic acid is substantial for the production of new pharmaceutical preparations.

CONCLUSIONS

Being natural triterpene compounds existing in a variety of plants, ursolic (**1**) and oleanolic (**2**) acids exhibit widespread pharmacological activities and can be included in the treatment of some severe diseases – some types of cancer, neurodegenerative, cardiovascular, diabetes.

Studies performed on the *Lavandula angustifolia* extracts have determined the content of polyphenols, flavonoids, triterpenoid acids, which shows that these compounds can be found in dry waste after oil extracting. The valuation of *Lavandula angustifolia* dried waste containing ursolic acid (**1**) and oleanolic acid (**2**) also denotes an economic potential in production of new pharmaceutical preparations.

ACKNOWLEDGEMENT

The financial support from National Agency for Research and Development (ANCD) of the Republic of Moldova: "New substances with preventive and therapeutic potential based on natural compounds of plant origin and modern methods of organic synthesis", code 20.80009.8007.03, is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Tzima K., Brunton N.P., Rai D. K. Qualitative and Quantitative Analysis of Polyphenols in *Lamiaceae* Plants – A Review. *Plants* 2018, 7, 25.
2. Kashyap, D.; Sharma, A.; Hardeep, S. T.; Punia, S.; Sharma, A. K. Ursolic Acid and Oleanolic Acid: Pentacyclic Terpenoids with Promising Anti-Inflammatory Activities. *Rec. Patents on Inflamm. & Allergy Drug Disc.*, 2016, 10 (1), 21-33.
3. Prusinowska, R.; Śmigielski, K. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. *Herba Polonica*, 2014, 60, (2), 56-66.
4. Ovesna Z., Kozics K., Slamenova D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Research*, 2006, 600 (1-2), 131-137.
5. Amarowicz R., Pegg R. B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 2004, 84 (4), 551-562.
6. Wolska K.I., Grudniak A. M., Fiecek B., Krackiewicz-Dojwat A., Kurek A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Centr. Eur. J. Biol.*, 2010, 5, (5), 543-553.
7. Sena, C. M.; Pereira, A. M.; Seica, R. Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, 1832, (12), 2216-2231.
8. Somova, L. O.; Nadar, A.; Rammanan, P.; Shode, F. O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine* 2003, 10 (2-3), 115-121.
9. Iqbal J., Abbasi B. A., Ahmad R., Mahmood T., Kanwal S., Ali B., Khalil A. T., Shah S. A., Alam M. M., Badshah H. Ursolic acid a promising candidate in the therapeutics of breast cancer: Current status and future implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 108, 752-756.
10. Sen A. Prophylactic and therapeutic roles of oleanolic acid and its derivatives in several diseases. *World J. Clin. Cases*, 2020, 8, (10), 1767-1792.
11. Ziberna L., Samec D., Mocan A., Nabavi S. F., Bishayee A., Farooqi A. A., Sureda A., Nabavi S.M. Oleanolic acid alters multiple cell signaling pathways: implication in cancer prevention and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18 (3), 643-659.
12. Tsao S.-M., Yin M.-C. Antioxidative and anti-inflammatory activities of Asiatic acid, glycyrrhizic acid and oleanolic acid in human bronchial epithelial cells. *JAFC*, 2017, 65 (15), 3251-3259.
13. Silva F., Oliveira P., Duarte M. Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion? *JAFC*, 2016, 64, 2991-3008.
14. Seo, D. Y.; Lee, S. R.; Heo, J.-W.; No, M.-H.; Rhee, B. D.; Ko, K. S.; Kwak, H.-B.; Han, J. Ursolic acid in health and disease. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2018, 22 (3), 235-248.

CZU: 615.322.074:582.824.3+581.192

COMPOZIȚIA CHIMICĂ | CHEMICAL COMPOSITION A SPECIILOR GENULUI HYPERICUM L. | OF SPECIES OF THE GENUS HYPERICUM L.

Anna Benea

Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

Autor corespondent: anna.benea@usmf.md

Abstract. This study analyzed the diversity of secondary metabolites in the types of *Hypericum* L., widespread in moderate and tropical zones around the world. St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) is used since ancient times for its therapeutic properties. In the Republic of Moldova, it is used as a medicinal plant with antiinflammatory, antibacterial and astringent properties. The diversity of use in scientific and popular medicine is determined by the complex of chemical composition. Most scientific papers are dedicated to the phytochemical study of *H. perforatum* L., but currently new data appear on the chemical composition of other *Hypericum* species (*H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* L., *H. hirsutum* L., *H. elegans* Steph., etc.).

Keywords: chemical compounds, genus *Hipericum*, species of *Hypericum*

Rezumat. În acest studiu s-a analizat diversitatea metaboliților secundari în speciile genului *Hypericum* L., răspândite în zonele temperate și tropicale din întreaga lume. Sunătoarea (*Hypericum perforatum* L.) este utilizată din cele mai vechi timpuri pentru proprietățile sale terapeutice. În Republica Moldova se utilizează ca plantă medicinală cu proprietăți antiinflamatoare, antibacteriene și astringente. Diversitatea întrebunțării în medicina științifică și populară este determinată de compoziția chimică complexă. Majoritatea lucrărilor științifice sunt dedicate studiului fitochimic al speciei *H. perforatum* L., dar în prezent, apar date noi privind compoziția chimică a altor specii de *Hypericum* (*H. maculatum* Crantz, *H. tetrapterum* L., *H. hirsutum* L., *H. elegans* Steph., etc.).

Cuvinte cheie: compuși chimici, genul *Hipericum*, specii de *Hypericum*

INTRODUCERE

Genul *Hypericum* L. conține aproximativ 484 specii divizate în 36 secțiuni taxonomice, răspândite la nivel mondial în regiunile temperate, tropicale, subtropicale și montane, cu excepția Antarcticii. Peste 70 de specii au fost investigate din punct de vedere fitochimic. Variabilitatea proprietăților farmacologice a speciilor genului *Hypericum* se atribuie compușilor chimici secundari: floriglucinoși (hiperforina, adhiperforina), naftodiantroni (hipericina, pseudohipericina), flavonoide (hiperozida, rutozida, quercitrina, quercetol, kaempferol și biapigenina), acizi fenilpropanici (cafeic, clorogenic, ferulic), ulei volatil, taninuri, xantone, etc. Concentrația compușilor chimici în țesuturile vegetale variază în dependență de: faza fenologică, organul vegetativ, arealul de răspândire și condițiile climatice [1].

Actualmente, crește interesul științific față de speciile genului *Hypericum*, deoarece sunt surse de compuși chimici cu un spectru larg de acțiuni farmacologice: antimicrobiană, antifungică, antiinflamatoare, antidepresivă, antivirală și antioxidantă. Unile specii de *Hypericum* sunt bine cunoscute pentru eficacitatea lor terapeutică și utilizarea în medicina tradițională la tratarea rănilor, eczemelor, arsurilor, reumatismului, nevralgiei, gastroenteritei, ulcerelor, enurezisului, isteriei și depresiei [2].

Scopul. Evaluarea datelor bibliografice cu privire la biosinteza și acumularea compușilor chimici în speciile genului *Hypericum* în dependență de faza fenologică, organul vegetativ, și condițiile climatice.

MATERIALE ȘI METODE

A fost efectuată revizuirea literaturii științifice din perioada 2001-2020, utilizând următoarele baze electronice: Medline, Pubmed, Hinari, Google Scholar.

REZULTATE

Plantele genului *Hypericum* sunt producătoare de metaboliți secundari. În surse bibliografice cel mai mult se relatează despre prezența și conținutul hipericinei, care a fost inițial izolată din *Hypericum perforatum* L. de Buchner în 1830, fiind una dintre cele mai răspândite specii cu istorie lungă de mai mult de 2400 ani și cunoscută din secolul al V-lea î. Hr. ca remediu în tratarea rănilor [1, 2].

S-a demonstrat că biosinteza hipericinei și pseudohipericinei se petrece în glandele colore localizate în diferite organe vegetale ale speciei *H. perforatum*. Concentrația acestor compuși nu depinde de localizarea glandelor în plantă, dar numai de numărul lor [3]. Conținutul hipericinei în părțile aeriene de *H. perforatum* variază în dependență de arealul răspândirii: în Lituania de la 0,23 mg/g până la 1,24 mg/g; în Germania de la 0,69 mg/g până la 0,85 mg/g; în Austria între 0,032-0,090%; în Statele Unite ale Americii între 0,0003-0,125% [4]. Pravdivteva O. și colab. au dozat totalul de antracenderivați exprimat în hipericină în diferite organe vegetative ale sp. *H. perforatum* L.: flori (0,81%), fructe (0,084%), tulpini (0,091%), frunze (0,262%), partea lignificată a tulpinii (0,01%), rizomi cu rădăcini (0,025%) și în părțile aeriene (0,506%) [5]. Kitanov G. a comunicat despre conținutul hipericinei și pseudohipericinei în 27 din cele 36

specii de *Hypericum* cu o varietate de la 0,0009% (*H. empetrifolium*) până la 0,512% în (*H. boissieri*) [6]. S-a relatat despre concentrația hipericinei în părțile aeriene a 7 specii de *Hypericum* din flora României: *H. perforatum* L. (0,163 g%), *H. maculatum* Crantz ssp. *immaculatum* (0,211 g%), *H. maculatum* Crantz ssp. *typicum* (0,496 g%), *H. tetrapterum* L. (0,189 g%), *H. hirsutum* L. (0,096 g%) [7].

În prezent, este studiată pe larg hiperforina în produsele vegetale a specie *H. perforatum*, un compus chimic din grupa floroglucinolului, căruia i se atribuie acțiunea antidepressivă. Biosinteza hiperforinei cel mai mult se petrece în flori de *H. perforatum* L., în special în pistiluri, apoi în fructe și frunze. În părțile florilor conținutul hiperforinei și adhyperforinei constituie în: petale – 1,795%, sepale – 2,255%, pistil – 7,105% [8]. Un grup de cercetători a demonstrat că conținutul hiperforinei în bobocii florali este 6,9%, în fructe imature – 8,5%, în frunze – 1,5% [9]. Prin HPLC/MS a fost determinată concentrația hiperforinei, în părțile aeriene ale speciilor de *Hypericum* din flora Județului Bihor, România și anume: *H. perforatum* (7,89%), *H. maculatum* (0,077%), *H. tetrapterum* (0,103%) și *H. hirsutum* (0,67%) [10]. Studiul efectuat de Smelcerovic A. și colab. asupra speciilor răsândite în flora spontană a Serbiei a demonstrat conținutul înalt de hiperforină în *H. perforatum* (3,55 mg/g), *H. tetrapterum* (0,25 mg/g), *H. maculatum* (0,18 mg/g), mai mic în *H. hirsutum* (0,05 mg/g) și *H. olimpicum* (0,02 mg/g) [11]. Alți autori au raportat conținutul hiperforinei în părțile aeriene de *H. perforatum* din flora spontană a Turciei – 5,46 mg/g; flora spontană a Italiei – 4,55-24,26 mg/g, flora spontană a Indiei – 1,66-4,62 mg/g. În părțile aeriene înflorite în masă de *H. perforatum* cultivat în Slovacia conținutul este 91,6-107,5 mg/g, iar în bobocii florali de *H. perforatum* cultivate în Elveția este 0,9-6,4 mg/g [12, 13].

Din metaboliți secundari majori, care se conțin în speciile genului *Hypericum*, fac parte și flavonoidele (2-4%). Conținutul de flavonoide s-a dovedit a fi mai mare în înflorințele plantei, mai puțin în frunze, tulpini și bobocii florali [13]. Repčák M. și Martonfi P. au studiat localizarea și cantitatea metaboliților secundari în flori de *H. perforatum* L. Rutozida este prezentă în: petale (0,544%), sepale (1,588%), stamine (0,370%), pistil (0,647); hiperozida și izoquercitrina în: petale (2,345%), sepale (3,417%), stamine (2,345%), pistil (1,676%), quercitrina este prezentă în toate părțile florii dar în cantități mai mici; quercetolul în petale (1,905%), sepale (3,598%), stamine (2,171%), pistil (1,613%) [8]. Zimina L. și colab. prin HPLC, au dozat conținutul de flavonoide în părțile aeriene de *H. perforatum* L. și au obținut următoare rezultate: hiperozida – 2,5%, urmată de rutozidă – 1,05%; quercetol – 0,4% și biapigenină – 1,05% [14].

Biapigenina, a fost izolată pentru prima dată în 1986 [14] din boboci și flori de *H. perforatum* L. Conținutul de biapigenină crește progresiv pe parcursul dezvoltării bobocilor florali. După ce florile se deschid conținutul de biapigenină scade, fiind localizată în polen [15]. În părțile aeriene conținutul acestuia reprezintă 1,05% [14].

O altă grupă de compuși chimici sunt xantonele, care

au fost identificați în unele specii de *Hypericum* [16]. În sursele bibliografice, s-a raportat despre conținutul de kielcorină (0,01%) în rădăcini și urme de 1,3,6,7-tetrahidroxixanton în frunze și tulpini de *H. perforatum* L. [17, 18].

Procianidinele se consideră dimeri, trimeri, tetrameri și polimeri ale catechinei și epicatechinei, conținutul cărora în *Hyperici herba* (produs vegetal uscat) este de 12%, [18].

Ciccarelli D. și colab. au efectuat studiul histochimic al structurilor secretoare la specia *H. perforatum* L., care a demonstrat că uleiul volatil se conține în glande translucide și canale secretoare [19]. Cantitatea de ulei volatil se diferențiază în funcție de arealul răspândirii [20]. Cercetările anterioare au constatat că randamentul uleiului volatil din părțile aeriene de *H. perforatum* L. colectate în Turcia (0,19%), Italia (0,07%), Grecia (0,28%), Serbia (0,08%), Uzbekistan (0,1%) variază considerabil [21, 22, 23]. Conținutul de ulei volatil în părțile aeriene a speciei *H. perforatum* L. din diferite localități ale sud-estul Franței constituie 0,03-0,12%, din flora Tadjikistanului 0,1-0,4%, din Serbia 0,03-0,93%, Turcia, 0,04-0,5% și Kosovo 0,04-0,26%. Randamentul uleiului volatil din speciile genului *Hypericum* L. se schimbă în funcție de faza fenologică de dezvoltare: vegetativă (0,07%), butonizare (0,082), înflorire (0,092%), fructificare (0,058%). În organele vegetale variația cantității de ulei volatil este: în frunze – 0,33%, în flori – 0,12%, în tulpini – urme de ulei volatil [24, 25, 26]. *H. elegans* Stephan ex Willd., colectat din flora spontană a sud-est Serbiei în faza de înflorire, conține 0,08% ulei volatil (în părțile aeriene proaspăt colectate) cu componenții majori: undecan (31,9%), α -pinen (16,7%) și nonan (6,1%). Considerabil variază conținutul de ulei volatil în organele vegetative (produse uscate) ale *H. elegans* Steph. colectat în estul Poloniei: în flori 0,05%, în frunze 0,20%, în tulpini – urme de ulei volatil [21, 22].

CONCLUZII

Studiul realizat a confirmat prin caracterizarea chimică a speciilor genului *Hypericum*, valoarea lor ca sursă de metaboliți secundari cu proprietăți diverse farmacologice.

Biosinteza și acumularea principilor active depinde de arealul de răspândire, faza fenologică de dezvoltare a plantei, organul vegetativ și perioada de recoltare a produselor vegetale.

BIBLIOGRAFIE

1. Béjaoui A., Ben Salem I, Rokbeni N., M'rabet Y. et al. Bioactive compounds from *Hypericum humifusum* and *Hypericum perforatum*: inhibition potential of polyphenols with acetylcholinesterase and key enzymes linked to type-2 diabetes. In: Pharm Biol. 2017, vol. 55(1), p. 906-911. Doi: 10.1080/13880209.2016.1270973
2. Chimshirova R., Karsheva M., Diankov S., Hinkov I. Extraction of valuable compounds from bulgarian St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). antioxidant capacity and total polyphenolic content. In: Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 54, 5, 2019, p. 952-961. ISSN1314-7978 (Online).
3. Zobayed S. M. A, Freen F. A., Goto E., Kozai T. Ac-

- cumulation of Hypericin in Dark Glands of *Hypericum perforatum*. In: Annals of Botany, 2006, 98, p. 793–804. ISSN 0305-7364.
4. Bagdonaitė E., Janulis V., Ivanauskas L., Labokas J. Ex situ studies on chemical and morphological variability of *Hypericum perforatum* L. in Lithuania. In: Biologija, 2007, vol. 53. No.3, p. 63–70. ISSN 2029-0578 (Online).
 5. Правдивцева О., Куркин В. Сравнительное исследование химического состава надземной части некоторых видов рода *Hypericum* L. В: Химия растительного сырья, 2009, №1, с. 79–82. ISSN 1029-5143 (Online)/
 6. Kitanov G. M. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. In: Biochemical Systematics and Ecology, 2001, 29, p. 171-178. ISSN 0305-1978.
 7. Gîtea et al. The analysis of alcoholic extracts *Hypericum* species by UV/VIS spectrophotometry. In: Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie, 2010, Tom. XVII, 1, p. 111-115. ISSN 1224-5119.
 8. Repčák M., Mártonfi P. The localization of secondary substances in flower. In: Biologi, Bratislava, 1997, 52 (1), p. 91-94.
 9. Karppinen K. Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) – precursors and genes involved. Oulu 2010. Academic dissertation to be presented with the assent of the Faculty of Science of the University of Oulu for public defence in Kuusamonsali. Oulu, 2010, p. 14-18.
 10. Gîtea D., Vlase L., Tămaş M., Oniga I. Identification and quantitative determination of hyperforin in some *Hypericum* species. In: Contribuții Botanice. 2010, vol. 45, p. 35-40. ISSN 2067-3094 (Online).
 11. Smelcerovic A., Spiteller M. Phytochemical analysis of nine *Hypericum* L species from Serbia and the F.Y.R. Macedonia. In: Pharmazie. 2006, 61, 3, p. 251-252.
 12. Bruni R., Sacchetti G. Factors Affecting Polyphenol Biosynthesis in Wild and Field
 13. Grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). In: Molecules, 2009, 14, p. 682-725. ISSN 1420-3049.
 14. 132. Betül D. Isolation of a bioactive compound hypericin from a medicinal plant *Hypericum perforatum* L. using basic chromatography methods. For the degree of master of science in the department of chemistry. 2003, p. 6-10.
 15. Зими́на Л., Куркин В., Рыжков В. Сравнительное исследование компонентного состава травы фармакопейных видов зверобоя методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В: Химия растительного сырья, 2013, №1, с. 205–208. ISSN 1029-5143 (Online).
 16. Schulte-Lobbert S., Westerhoff K., Wilke A., Schubert-Zsilavec M., Wurglics M. Development of a high performance liquid chromatographic method for the determination of biapigenin in biorelevant media. In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003, 33, p. 53–60. ISSN 0731-7085 (Print).
 17. Patočka J. The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. In: Journal of Applied Biomedicine, 2003, 1, p. 61–70. ISSN 1214-0287 (Online).
 18. Zanolì P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. In: CNS Drug Reviews. 2004, Vol. 10, No. 3, p. 203–218. ISSN 1527-3458 (Online).
 19. Kumar V., Singh P.N., Muruganandam A.N et al. *Hypericum perforatum*: Nature's mood stabilizer. In: Indian Journal of Experimental Biology, 2000, Vol. 38, p.1077–1085. ISSN 0975-1009 (Online)
 20. Ciccarelli D., Andreucci A. C., Pagni A. M. Translucent Glands and Secretory Canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, Anatomical and Histochemical Studies During the Course of Ontogenesis. In: Annals of Botany, 2001, 88, p. 637- 644.
 21. Schwob I., Bessiere J.-M., Masotti V., Viano J. Changes in essential oil composition in Saint John's worth (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. In: Biochemical Systematic and Ecology. 2004, 32(8), p. 735-745. ISSN 0305-1978
 22. Benea A., Goncariuc M., Kulciti V, Dragalin I., Nistreanu A. Essential oil chemical composition biodiversity in the *Hypericum* L. species from the spontaneous flora of the republic of Moldova/Oltenia Journal for Studies in Natural Sciences. Museum of Oltenia Craiova, Romania. 2013, Tom. 29, Nr. 2, p. 47-52. ISSN 1454-6914.
 23. Benea A., Goncariuc M., Dragalin I., Nistreanu A. Conținutul și componența uleiului esențial la speciile de *Hypericum* L. (sunătoare) din flora spontană a Republicii Moldova. În: Buletinul AȘM. Științele vieții. 2013, Nr. 2(320), p. 87-93. ISSN 1857-064X.
 24. Erken S., Malyer H., Demirci F., Demirci B., Baser K. H. C. Chemical investigations on some *Hypericum* species growing in Turkey. In: Chemistry of Natural Compounds. 2001, 37, 5, p. 434-438. ISSN 1573-8388 (Online)
 25. Schwob I., Bessière J.-M., Viano J. Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France. In: Comptes Rendus. Biologies. 2002, 325, p. 781-785. ISSN 1631-0691.
 26. Sharopov F. S., Gulmurodov I. S., Setzer W. N. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum scabrum* L. growing wild in Tajikistan. In: Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2010, 2(6), p. 284-290. ISSN 0975-7384.
 27. Hajdari A., Mustafa B., Nabija D. et al. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. from wild population in Kosovo. In: Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2014, vol. 27, No.1, p. 51-54. ISSN 2300-6676 (Online).

ANIVERSĂRI

EUGEN DIUG - PROFESOR, SAVANT, PEDAGOG ȘI FARMACIST ILUSTRU LA CEI 50 ANI DE ACTIVITATE PROFESIONALĂ



„Un cap bun și o inimă bună sunt întotdeauna o formidabilă combinație”

(Nelson Mandela)

Domnul Profesor **Eugen Diug**, un nume notoriu în domeniul farmaceutic, doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar la Catedra de tehnologie a medicamentelor, reprezentant de elită al comunității științifice din Republica Moldova, înalt apreciat de colegii din țară și de peste hotare, personalitate a dedicat 50 de ani de activitate în cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Fiind mulți ani la conducerea Catedrei (1984-2020), a muncit și continuă să muncească cu multă dăruire de sine în procesul de educație și instruire a tinerilor specialiști, domeniu deloc ușor, acumulând și manifestând capacități manageriale de succes. Ca conducător iscusit, cu capacități profesionale și organizatorice de talie înaltă, DI Prof. Eugen Diug a acordat multă atenție și timp pentru perfecționarea, integrarea și specializarea procesului didactic la facultate și catedră, a valorificat potențialul fiecărui membru al colectivului în care fiecare să se simtă personalitate, iar rezultatele finale să fie valoroase pentru toți.

Fiind un om de știință remarcabil și un pedagog erudit, este mereu la curent cu toate performanțele din domeniul farmaceutic, cu noutățile de la disciplinele de profil, iar pe parcursul anilor desfășoară o activitate pedagogică și științifică rodnică.

Activitatea de cercetare științifică a Dlui Eugen Diug este axată pe elaborarea și cercetarea preparatelor medicamentoase noi, tot odată analiza și studiul formelor farmaceutice moderne- nanotehnologii, domeniu în care a obținut rezultate, publicate în reviste de prestigiu din

țară și de peste hotare. Astfel, profesorul fondează noi direcții științifice și didactice - biofarmacia și farmacocinetica, forme farmaceutice moderne, tehnologia produselor homeopate, pune bazele domeniului său, cu pregătirea cadrelor de farmaciști prin rezidențiat, masterat, doctorat și perfecționare. Autor a peste 100 de publicații științifice, 12 manuale și compendii, 16 brevete de invenție, 30 certificate de inovator, mai multe recomandări metodice pentru studenți, rezidenți și farmaciști practicieni. Participant activ al numeroaselor conferințe în domeniile științifice de interes, la nivel național și internațional, cu comunicări științifice prezentate la universități și centre de cercetare din diferite țări ale lumii, conducător a 11 teze de doctor în științe și consultant științific la o teză de doctor habilitat în științe farmaceutice.

Activitatea sa științifico-didactică este înalt apreciată, de către profesori și studenți, astfel bucurându-se de o prietenie și colegialitate impresionantă. Grație implicării Domniei sale, avem o bună colaborare cu colegii din Universitățile de Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș, Iași, Sibiu, Cluj-Napoca, Harkov, Kiev și alte orașe. Succesele în cercetare au adus la realizarea mai multor proiecte naționale inclusiv și a proiectului internațional bilateral Chișinău- Iași: „Sisteme nanotransportoare topice pe bază de silice mezoporoasă pentru terapia locală a cancerului cutanat” finalizat cu succes cu partenerii și colegii de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T.Popa” și Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași, România.

DI Prof. Eugen Diug este o persoană cu calități incon-

testabile de verticalitate, demnitate, corectitudine, perseverență, onestitate, modestie, ambiție, bunăvoință, cu dorință și dăruire față de muncă, este exigent față de sine și colegii săi, un dascăl atent și un prieten devotat, acest ansamblu de calități care îl desemnează ca personalitate.

Abilitățile științifice și profesionale pe care le îmbină profesorul Eugen Diug, stilul de muncă, devotamentul și profesionalismul rămân ca exemplu la baza activității discipolilor și a colegilor care îi continuă ideile în domeniul științific și didactic. Toți discipolii, prietenii și colegii care îl cunosc pe distinsul savant, pot cu convingere să pronunțe că acesta își dedică toate cunoștințele și abilitățile intelectuale în numele prosperării științei farmaceutice.

Tot ce a realizat pe parcursul a celor 50 de ani de activitate și tot ce continuă să realizeze azi profesorul Eugen Diug se datorează doar insistenței, pasiunii, dragostei față de oameni, de muncă, de natură și de tot ce este frumos în viață.

Stimate domnule Profesor, la acest frumos popas aniversar de activitate, suntem onorați să Vă transmitem cele mai sincere urări de sănătate, mai mult ca niciodată valabile în această perioadă pandemică, pace în suflet și armonie, bucurie și fericire alături de cei dragi, dorindu-Vă, totodată, vigoare și perseverență pentru multe realizări notorii atât de importante în domeniul farmaciei!

La Mulți Ani de activitate prodigioasă, Domnule Profesor EUGEN DIUG!

Cu gratitudine, respect și admirație Colectivul Catedrei de tehnologie a medicamentelor:

Nicolae Ciobanu, dr., conf. univ., Diana Guranda,

dr., conf. univ., Alexandru Znașcovan, dr., conf. univ., Tamara Polișciuc,

dr., conf. univ., Cristina Ciobanu, dr., conf. univ., Rodica Solonari, dr., Mihail Anton, asist. univ.



GHID PENTRU AUTORI**1. Tipurile de manuscrise**

Revista Farmaceutică a Moldovei publică manuscrise recenzate din orice domeniu al farmaciei. Volumul lucrărilor nu trebuie să depășească 10 pagini. Numărul figurilor nu trebuie să fie mai mare de 9 și numărul referințelor nu mai mare de 50. Manuscrisele vor fi recenzate de referenți anonimi. Autorii pot să sugereze numele recenzentului, dar alegerea va rămâne prerogativa redacției.

2. Prezentarea manuscrisului

Articolele originale trebuie să conțină cercetări noi (originale), rezultatele cărora contribuie la acumularea de noi cunoștințe în domeniul publicat și cu condiția că rezultatele prezentate nu au mai fost publicate înainte sau nu sunt depuse, în paralel, la o altă revistă, în vederea publicării.

3. Structura manuscrisului

Manuscrisele trebuie să fie prezentate doar în formă electronică, în limba română sau engleză pe numele:

- redactorului șef Vladimir Safta, dr. hab., prof., catedra Farmacia Socială "Vasile Procopișin", Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, la e-mail: vladimir.safta@usmf.md
- secretarului Cheptanari-Bîrtă Nicoleta la e-mail: nicoleta.cheptanari@usmf.md;
- tel. 022 205 434, 088205 432

Manuscrisele vor fi însoțite de o scrisoare din numele autorului, responsabil pentru corespondență. Scrisoarea va conține afirmația, că toți autorii sunt de acord cu conținutul și că materialele date nu s-au publicat anterior.

4. Formatul Fișierelor

Se acceptă următoarele formate de text pentru manuscrisul principal: Microsoft Word (2003, 2007, 2010, 2011, 2013, 2019, 2021), ".doc", ".docx" și următoarele formate pentru imagini: ".jpeg", ".tiff".

5. Structura manuscrisului

Caracterele folosite vor corespunde următoarelor cerințe: Times New Roman, mărimea 12 la 1,5 intervale și cu marginile 2 cm pe toate laturile. Manuscrisul trebuie să conțină următoarele compartimente:

TITLUL (ROMÂNĂ). Formulată laconic, relevant pentru conținutul manuscrisului, să reflecte tipul (design-ul) studiului și să nu depășească 25 de cuvinte. Nu se admit prezența abrevierilor în titlu.

TITLUL (ENGLEZĂ)**Numele și prenumele complete ale autorilor**

Instituția reprezentată

Autorul corespondent: nume.prenume@email.com

Rezumat. Se va prezenta obligatoriu în limbile română și engleză. Trebuie să ofere un sumar concis al scopului, obiectivelor, rezultatelor semnificative și concluziilor studiului, în limitele la 350 de cuvinte.

Cuvinte cheie. Se vor prezenta obligatoriu în limbile română și engleză. Se enumeră 5-7 cuvinte cheie, care sunt reprezentative pentru conținutul articolului. Pentru a ușura găsirea articolului Dvs. de către motoarele de căutare ale bazelor de date, folosiți termeni recomandați din lista de titluri cu subiect medical de pe <https://www.nlm.nih.gov/>

Introducere. Trebuie să ofere informații care să definească actualitatea problemei abordate și să explice de ce aceasta este importantă

Materiale și metode. Trebuie să fie descrise procedurile și metodele aplicate. Aici se vor menționa protocoalele detaliate privind metodele utilizate precum și informații justificative. Se vor include: design-ul studiului, descrierea participanților și materialelor implicate, descrierea clară a tuturor intervențiilor și comparațiilor efectuate, precum și testele statistice aplicate. Se vor specifica denumirile generice de medicamente.

Rezultate și discuții. Autorii trebuie să prezinte rezultate exacte, clar formulate și explicate. Se va descrie impactul, relevanța și semnificația rezultatelor obținute. La necesitate se vor formula potențiale direcții viitoare de cercetare.

Concluzii. Această secțiune trebuie să concludă laconic întregul studiu. În concluzii nu se vor oferi informații noi și nu se vor repeta cele prezentate în secțiunea „Rezultate”.

Referințe. Vor fi scrise și vor fi numerotate în ordinea referinței în text. Stilul și punctuația referințelor vor corespunde reglementărilor (standardelor) naționale de perfectare a referințelor.

Tabelele. Enumerarea tabelelor va fi consecutivă, cu cifre arabe, în ordinea primei lor citări în text, scris cu caractere grase (bold), alinierea – pe stânga, deasupra tabelului.

Tabel 1. Denumirea tabelului

Legendele și notele explicative vor fi făcute sub Tabel.

Figurile. Figurile vor fi prezentate atât în manuscris, cât și în fișiere separate. În manuscris, figurile vor fi numerotate consecutiv, cu cifre arabe, în ordinea citării lor în text. Numerotarea va fi scrisă abreviat (Figura 1), cu caractere grase (bold), alinierea – pe stânga, sub figură.

Figura 1. Denumirea figurii

GUIDE FOR AUTHORS

1. Types of manuscripts

The Pharmaceutical Journal of Moldova publishes the reviewed manuscripts in any field related to pharmacy. Manuscripts should not exceed 10 pages. The total number of figures should exceed 9 and the number of references should not exceed 50. Manuscripts will be reviewed by an anonymous independent referee. Authors may suggest name of expert reviewer, but selection remains the prerogative of the Editors.

2. Criteria for publication

Original articles should contain new (original) results, which bring new knowledge in the field. The submitted manuscripts should contain data unpublished before and not submitted in parallel for publication to another journal.

3. The structure of the manuscript

Manuscripts must be submitted only in electronic form in Romanian or English. The manuscripts should be sent to:

- Editor-in-Chief Vladimir Safta, Pharm. D, PhD, department of Social Pharmacy "Vasile Procopisin", State Medical and Pharmaceutical University „Nicolae Testemițanu”,
- e-mail: vladimir.safta@usmf.md
- Secretary Cheptanari-Bîrtă Nicoleta, e-mail: nicoleta.cheptanari@usmf.md;
- tel. 022 205 434, 088205 432

Manuscripts must be accompanied by a covering letter from the corresponding author. The letter should contain a statement that the manuscript has been seen and approved by all authors and the material is previously unpublished.

4. Files format

The following file formats for manuscript text are accepted: Microsoft Word (2003, 2007, 2010, 2011, 2013, 2019, 2021), ".doc", ".docx". Pictures should be submitted in one of the following formats: ".jpeg", "... tiff".

5. Organisation of manuscript

The used font: 12 pt Times New Roman, 1,5 line spacing, with 2 cm margins all around. The manuscript should comprise the following sections:

TITLE (ROMANIAN). Formulated succinctly, relevant to the content of the manuscript, reflecting the type (design) of the study and not exceeding 25 words. The presence of abbreviations in the title is not allowed.

TITLE (ENGLISH)

Name and surname of authors

Represented institution

Corresponding author: name.surname@email.com

Abstract. It must be presented in Romanian and English. The abstract should provide a concise summary of the purpose, objectives, significant results and conclusions of the study. The summary text should not exceed 350 words.

Keywords. They must be presented in Romanian and English. List 5-7 keywords that are representative for the contents of the article. To make it easier for database search engines to find your article, use recommended terms from the list of medical titles on <https://www.nlm.nih.gov/>

Introduction. Introduction - should provide information that would define the actuality of the addressed problem and explain why it is important.

Materials and methods. The procedures and methods applied must be described. Detailed protocols on the methods used as well as supporting information will be mentioned here. It will include: the design of the study, the description of the participants and the materials involved, the clear description of all the interventions and comparisons performed, as well as the applied statistical tests. Generic drug names will be specified.

Results and discussions. Authors must present results in a clear and accurate manner and describe the impact, relevance and significance of the obtained results for the field. If necessary, it could be draw potential future research directions.

Conclusions. This section should laconically include the entire study. In the conclusions, no new information will be provided and those presented in the „Results” section will not be repeated.

References. They will be written and numbered in the order of reference in the text. The style and punctuation of the references will correspond to the national regulations (standards) of writing references.

Tables. Tables numbering will be done using consecutive Arabic numerals in the order of their first citation in the text; it should be written in bold, align to left and place above the table.

Table 1. Table name

Legends and notes will be place under the table.

Figures. Figures will be included in the main manuscript, and also submitted as separate files. The manuscript figures should be numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their citation in the text. Figure numbering will be written abbreviated (Figure 1), using bold fonts, left alignment, and placed under the figure.

Figure 1. Figures name

