

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ A BANATULUI TIMIȘOARA**

Facultatea de Horticultură și Silvicultură

S I N T E Z A
raportului

Temei de cercetare ID_731

Nr. 409 / 31.10.2008

Titlul :

**INDUCEREA VARIABILITATII SOMATICE LA
DIFERITE PLANTE MEDICINALE IN SCOPUL
IMBUNATATIRII PROPRIETATILOR
TERAPEUTICE (HIPOGLICEMIANTE,
BACTERICIDE, ANTIVIRALE, ETC.) ALE
ACESTORA**

Etapa unică 2009

Director : Prof.univ.dr. Botau Dorica

C U P R I N S

1. Rezultate privind evaluarea stabilitatii potentialului biosintetic al liniilor celulare selecționate și al plantelor regenerate. Caracterizarea moleculara a acestora.
2. Obținerea preparatelor farmaceutice
3. Testarea preparatelor farmaceutice pe animale de laborator

1. Rezultate privind evaluarea stabilitatii potentialului biosintetic al liniilor celulare selectionate și al plantelor regenerare. Caracterizarea moleculara a acestora

Evaluarea prin metode biochimice a potentialului biosintetic la unele specii de plante cu acțiune hipoglicemiantă

Cercetările noastre au avut ca obiectiv determinarea conținutului în clorofilă „a”, clorofilă „b” și compuși carotenoidici din diferite țesuturi ale unor specii de plante cu acțiune hipoglicemiantă: *Momordica charantia* (castravete amar) și *Vaccinium myrtillus* (afin) cultivate *in vitro*, sub influența unor balanțe hormonale specifice și *in vivo*, sub influența tratamentului biodinamic. Regulatorii de creștere și tipul de mediu determină sporirea conținutului de substanțe active în calusurile de afin și castravete amar. Asocierea metodei regenerative cu tratamentul biodinamic la castravetele amar poate deveni o cale de îmbunătățire a conținutului de substanțe biologic active în plantă.

Rezultate și discuții

1. Influența fitohormonilor și a mediului asupra conținutului de clorofilă a, b și compuși carotenoidici din calus

Rezultatele experimentale privind cultura de calus la speciile luate în studiu arată că balanța hormonală și tipul de mediu folosite influențează conținutul de substanțe biologic active la nivelul țesutului nediferențiat (tabelele 1 și 2).

Se observă că cele mai bune rezultate privind compușii carotenoidici se înregistrează la calusul de afin cultivat pe mediul Anderson, în prezența combinației hormonale 1,5ANA+1,5BAP (63,381 mg/100g țesut).

Calusul de *Momordica charantia* acumulează cantități mai mari de compuși cu importanță biologică în condițiile cultivării pe mediul solid și respectiv în suspensie celulară. Regulatorii de creștere care determină cea mai bună capacitate biosintetică sunt auxina ANA (1,5 mg/l) în combinație cu citochinina BAP (0,5 mg/l).

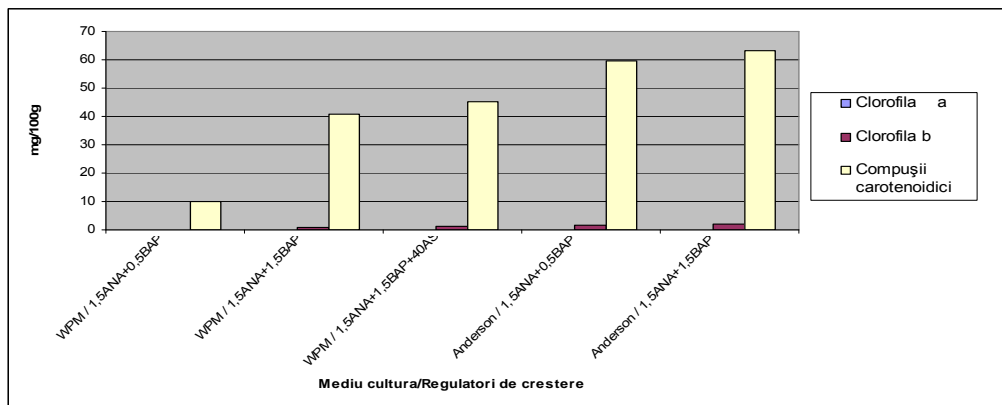


Fig. 1.1. Influența mediului și balanței hormonale asupra conținutului de clorofilă a, b și compuși carotenoidici în calusul de *Vaccinium myrtillus*

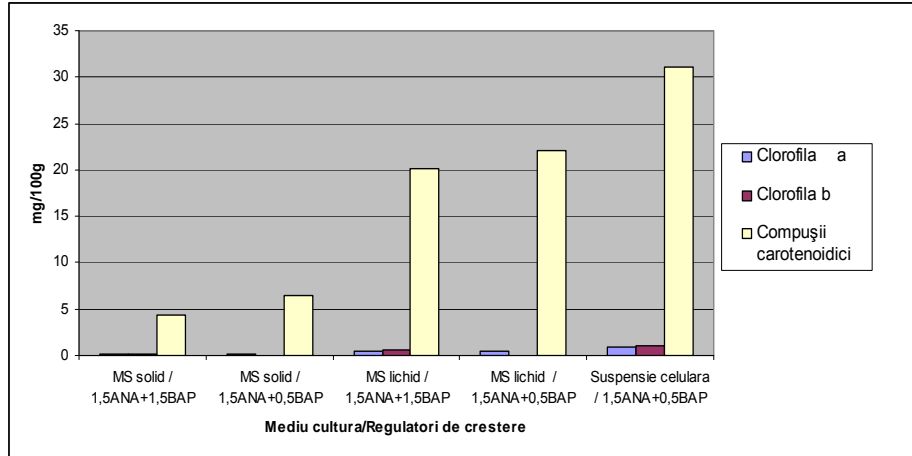


Fig. 1.2. Influența mediului și balanței hormonale asupra conținutului de clorofilă a, b și compuși carotenoidici în calusul de *Momordica charantia*

2. Influența regenerării *in vitro* și a tratamentului biodinamic asupra conținutului de clorofilă a, b și compuși carotenoidici la *Momordica charantia*

Regenerarea *in vitro* și tratamentul biodinamic influențează conținutul de clorofilă a, b și compuși carotenoidici la *Momordica charantia* cultivată în câmp (tabelul 3)

Se observă că cele mai ridicate valori privind conținutul de clorofilă și compuși carotenoidici s-au înregistrat la lăstarii plantelor regenerare *in vitro* (generația R₁), tratate biodinamic. Chiar dacă valorile privind conținutul de clorofilă și compuși carotenoidici la fructele și semințele tratate biodinamic sunt semnificativ reduse, totuși importanța tratamentului biodinamic nu poate fi neglijată.

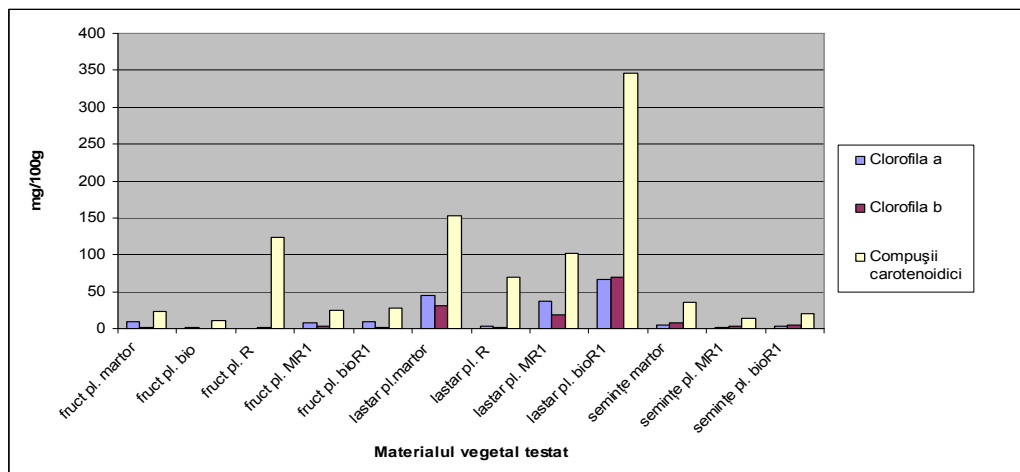


Fig. 1.3. Influența tratamentului biodinamic și a culturii *in vitro* asupra conținutului de clorofilă a, b și compuși carotenoidici la *Momordica charantia*

Prin utilizarea tratamentului biodinamic se induce creșterea conținutului în principii active, atât în lăstari tineri cât și în fructe și semințe. Conținutul preparatului biodinamic aduce un important aport de nutrienți minerali și organici specifici, care determină o biosinteză activă și sporirea conținutului de substanțe biologice active.

Intr-o anumită măsură, se înregistrează o creștere a conținutului de principii active și la plantele regenerare *in vitro*.

Concluzii

1. Regulatorii de creștere și tipul de mediu influențează biosinteza principiilor biologic active în calusul de *Vaccinium myrtillus* și *Momordica charantia*.
2. Tratamentul biodinamic influențează pozitiv biosinteza principiilor biologic active, determinând o creștere semnificativă a conținutului de clorofilă a, b și compuși carotenoidici în plantele de *Momordica charantia*.
3. Asocierea metodei regenerative cu tratamentul biodinamic la castravetele amar poate deveni o cale de îmbunătățire a conținutului de substanțe active în plantă.

Evaluarea variabilității indusă prin cultura *in vitro* la *Momordica charantia*, folosind markerii RAPD

Scopul cercetărilor a fost creșterea calusului la *Momordica charantia* L., în subcultură pe mediul Murashige-Skoog, sub influența a două combinații de fitohormoni: AIA+Kin și BA+Kin, în vederea selecției unor linii celulare cu un conținut ridicat de antioxidanți. Analiza capacității antioxidante totale (TAC) și a conținutului total în fenoli arată că liniile celulare selectate prezintă un conținut variat de antioxidanți și fenoli, datorită condițiilor de cultură. Testele folosind markerii RAPD demonstrează inducerea unei variații somatice la nivelul țesutului nediferențiat.

Resultate și discuții

Explantate au fost inoculate pe mediu specific și s-a urmărit creșterea lor. După 30 zile, procentul de creștere a fost determinat prin raportul între greutatea finală și inițială a calusului. Apoi, s-a determinat capacitatea antioxidantă (TAC) și conținutul de polifenoli (Tabelul 2.1).

Din rezultatele obținute se observă că procentul de creștere al calusului a fost superior în cazul asocierii fitohormonilor BA + Kin în comparație cu AIA + Kin.

Cea mai ridicată capacitate antioxidantă (TAC) valoare a polifenolilor a fost identificată la liniile celulare cultivate pe mediul suplimentat cu AIA + Kin.

Pentru analizele moleculare s-a utilizat metoda polimorfismului ADN amplificat la întâmplare (random amplified polymorphic DNA - RAPD) deoarece aceasta este utilizată pentru studierea diversității genetice, datorită simplității, vitezei și costului relativ scăzut în comparație cu alți markeri moleculari.

Am selectat 29 primeri decamerici care au fost găsiți ca fiind polimorfici în studiile de diversitate genetică (2).

Pentru identificarea primerilor cu cea mai bună amplificare, una din probele ADN a fost amplificată cu toți cei 29 RAPD primeri. În urma acestei amplificări s-a constatat că primerii OPW 02: 5'-ACCCGCAA-3', OPW 11: 5'-CTGATGCGTG-3', OPW 13: 5'-CACAGCGACA-3', OPW 18: 5'-TTCAGGGCAC-3', OPX 01: 5'-CTGGGCACGA-3', OPX 03: 5'-TGGCGCAGTG-3' generează un mare număr de fragmente. Acești primeri au fost folosiți ulterior pentru a amplifica toate probele ADN.

Prođușii de amplificare au fost analizați folosind metoda electroforezei în gel de agaroză 2 % (Fig. 1).

Cele mai bune rezultate au fost obținute cu markerii OPW 18, OPW 13 and OPW 02. Analiza benzilor ADN produse cu acești primeri a arătat că liniile celulare 5 și 6 diferă de celelalte. Aceste linii au de asemenea o înaltă capacitate antioxidantă (TAC) și un conținut polfenolic ridicat.

Liniile celulare 5 și 6, cultivate pe mediul cu AIA +Kin sunt valoroase datorită conținutului lor ridicat în substanțe biologic active ratei de creștere ridicate.

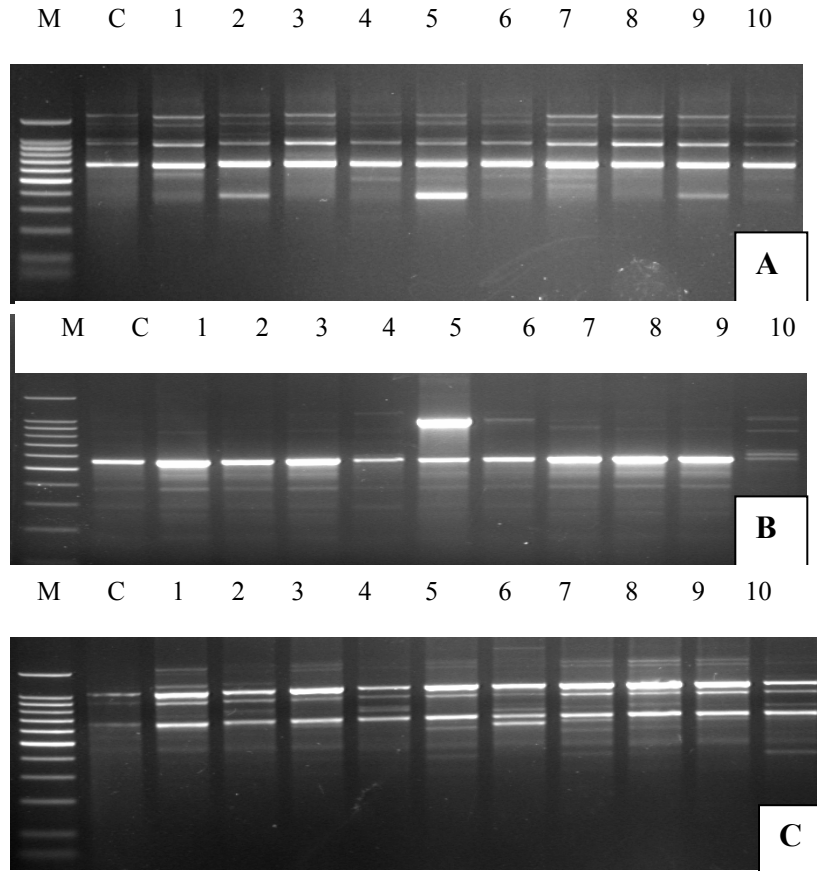


Fig. 2.1

3) and OPW 02

M – molecular marker (DNA ladder), **C** – **control** (DNA extracted from leaf of mother plant),
1 - Callus / AIA+Kin; **2** –Callus / BA+Kin; **3**- Callus / AIA+Kin; **4** -Callus / AIA+Kin; **5** -Callus / AIA+Kin; **6**- Callus / AIA+Kin; **7** - Callus / BA+Kin; **8**- Callus / BA+Kin; **9** - Callus / BA+Kin; **10** - Callus / BA+Kin

Concluzii

Experimentele *in vitro* demonstrează inducerea variabilității la nivelul țesutului nediferențiat, prin folosirea anumitor combinații hormonale. Chiar dacă combinația auxinei AIA cu citochinina Kin determină o creștere moderată a calusului , ea are o influență pozitivă asupra capacității antioxidante și a sintezei polifenolilor în calusul de *Momordica charantia*.. Asocierea ciochininelor BA+Kin a determinat o bună creștere a calusului și sinteză de polifenoli, dar capacitatea antioxidantă a fost scăzută.

În urma acestor experimente, au fost selectate două linii celulare cu înaltă capacitate antioxidantă și conținut ridicat de polifenoli si acestea au fost caracterizate la

nivel molecular folosind markeri RAPD. Aceste linii vor fi în viitor folosite pentru producerea substanțelor biologice active.

Identificarea unor fracții proteice hipoglicemice în sucule celular al fructelor de *Momordica charantia* L.

Conținutul în substanțe cu proprietăți terapeutice face din castravetele amar o plantă utilizată în tratamentul multor boli, cum sunt tumorile, febra, infecțiile bacteriene și virale, diabetul, hipertensiunea, etc. Toate părțile plantei sunt bogate în aceste substanțe. Dintre substanțele cu efect terapeutic, care fac obiectul prezentei lucrări, de mare interes pentru tratamentul diabetului sunt fracțiile proteice: polipeptida- p și peptida MC6 prezente în fructe. Separarea fracțiilor proteice și identificarea lor s-a realizat prin electroforeză în gel de poliacrilamidă.

Pentru aprecierea greutateii moleculare a fracțiilor proteice din sucule de *Momordica charantia*, s-a trasat curba de calibrare pe baza calculului $R_f \log MW$ pentru markerii proteici.

Pentru a identifica polipeptida-p și peptida MC6, am stabilit zona care le include și apoi am creat profilul densității prin scanare și analiză cu un soft special (UN-SCAN-IT gel).

Resultate și discuții

Fracțiile proteice conținute în trei probe au reprezentat materialul folosit pentru realizarea diagramei corespunzătoare dispunerii benzilor aferente fracțiilor proteice S-au identificat 16 fracții proteice, notate F1, F2, ...F16. Markerii proteici conțineau 8 benzi pentru MW 880 și respectiv 5 benzi pentru MW 494 (M1, M2,...M10).

Pentru aprecierea greutateii moleculare, s-a măsurat distanța de migrare de la startul fiecărei fracții proteice, atât pentru proba de suc cât și pentru markerii MW. Apoi s-a calculat R_f ca raport al distanței de migrare de la start până la tamponul de migrare. Conform datelor prezentate în tabelul 1.6:

Greutatea moleculară a fracțiilor proteice conținute în probele de suc s-a stabilit folosind ecuația: $y = -1,717x + 5,4601$ și prin măsurarea distanței de migrare pentru fiecare bandă în parte (tabelul 1.7).

Tabelul 1.7

Resultate privind greutatea moleculara a fracțiilor proteice din sucule fructelor de *Momordica charantia*

| Fracția proteică | Distanța de migrare de la start (mm) | Migrarea tamponului (mm) | R_f | Log MW | Greutatea moleculară (dal) |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------|--------|----------------------------|
| F1 | 8,3 | 60 | 0,138 | 5,223 | 166948 |
| F2 | 11,2 | 60 | 0,187 | 5,140 | 137909 |
| F3 | 13,2 | 60 | 0,220 | 5,082 | 120882 |
| F4 | 17,9 | 60 | 0,298 | 4,948 | 88687 |
| F5 | 21,5 | 60 | 0,358 | 4,845 | 69959 |
| F6 | 26,1 | 60 | 0,435 | 4,713 | 51666 |
| F7 | 28,1 | 60 | 0,468 | 4,656 | 45287 |
| F8 | 33 | 60 | 0,550 | 4,516 | 32791 |

| | | | | | |
|-----|------|----|-------|-------|-------|
| F9 | 35,9 | 60 | 0,598 | 4,433 | 27087 |
| F10 | 38,1 | 60 | 0,635 | 4,370 | 23432 |
| F11 | 40,3 | 60 | 0,672 | 4,307 | 20270 |
| F12 | 43,9 | 60 | 0,732 | 4,204 | 15989 |
| F13 | 47 | 60 | 0,783 | 4,115 | 13035 |
| F14 | 48,1 | 60 | 0,802 | 4,084 | 12124 |
| F15 | 49,1 | 60 | 0,818 | 4,055 | 11351 |
| F16 | 51,1 | 60 | 0,852 | 3,998 | 9949 |

Fracțiile F8, F6, F5 și F7 corespunzând greutateii moleculare de aproximativ 33 kdal, 52kdal, 70kdal și 45 kdal, au fost predominante. Zona de interes, care cuprinde polipeptida-p și peptida MC6 este reprezentată de fracțiile F13 - F16. Scanarea acestei zone cu ajutorul UN-SCAN-IT gel softwarw indică un profil specific al densității pentru fracțiile F13, F14, F15 și F16.

Concluzii

S-au identificat fracțiile F15 și F16 ca fiind corespunzătoare polipeptidei-p și peptidei MC6, cu o greutate moleculară de 11300dal și 9900 dal

2. Obținerea preparatelor farmaceutice

S-au obținut preparate farmaceutice din mugurii plantelor regenerate *in vitro*, precum și din țesuturile nediferențiate (calusuri) selecționate pentru capacitate proliferativă și conținut în principii biologice active. Aceste preparate fac obiectul a doua cereri de brevet de invenție, înregistrate la OSIM.

3. Testarea preparatelor farmaceutice pe animale de laborator

Scopul cercetărilor a fost : stabilirea protocolului de lucru pentru testarea efectului hipoglicemiant al unor extracte din *Momordica charantia* (castravete amar), la animale cu diabet provocat.

Obiectivele urmărite au fost următoarele:

- stabilirea speciilor de animale ca modele experimentale;
- provocarea diabetului prin distrugerea celulelor beta din insulele Langerhans cu aloxan, stabilirea dozelor de aloxan și a intervalurilor de administrare;
- testarea efectului hipoglicemiant al extractului din rădăcină de din *Momordica charantia* în diferite doze la iepuri diabetici.

Rezultate si discuții

1. Valorile masei corporale medii și ale glicemiei la purceii sănătoși sunt prezentate în tabelul 3.2. Se observă o variație a glicemiei între 61,55 și 103,7 mg %.
2. Efectul extractului de rădăcină de *Momordica charantia* la iepuri cu diabet provocat cu aloxan (tabelul 3.3).

S-a constatat că solventul de extracție nu afectează valoarea glicemiei la iepuri normoglicemici. La doza de 2 ml extract de rădăcină de *Momordica charantia* (E₁), la 2,5 ore de la administrare a crescut glicemia cu 20,89 %, după care a scăzut treptat la 101,26 % față de valoarea inițială, după 10 ore. O astfel de curbă a glicemiei a fost obținută și de alți autori la doze mici de extract, dar glicemia a scăzut sub valoarea de la timpul zero.

La experimentul 2 (4 ml extract) glicemia a scăzut continuu, sub valoarea de start, până la 5% după 10 ore de la administrare.

La experimentul 3 (6 ml extract) glicemia a scăzut treptat cu până la 16% după 10 ore de la administrare.

Tabelul 3.3

Efectul extractului de rădăcină de *Momordica charantia* la iepuri cu diabet provocat cu aloxan

| Specificare | Doza | UM | Interval de timp (ore) | | | | |
|--------------|------------------------|------|------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | | 0 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 |
| Martor | 4 ml solvent extracție | mg % | 106 | 100 | 109 | 107 | 101 |
| | | % | 100 | 94,34 | 102,83 | 100,94 | 95,28 |
| Experiment 1 | 2 ml extract | mg % | 158 | 191 | 170 | 163 | 160 |
| | | % | 100 | 120,89 | 107,59 | 103,16 | 101,26 |
| Experiment 2 | 4 ml extract | mg % | 382 | 369 | 364 | 171 | 363 |
| | | % | 100 | 96,60 | 95,29 | 97,12 | 95,03 |
| Experiment 3 | 6 ml extract | mg % | 452 | 432 | 407 | 392 | 380 |
| | | % | 100 | 95,57 | 90,04 | 86,72 | 84,07 |

Concluzii

S-a constatat că extractul de rădăcină de *Momordica charantia* are efect hipoglicemiant proporțional cu doza.

Rezultatele obținute sugerează diluția mare a drogului hipoglicemiant în produsul de extracție, impunând concentrarea lui în extractele ce vor fi testate pentru certificarea efectului hipoglicemiant la animalele cu diabet provocat experimental cu aloxan.

Director proiect,
Prof.dr. Botău Dorica

ANEXA



Iepuri diabetici tratați cu preparate gemoterapice



Preparate gemoterapice



Calus de afin cu antociani



Compoziții medicamentoase din calusuri



Suspensie celulară de brusture



Cultura de *Momordica charantia* 2009



Calus de brusture



Simpozion Opatija, Croatia