

**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 / 1.10.2007**

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

**Etapă finală 2010**

**Director : Prof.univ.dr. Botau Dorica**

# Evaluarea produselor obtinute

## 1. Testarea preparatelor farmaceutice pe animale de laborator

Efectul hipoglicemiant al semințelor de *Momordica charantia*, plante obținute *in vitro* și cultivate în câmp precum și a calusului de *M. charantia*, care reprezintă materia primă folosită în obținerea preparatelor farmaceutice propuse pentru brevetare la O.S.I.M., a fost testat la iepuri sănătoși, diabetici și „recuperați aloxic” (AR).

### Testarea glicemiei la iepurii sănătoși

Tratamentul cu semințe de *M. charantia* nu a relevat scăderi semnificative ale glicemiei la diferiți timpi de măsurare comparativ cu glicemia de la timpul zero. Aceasta ar putea releva faptul că *M. charantia* elimină fluctuațiile glicemiei în condiții de post alimentar, respectiv o uniformizare a utilizării glucozei la nivel tisular prin favorizarea acțiunii insulinei sau schimbarea secreției de insulină. Certitudinea mecanismului de acțiune s-ar obține prin dozarea simultană cu glicemia nivelului seric de insulină.

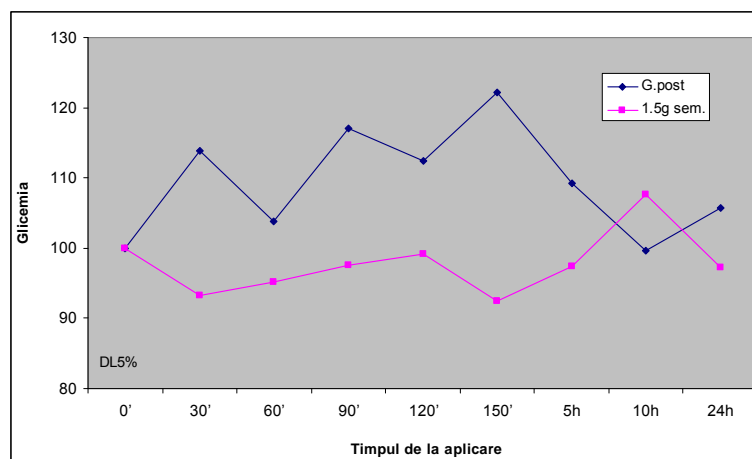


Fig. 1. Reprezentarea grafică a efectului variantelor experimentale și timpului scurs de la aplicarea tratamentului, asupra glicemiei la iepuri sănătoși

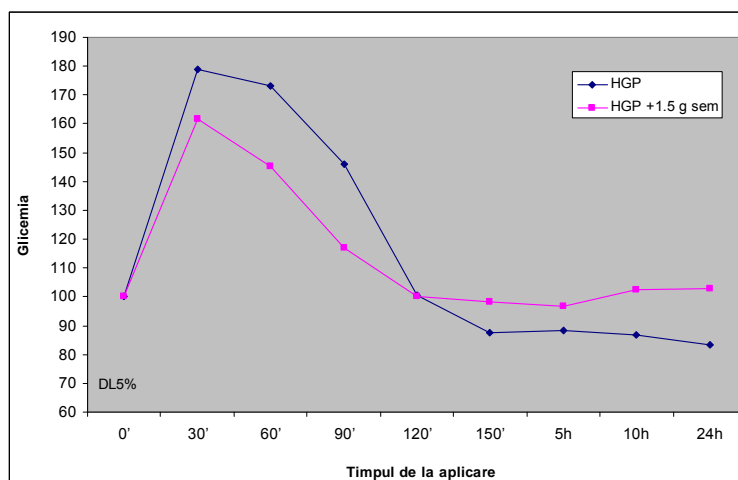


Fig 2. Reprezentarea grafică a efectului variantelor experimentale și timpului scurs de la aplicarea tratamentului, asupra glicemiei la iepuri sănătoși

Tratamentul cu extract apos din semințe de *M. charantia* a determinat pe fond de hiperglicemie provocată, creșterea semnificativă a glicemiei la 30' ( $p < 0,01$ ) și la 60 minute de la

administrare ( $p < 0,05$ ) comparativ cu glicemia de la timpul zero. Prin scurtarea picului de glucoză cu 30 minute și valori ale picului mai mici decât la hiperglicemia provocată de post se relevă acțiunea hipoglicemiantă a extractului apos din semințele de *M. chatanthia*.

### Testarea glicemiei la iepurii recuperați aloxanic (AR)

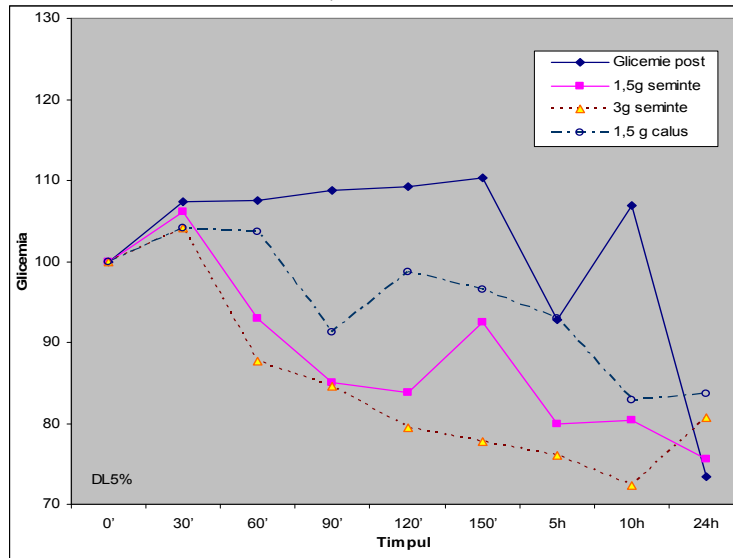


Fig 3. Reprezentarea grafică a efectului variantelor experimentale și timpului scurs de la aplicarea tratamentului, asupra glicemiei la iepurii recuperați aloxanic

Evoluția glicemiei în timp arată că la iepurii cu inaniția de 12 ore prezintă diferențe semnificative ale glicemiei doar după 24 ore de măsurători ( $p < 0,01$ ).

La 1,5 S comparativ cu glicemia la timpul zero s-a observat scăderea semnificativă statistic la 120'; 5 ore; 10 ore și 24 ore, iar la 3 S glicemia scade semnificativ statistic după 90' de la administrare. Se susține efectul hipoglicemiant al semințelor de *M. charanthia*; proporțional cu doza, la 3 g/kg corp, efectul hipoglicemiant semnificativ statistic manifestându-se la un timp mai scurt de la administrare.

La 1,5g extract apos de calus de *M. charanthia* efectul hipoglicemiant semnificativ statistic s-a observat la 10 ore de la administrare.

### 3. Măsurătorile glicemiei la iepurii diabetici.

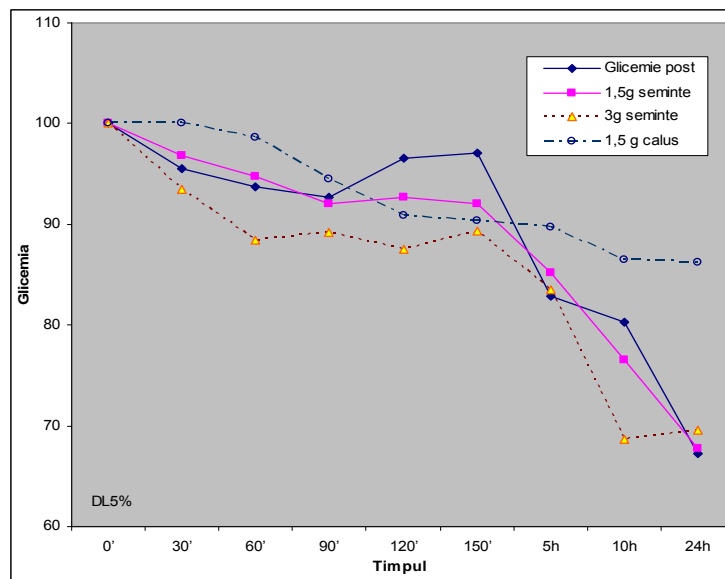


Fig. 4. Reprezentarea grafică a efectului variantelor experimentale și timpului scurs de la aplicarea tratamentului, asupra glicemiei la iepuri diabetici

Variațiile în timp ale glicemiei pe variante experimentale au relevat scăderea glicemiei semnificativ statistic față de timpul zero doar la 24 de ore de măsurători la varianta GP; 1,5 S și 1,5 C, generată cu siguranță de inaniția timp de 36 ore; la 3 S, scăderea semnificativă statistic a glicemiei s-a obținut la 10 ore după administrarea de extract apos de semințe de *M. charanthia*.

#### 4. Glucozuria

Datele obținute din măsurătorile volumului de urină și cantitatea de glucoză prezentă în urină pe intervale de timp de 24 ore la iepuri sănătoși, recuperați aloxanic și diabetici în condiție de post și tratați cu extract apos din semințe de *M. charanthia* 2g semințe/kg corp sunt prezentate în tabelul 25.

Tabelul 25

Volumul de urină și concentrația glucozei în urina iepurilor sănătoși, recuperați aloxanic și diabetici în condiție de post de 24 ore și tratați cu extract apos din semințe de *M. charanthia* (2 g/kg corp)

Specificare		Glicemia (mg %) la t = 0	Volumul de urină (ml)	Concentrația glucozei în probele de urină (mg %)	Cantitatea de glucoză ..... (mg)	Concentrația medie de glucoză în urină (mg %)	%
Iepuri sănătoși	post	116	69	16,84	11,62	16,84	100
	M. ch.	117	25	22,42	5,60	22,42	133,13
Iepuri recuperați aloxanic	post	171	36	125,72	45,26		
			8	376,72	30,14		
			44		75,40	171,36	100
	M. ch.	155	33	221,07	72,95	221,07	129,01
Iepuri diabetici	post	539	15	5005,64	750,85		
			65	2122,21	1273,33		
			75		2024,18	2698,91	100
			67	5092,05	3411,67		
	M. ch.	494	50	1279,79	639,89		111,61
			21	504,17	105,87		
			138		4157	3012,32	

Din datele obținute s-a constatat că nivelul de glucoză în urină crește cu creșterea glicemiei la iepurii sănătoși, recuperați aloxanic și diabetici. Tratamentul cu extract apos din semințe de *M. charanthia* la cele trei categorii de iepuri determină creșterea excreției de glucoză cu 33,13%; 29,01% și respectiv cu 11,61% la iepurii sănătoși, recuperați aloxanic și diabetici.

Întrucât capacitatea hipoglicemiantă a unui produs antidiabetic se măsoară prin reducerea cantității de glucoză în urină, în cazul extractului apos din semințe de *M. charanthia* s-a obținut efectul invers de creștere a excreției de glucoză, ceea ce atrage atenția asupra mecanismului de acțiune hipoglicemiantă a produsului.

În general, diferitele fracțiuni hipoglicemiante din *M. charanthia* acționează prin reducerea absorbției de glucoză în intestin sau prin creșterea utilizării tisulare a glucozei ca urmare a stimulării producției de insulină sau a permeabilizării membranelor celulare la glucoză. Nu s-a relevat până în prezent ca mecanism hipoglicemiant creșterea glucozuriei.

#### 5. Examenul histopatologic al pancreasului endocrin

- La iepurii sănătoși administrarea de extras apos din semințe de *M. charanthia* în doză de 1,5g/kg corp a determinat scăderea semnificativă a glicemiei ( $p < 0,01$ ) la 30 minute și 150' de la

administrare și respectiv la 90 minute; 120 minute și 5 ore ( $p < 0,05$ ), comparativ cu glicemia de post la aceleași intervale de timp.

- Pe fond de hiperglicemie provocată la iepuri sănătoși doza de 1,5g/kg corp semințe de *M. charanthia* a determinat reducerea duratei picului de glucoză de la 90 minute la 60 minute.

## CONCLUZII

- La iepurii recuperați aloxanic (AR) tratați cu 1,5g/kg corp (1,5 S) și 3g/kg corp semințe de *M. charanthia* (3 S) valoarea procentuală a glicemiei medii pe 24 ore a fost semnificativ statistic mai mică ( $p < 0,05$ ) comparative cu glicemia de post; între 1,5 S și 3 S nu au fost diferențe semnificative statistic.

Tratamentul cu 1,5g extract apos de calus de *M. charanthia* (1,5 C) nu a avut efect semnificativ statistic asupra valorii procentuale a glicemiei medii pe 24 ore; între 1,5 S, 3 S și 1,5 C de asemenea nu au fost diferențe semnificative statistic ale valorilor procentuale ale glicemiei medii pe 24 ore.

- Efectul hipoglicemiant semnificativ statistic ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) a fost observat la iepurii AR între 60 minute și 10 ore de la administrarea extractului apos din semințe de *M. charanthia* atât la doza de 1,5g/kg corp cât și la 3g/kg corp comparativ cu glicemia de post.

- La 1,5g calus de *M. charanthia* efectul hipoglicemiant semnificativ statistic a putut fi observat la 90' ; 120' ; 150' și 10 ore de la administrare ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ );

Efectul hipoglicemiant cel mai mare s-a obținut la 10 ore de la administrarea de calus, efect comparabil cu cel indus de semințele de *M. charanthia* la doze de 1,5g/kg corp și 3g/kg corp la același interval de timp.

- Comparativ cu glicemia la timpul zero, efectul hipoglicemiant al extractului apos din semințe de *M. charanthia* apare semnificativ statistic mai mic după 120 minute la 1,5g/kg corp și la 90 minute la 3g/kg corp.

Administrarea de calus de *M. charanthia* în doză de 1,5g/kg corp are efect hipoglicemiant susținut statistic ( $p < 0,05$ ) până la 10 ore de la administrare.

- La iepurii recuperați aloxanic extractul apos din semințe și calus de *M. charanthia* au efect hipoglicemiant la doze de 1,5g/kg corp și 3g/kg corp.

- La iepurii diabetici dozele de 1,5g/kg corp de extract apos din semințe și calus de *M. charanthia* și 3g/kg corp semințe de *M. charanthia* nu au efect asupra valorii procentuale a glicemiei medii măsurată pe 24 ore experimentale. Efectul hipoglicemiant semnificativ (statistic) a fost observat doar la doza de 3g/kg corp semințe de *M. charanthia* la 10 ore de la administrare.

- Extractele apoase din semințe și calus de *M. charanthia* au efect hipoglicemiant evident în funcție de doză și valoarea glicemiei la iepurii recuperați aloxanic și diabetici.

- Administrarea de extract apos din semințe de *M. charanthia* în doză de 2g/kg corp determină o creștere a glucozuriei cu 33,13%; 29,01% și 11,61% la iepurii sănătoși, recuperați aloxanic și respective diabetici, sugerând un mecanism nou neanunțat până acum, de producere a hipoglicemiei la iepure.

- Histopatologic, la iepurii diabetici s-a constatat atrofia parenchimului glandular endocrin cu afectarea preferențială a celulelor  $\beta$  din insulele Langerhans.

## 2. Selecția unor linii celulare producătoare de antocianici în cultura *in vitro* la afin

S-a urmărit obținerea calusului de afin producător de antociani și cu aptitudine proliferativă, provenit de la două populații locale de afin de munte (din zona Caras-Severin). Creșterea calusului și sinteza de antociani este susținută de combinația adenin-sulfat (40 mg/l), ANA (1,5 mg/l) și BAP (1 mg/l) adăugate în mediul WPM. Genotipul influențează capacitatea proliferativă a calusului și sinteza antocianilor.

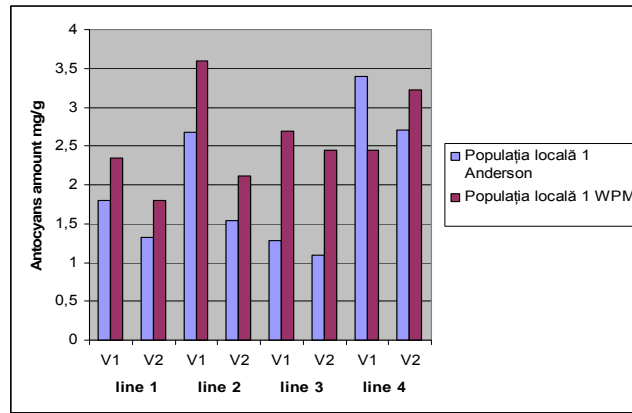


Fig. 3 Cantitatea de antociani sintetizați de calusuri provenite din linia celulară 1

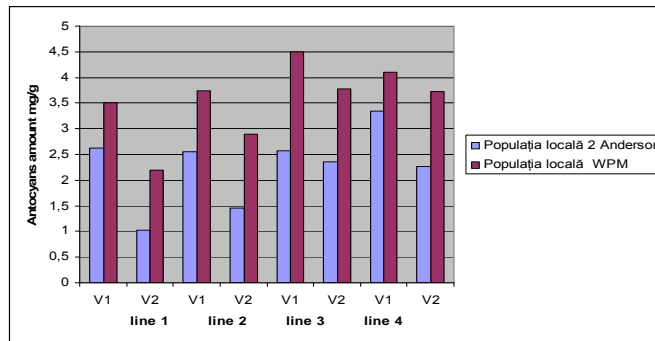


Fig.4. Cantitatea de antociani sintetizați de calusuri provenite din linia celulară 2

### Concluzii

1. Creșterea calusului și sinteza de antociani este susținută de combinația adenin-sulfat (40 mg/l), ANA (1,5 mg/l) și BAP (1 mg/l) adiționate în mediul WPM.
2. Genotipul influențează capacitatea proliferativă a calusului și sinteza antocianilor.

### 3. Studiul variabilității unor însușiri biochimice în cultura de celule la *M. charantia*

Celulele de *M. charantia* produc o categorie de proteine cu greutate moleculară relativ scăzută, cunoscute ca proteina P cu o greutate moleculară de aproximativ 11.000 dal., importantă în scăderea glicemiei din sânge. Variabilitatea somatică indusă în cultura de celule sub influența fitohormonilor a fost evaluată prin determinarea conținutului în antioxidanți și evaluarea amprentelor proteice din liniile celulare selecționate.

Fracțiile proteice au fost extrase din zece linii de calus de *Momordica charantia* și analizate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă (Fig. 1).

Pentru evaluarea greutății moleculare pentru fracțiile proteice a fost utilizat markerul „Broad Range Protein Molecular Weight Marker” (Promega), care este alcătuit din șapte fracții proteice, cu dimensiuni cunoscute.

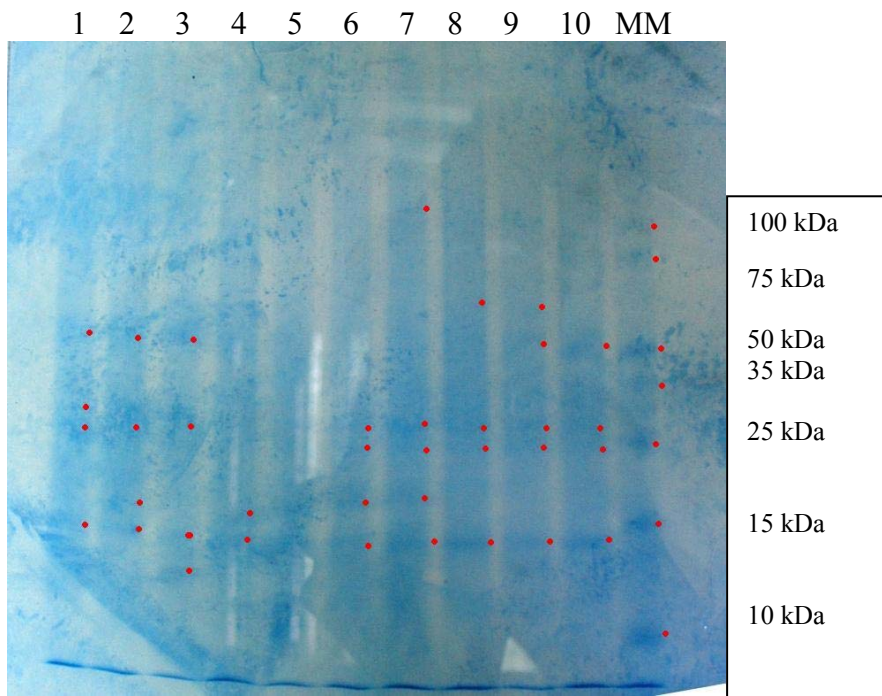
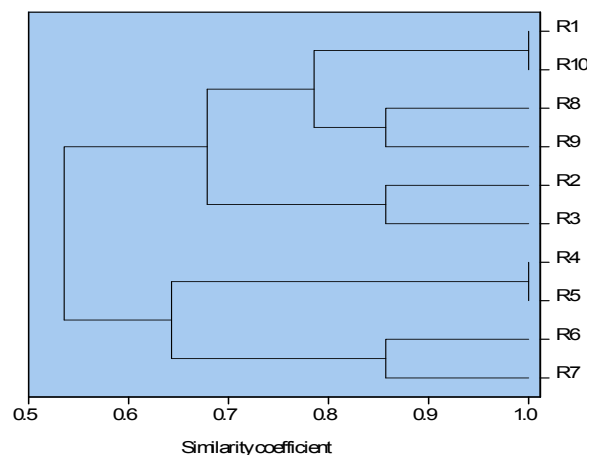


Fig.. 1 Analiza prin electroforeză în gel de poliacrilamidă 10% a fracțiilor proteice extrase din 10 linii de calus de *Momordica charantia* (1-10 linii de calus; 11 - marker molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Marker*)

În cazul tuturor celor 10 probe analizate s-au evidențiat opt tipuri de fracții proteice, cu dimensiuni diferite (F1-F7). În tabelul de mai jos s-au utilizat următoarele notații: 1 pentru prezența benzii la locusul respectiv; 0 pentru absența ei. Din cele 7 benzi amplificate de markerul utilizat, șase sunt polimorfice iar una este monomorfică (18000 kDa), rezultând o rată a polimorfismului de 85,71 %. Cele mai reduse frecvențe au fost observate în cazul benzilor de 110000 kDa și 64000 kDa.

Polimorfismul total generat de un anumit marker (PIC-polymorphic index content) care indică puterea discriminatorie a acestuia, a prezentat valori cuprinse între 0,180 la fracția de 110000 Kda și 0,500 la fracția de 20000 kDa, cu o medie de 0,383. Valoarea totală a polimorfismului generat de markerul respectiv (Marker index) a fost de 2,300.



UPGMA clustering of the *Momordica charantia* regenerants

În funcție de prezența (1) sau absența (0) benzilor polimorfe la liniile celulare studiate, s-a întocmit matricea similarității dintre aceștia utilizată pentru întocmirea dendrogramei după metoda mediei grupurilor (clusterilor).

Liniile celulare au fost grupate pe baza benzilor proteice în trei cluster principale. Primul cluster este compus din liniile R1 și R10 între care există o similaritate totală, alături de liniile R8 și R9 care manifestă o divergență de aproximativ 15 %. Liniile R2 și R3 între care există o similaritate de 85 %, alcătuiesc al doilea cluster, manifestând totodată o divergență de aproximativ 30 % față de liniile primului grup. În cel de-al treilea cluster sunt incluse liniile celulare R4 și R5 care manifestă o similaritate totală, alături de liniile R6 și R7 față de care se observă o divergență de aproximativ 35 %. De asemenea, regeneranții acestui ultim cluster prezintă o similaritate de aproximativ 525 față de ceilalți liniile celulare cuprinse în studiu.

### **Concluzii**

Capacitatea antioxidantă a fost mai mare la toate liniile celulare studiate, evidențiind avantajul culturii de celule pentru producerea metaboliților vegetali. Celulele cultivate pe mediul solid suplimentat cu fitohormonii ANA și BAP au manifestat o capacitate biosintetică superioară, comparativ cu mediul lichid. Prezența chinetinei induce o diferențiere a amprentei proteice în cluster variate.