

The PhD thesis contains:

Abstracts:	English, Romanian
The general part:	72 pages
Own research:	133 pages
Tables:	19
Figures:	77
Graphics:	7
Scheme:	2
Photo:	125
Appendix:	4
References:	237 titles

SUMMARY

Thesis title:

Phytotherapeutic investigations in females fungal diseases

Key terms:

Phytotherapy

Candida albicans

Extracts, essential oils

In vitro

In vivo

Effectiveness

Part I

BIBLIOGRAPHIC STUDY

The bibliography is dedicated to the issues:

- Fungi and fungal infections, introduction, etiology and classification of infections
- *Candida albicans*
- *Conventional treatment of C. albicans*
- Phytotherapy, as a method of alternative therapy.
- Plants with fungal diseases and known efficacy (which are 12 plants of the recognized phytotherapy).
- Plants phytoconstituents and especially of plants belonging to the genus *Artemisia*.

Thus, in **Chapter 1**, entitled Fungi and fungal infections, a brief introduction of the generic term of fungi and a brief characterization of them is presented. The etiology begins with a description of the two categories of organisms responsible for fungal infections: yeasts (en. "Yeasts", prototype for yeasts is *Candida spp*) and hyphae or filaments (en. "Molds" the prototype for hyphae is *Aspergillus spp*).

Fungal infections have multiple classifications. Thus, in terms of location, fungal infections can be classified into: *superficial fungal infections*, *fungal infections* and *subcutaneous or systemic invasive fungal infections*.

Chapter 2 presents informations strictly related to *Candida albicans*, the main yeast responsible for the fungal female diseases. Most often, the infection is caused by *Candida albicans*, followed in incidence, at a long distance, by: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr*, and *C. lusitaniae*. The differentiation between these species is given but the morpho-

tinctorial singular characters, and clinical characteristics. Of them all *C. albicans* is present, being able to be isolated, mainly in the gastrointestinal system, respiratory system and genital areas with a preference for mucous and mucocutaneous junction zones of warm-blooded animals.

Chapter 3 presents the necessary *in vitro* growing characters for *Candida albicans*. *Candida albicans* strains are growing on solid Sabouraud medium, a growing alternative media, being based on the chromogenic color change depending on the types cultivated. The identification of *C.albicans* cultures can be based on: morfotinctoriale characters, cultural characters, biochemical characters (zimogramme, auxonogramme), molecular characters, immunological characters, sensibility tests to antifungals.

Chapter 4 was dedicated to presenting the allopathic methods of *Candida albicans* treatment presenting the general antifungal action and classification, in: antifungal chemotherapy (coloring), iodophores, organic acids, imidazoles, systemic antifungals, antifungal antibiotics, aureobasidines, soles, triazoles, allylamines and echinocandins.

Chapter 5 presents the introduction to phytotherapy and its history and concludes that a study by the World Health Organization reported that about 80% of the world's population relies on unconventional medicine, particularly herbal sources in primary care cases.

Plants with fungal diseases and known efficacy that were presented in **Chapter 6** are:-White wormwood (*Artemisia absinthium*), Black wormwood (*Artemisia vulgaris*), Tarragon (*Artemisia dracuncululus L.*), Wood Lord (*Artemisia abrotanum*), (*Calendula officinalis L.*), Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), Thyme (*Thymus vulgaris*), Yarrow (*Achillea mellifolium*), Horsetail (*Equisetum arvense*), Juniper (*Juniperus communis*), Blueberries (*Vaccinium myrtillus L.*), Garden thyme (*Satureja hortensis L.*).

Chapter 7 presents the chemical composition of medicinal plants in general, the main constituents of plants are: monoterpene hydrocarbons, monoterpene compounds structure (alcohols terpenoids, terpenoids and noterpenoid esters, monoterpene oxides, monoterpene cetones), sesquiterpenoids (sesquiterpene alcohols, sesquiterpene hydrocarbons), polyphenol carboxylic acids, triterpenic compounds, resins, saponins, mucilage, bitter substances, flavonoids, carotenoids tannins, triterpenic compounds and alkaloids. In connection with the constituents of plants belonging to the genus *Artemisia*, the literature reveals that species mainly comprise terpenoids, flavonoids, coumarins, cafeoilquinici acids, sterols and acetylenes.

Part II

OWN RESEARCH

Chapter 8

Histo-cytological preliminary aspects in laboratory animals experimentally infected with *Candida albicans*

8.1. Preliminary histo-cytological aspects in male rats infection orally with *Candida albicans*

Purpose and Objectives

Being entities able to show a strong and extensive action with specific morbid states (*fungi*) with most often train / rebellious reaction to treatment, candidiasis remains a current topic. In this context, an approach for the development of candidiasis in laboratory animals in the preamble of studies to confirm or refute the effectiveness of different regimens applied we believe it is necessary.

It proposes a study to identify with certainty *in vivo* effects of *Candida albicans* infections occurred in rats running background immunosuppressive oral infection in target organs and evaluation of histo-cytological organs changes in immunosuppressed male Wistar rats experimentally infected with *Candida albicans* in invasive *Candida* infection.

Animals

The experiment was created *in vivo* according to the protocol developed by Cham et al. on Wistar rat lines, young males about the same weight (average weight 190 ± 10 grams).

For experiment immunosuppressed rats were used to highlight the evolution of infection with *Candida albicans*.

The animals were maintained in facilities for this purpose, temperature and light controlled (22 ° C, cycle of 12 hours starting at 8), and had free access to food and water *ad libitum*.

Methodology

Rats had impaired immunity with dexamethasone (Dex) ^(Corthametasone, Vetoquinol) and treated with tetracycline soluble powder 4% (Tc) ^(Laprophan) for one week before experimental infection, rats were given drinking water with 0.5 mg / liter of dexamethasone and tetracycline (0.1%).

On infection, the dose of dexamethasone was increased to 1 mg / liter, while the tetracycline concentration was reduced to 0.01% and was maintained throughout the experiment.

Rats were infected orally, twice at intervals of 24 h (days 0 and 1) with 0.1 ml saline suspension which contained 3.1×10^3 3108 viable cells of *C. albicans* strain ATCC 10231.

Samples of harvested organs were brain, tongue, respiratory tract, intestine, liver, spleen and kidney.

Cyto-histological technique was based on hematoxylin-eosin staining, microscopy was performed at x100 objectives, X200, X400 and images processed respectively microscope Olympus CX 41 with image capture software and data interpretation.

The more significant changes were identified in the case of lots of rats immunosuppressed and infected with *Candida albicans*. The affected organs in male rats were in the following order: tongue, intestine, liver, spleen and kidney, in experimental oral infection, but did not affect the histo architectural structure of the lung, trachea and nervous system.

Examining the tongues histological changes, they were recorded only in the case of lots of individuals immunosuppressed and infected while in the immunosuppressed individuals the tongue is without any histological changes. Progressive evolution of gravity was observed histological lesions from the third day by the end, the main changes being: parakeratosis, acanthosis, and dystrophy of the lingual epithelial cells with basement membrane discontinuity.

The rats intestine for the infected individuals, the main lesions were found in the first part of immunosuppression (day three). The main histological changes were the destruction in large areas of the intestinal villi, discreet intestinal glands swelling, discrete edema of villous axis, peri-glandular lympho-histiocytic infiltration.

Regenerative capacity of the intestine caused the tissue architecture at the end to recover almost completely, a situation which in part was true for immunosuppressed and infected batches, indicating that early lesions were more severe.

The liver, on the third and sixth indicated degenerative processes of hepatocytes with *hydropic dystrophy accompanied by karyolysis and karyopicnosis phenomena* that affected liver function and cellular integrity in male immunosuppressed (a little) and especially in the immunosuppressed and infected rats.

The evidence of the ninth day of normal liver tissue was found, which confirms the regenerative healling, observation justified by the return to normal cytoplasmic and nuclear structure of hepatocyte.

At spleen level in both cases there is a dramatic reduction in the first phase of leucopoiesis areas, a phenomenon affecting leukoformatory decisive function, erythropoiesis areas remaining unchanged with a trend towards recovery of lymphoid tissue.

In infected males, splenic lymph nodes remain or are present only in the form of lymphocytic cords.

The kidney after three days was found in infected males and immunosuppressed rats with an installation of extensively degenerative phenomena manifested by intumescent troubled nephrocytes of distal and proximal contortion tubules and Bowman capsule destruction and the disappearance of urinifere areas respectively.

These changes seriously affect renal function in a first phase, the phenomena developing into glomerulonephritis with increasing exposure time, until the last day the developments have tended to restore function in the reversible renal corpuscles. These changes in immunosuppressed males were much reduced in intensity and in scope.

8.2. Preliminary histo-cytological aspects in rats infected genitally with *Candida albicans*

Objective

Identify with certainty the effects of *Candida albicans* infections occurred in immunosuppressed and vaginally infected rats in target organs. Evaluation of histo-cytological changes in female organs in immunosuppressed Wistar rats experimentally infected with *Candida albicans* for the evaluation of invasive candidiasis.

The methodology is that of the experiment identicated previously, the only difference being the way of infection (genital way) and organs taken (genital tract, digestive tract, spleen, kidney and lung).

The main cyto-histological alterations were identified mainly to organs: liver, spleen, kidney and ovary respectively.

In the liver, on the third and sixth day, degenerative processes of hepatocytes with *hydropic dystrophy accompanied by karyolysis and karyopicnosis phenomena* were observed, affecting liver function and cellular integrity in female immunosuppressed (a little), as especially in the immunosuppressed and infected.

On the ninth day the installation of inflammatory phenomena manifested in a lympho-histiocytic massive exudate, which can develop into two directions: one toward the total tissue destruction and compromised liver function and one that we identified regarding the regenerative healling, justified by the return to normal cytoplasmic and nuclear structure of the hepatocyte.

The kidney after three days was found in case of the females infected and immunosuppressed the installation of extensively degenerative phenomena manifested by Bowman capsule destruction and disappearance of urinifere areas respectively.

These changes seriously affect renal function developing glomerulonephritis phenomena with increasing with the exposure time, in all cases this being irreversible. In immunosuppressed females these changes were much reduced in intensity and in scope.

At splenic level in both cases there is a dramatic reduction phenomenon affecting leucopoiesis areas and the leukoformatory function, erythropoiesis areas remaining unchanged. In infected females, splenic lymph nodes remain or are present only in the form of lymphocytic cords.

Ovarian lesions were found in oocytes, degenerative ovarian follicles accompanied by edema in the cortical region.

Towards the end of exposure the phenomena decreased in intensity remaining follicular edema, present in immunosuppressed females and in the immunosuppressed and infected females, no clear distinction between the two groups being found.

Chapter 9

Extracts and essential oils obtained from plants belonging to the genus *Artemisia*

Research conducted at the University of Veterinary Medicine Vienna, under the supervision of Prof. Dr. Ivo Schmerold and Prof. Dr. Klaus Stolze.

Research purposes

The purpose of this research was to obtain plant extracts and essential oils belonging to the genus *Artemisia*, rich in phenolic compounds with antifungal potential. The literature cites fungicide effect of extracts and essential oils from plants, this aspect helping us with necessary informations.

Objectives

Our research covers:

1. Development of medicinal plant *Artemisia absinthium* extracts (plant material prepared from the dry commercial form, the tea form) by extraction using SPE columns and various solvents and solvent extraction using chloroform.
2. Development of plant extracts of the aerial parts of *A. absinthium*, *A. dracunculus*, *A. abrotanum* and *A. vulgaris* collected in Austria and Romania by maceration with dichloromethane.
3. Development of essential oils from aerial parts of *A. absinthium*, *A. dracunculus*, *A. abrotanum* and *A. vulgaris* plants collected in Austria and Romania

Justification

This doctoral research from the doctoral plan intends as objective the comparative study of the genus *Artemisia* herbs, plants that may have anti-*Candida* potential. Thus, given the multitude of bioactive compounds and medicinal herbs, especially essential oils and phenolic compounds (mono-, di- or polyphenols) that are known to have antimicrobial potential, we proposed the chemical composition characterization of plants and antifungal activity relationship of these parameters tested *in vitro* on *Candida albicans* strain (ATCC 10231), using the disk method, according to standard rules of Impregnated Disks Antimicrobial Susceptibility Testing.

The plants studied

In this study we used four types of plants belonging to the *Astraceae* family (*Compositae*), as follows: *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. dracunculus* and *A. vulgaris*.

Artemisia vulgaris was collected from the surroundings of Timisoara in July-August 2010. *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. dracunculus* were collected from the Botanical Garden belonging to the Institute of Botany and Pharmacognosy at the University of Veterinary Medicine in Vienna, Austria.

Methods

Methods used to obtain extracts of *A. absinthium* (dry plant material)

Obtaining extracts with SPE column

Method of extraction-separation used was one with special SPE column (solid phase extraction) (Chromabond C18). The extraction method is a method originally suggested by Prof. Klaus Stolze from the Research Institute of Molecular Pharmacology and Toxicology of the University of Veterinary Medicine in Vienna.

The purpose of this method was to obtain the desired fraction of the plant for better separation of the components. The material used was *A. absinthium* bought as wormwood tea (producer Stef March SRL, Ramnicu Valcea).

Originally the plant material was crushed with mortar and pestle and then was loaded into the SPE column. Solvents used in the four stages of extraction were: n-hexane, ethanol, methanol, methanol / water 50% / 50% water. Thus five types of extracts resulted.

Each solvent extraction was done in part 2 times. The amount of the mixture (solvent-constituents download from plant material) was evaporated.

All extracts were evaporated and redissolved in methanol or mobile phase depending on the type of analysis performed.

The advantage of this method of preparation of extracts with SPE column is that it has proved ideal for separation of compounds from plants, making extracts more efficient for HPLC analysis.

The disadvantage, however arising from the same fact, is that this separation makes these fine fractions usable only for HPLC analysis, being ineffective *in vitro* (most likely due to the lack of compounds in the mixture, their effect being potentiated only in this form).

Obtaining the chloroform extracts

Work technique consisted of using 3 g of plant product. They were dissolved in 80 ml chloroform and the mixture was stirred for 10 minutes at room temperature. Resulting extract was evaporated and redissolved in methanol or mobile phase depending on the type of analysis performed.

Development of plant extracts by maceration with dichloromethane

Plants used were *A. dracunculus* and *A. abrotanum*. In 250 ml Erlenmeyer flasks were introduced 16 g of freshly harvested leaves. These were left to soak for 2 weeks. Then the mixture was filtered and the solvent evaporated.

Method of preparing the essential oils

There were two ways to achieve this, one taken from the literature and one proposed by Prof. Klaus Stolze.

I. The first was taken from the literature and has been used only for leaves or flowers, extraction of essential oils from plant sources using steam distillation.

For the extraction of essential oils a Clevenger-type apparatus was used. Plant product consisted of leaf material *A. abrotanum*, *A. dracunculus* and leaves and flowers of *A. vulgaris* and *A. absinthium*. The material was precisely weighed (the amount used was on average 15 g) and inserted into the balloon device. About 150 ml of distilled water were added and this volume has been completed throughout the distillation. This process was done for 3-4 hours (distillation speed is moderate). After distillation and cooling time, the resulted mixture is slowly descended in the graduated tube.

All of the solution obtained was then subjected to extraction using a balloon and dichloromethane. Several solvents were tested (dichloromethane, pentane, hexane) and dichloromethane is concluded to be the best solution. The mixture of solvent and essential oil resulting from the extraction was evaporated.

II. The second method for obtaining essential oils consists of two separate phases and is based on extractive distillation resulted in a genuine way.

1. Extraction step based on stirring a mixture of plant / solvent.
2. Extractive distillation resulted from the first stage.

In the distillation stage, the steps taken were identical with the method taken from the literature and presented above.

The advantages of the original method for obtaining essential oils are those that generate a greater amount of essential oil than the official method. Disadvantages of this method are related to longer time necessary, solvents and excess supplies and more prolonged labor required.

Chapter 10

Identification of chemical compounds in extracts and essential oils of plants of the genus *Artemisia*

Purpose and Objectives

The purpose of this research was to identify compounds contained in extracts and essential oils derived from plants of the genus *Artemisia*: *A. abrotanum*, *A. dracunculus*, *A. absinthium* and *A. vulgaris*.

Our objectives were to use the TLC / HPTLC technique to identify artemisinin in the extracts tested, using the HPLC technique for obtaining representative chromatograms of extracts and essential oils tested, obtaining chromatograms of selected standards (based on antifungal potential cited in the literature) and identification of these standards by means of adding "spikeing" of essential oils with standards and using GC-MS technique for the quantification of qualitative and quantitative compound contained in the essential oils tested.

TLC / HPTLC extracts analysis

TLC / HPTLC were performed on the basis of preliminary tests to determine the best eluent system used and the best mixture of reagents in the form of spray. As analyzed material, extracts obtained using the SPE column were tested.

Thin layer chromatography (TLC) and high performance thin-layer chromatography (HPTLC) were performed according to the literature and evaluation was based on the characteristics of each solution used.

Such evaluation was done either:

- Directly visible or UV light with 254, 366nm respectively wavelength
- In the visible range and / or 366nm UV light after spraying with reagents

In our case both aluminum base plates and special HPTLC plates were used.

In the analysis of TLC / HPTLC plant extracts, ideal eluent systems and the necessary quantities have been established as: EtOAc / CH₂Cl₂ / HCOOH / CH₃COOH / H₂O.

To better highlight the substances contained in extracts spray method using color reagents was used, the ideal mixture of reagents (for plant extracts) proving to be : Anisaldehyde / Sulfuric acid Reagent (AS).

Following application of reagents, artemisinin could be identified in the extracts in the color pink, highlighted with UV lamp at 366 nm only in the ethanolic extract of *A. absinthium*, but not sufficient for accurate quantification.

HPLC analysis of extracts and essential oils

Analysis by HPLC was performed using a Shimadzu HPLC PES-VAS equipment with UV detector at 205 nm 254 nm respectively, with LC-6A injection, Shimadzu Refractive Index detector and as well as Shimadzu HPLC equipment SCL-6B, Shimadzu autoinjector SIL with -5B, Waters Inline System - Roy Milton spectromonitor Degasser and 3100. We also used a Alltech ELSD Varex MKII detector. The software used for acquisition and interpretation of data: software class, N-2000 CHROMTECK (Shimadzu).

Artemisinin could be detected only with the ELSD detector. The ideal UV detector conditions were: column Merck 250x4.6mm, isocratic conditions **1ml/min**: 30% H₂O, 50% acetonitrile, 20% MeOH, and ideal conditions for ELSD detector were determined as: Nebl 3 psi, temperature 90 ° C drift, 2L/min. Artemisinin was detected at 6.3 min only with this type of detector attached to the HPLC equipment.

The following analysis done by HPLC with the UV detector were to detect the standards. Annex 1 contains HPLC chromatograms. The thujone was identified at 34 minutes, cineole at 41-46 minute (being a mixture of isomers), and linalool with identification at 32 minutes and β-cariofilen identified at 43 minutes. Annex 1 also contains essential oils chromatograms of *A. vulgaris*, *A. abrotanum*, *A. dracunculus* and *A. absinthium*. Chromatograms of essential using spiked with standards are also presented.

Appendix 3 contains the calibration curves of standards pursued, calibration curves which show the linearity of the HPLC analysis.

GC-MS analysis of essential oils

GC / MS analysis was performed at the Institute of Botany and Pharmacognosy at the University of Veterinary Medicine in Vienna, thanks to Prof. Remigius Chizzola and Prof. Franz Chlodwig.

GC / MS analysis was carried out for essential oils namely: *A. absinthium* (oil from extract), *A. abrotanum* (both forms), *A. dracunculus* (both versions), *A. vulgaris* (both versions).

The analysis of the volatiles was performed using a Hewlett-Packard 6890 GC linked to a Hewlett-Packard 5973 mass-selective detector. For the analysis a Zebron ZB-5MS, capillary column (27m x 250µm i. d., 0.25 µm film thickness) was used. The carrier gas was helium at 1.3 ml/min in the constant flow mode. The injector had 250°C, the injection volume was 1 µl and the split ratio 1:20. The initial oven temperature of 60°C was held for 1 minute, then increased at a rate of 5°C/min up to 220°C, and subsequently at a rate of 15°C/min up to 280°C, and finally was held isothermal for 1 min. The transfer line to the MSD was set at 280°C and the scan conditions were: M/Z 40-300, at 1.75 scans/sec.

Prior to analysis 900 µl of the volatile fractions were mixed with 100µl biphenyl (2.0 mg/ml in hexane) as internal standard. The components of essential oil were identified by comparing their relative retention times and mass spectra with those of Registry of Mass Spectral Data and literature citations (Adams, 2007; McLafferty 1989). The amount of the individual compounds in the fractions was calculated using the Total Ion Current from the MSD signal and assuming the same response as for the internal standard biphenyl.

Components of essential oils were identified by comparing the relative retention times and mass spectra with mass spectra data from the Register and quotations from literature.

All GC / MS analysis performed showed the presence with antifungal potential cited in literature. These substances are: davanone, eugenol and terpineol. All chromatograms and tables are presented in Appendix 2.

In the essential oil of **A. dracunculus (CH₂Cl₂ extract)** 10 constituents were identified and quantified by GC-MS analysis (Table 11). The essential oil of **A. dracunculus(extract)** was rich in *davanone* derivatives (26%), followed by *herniarin* 13%), *nordavanone*, and *cis-davanone*, *davana* oil (11%), *phytol isomers* (7%), *davanone* derivatives (4 %), *eugenol*, *methyleugenol* (2%) and an unknown constituent (23%). As content of substances having antifungal effect quoted in the literature, davanone is present and the presence of eugenole also contributes to the effect.

In the essential oil of **A. dracunculus (leaf)** 15 constituent were identified and analyzed quantitatively by GC-MS. As content of substances having antifungal effect cited, eugenol and davanone are present, in this case eugenol having the higher weight. **A. dracunculus** contains a large amount of *estragole* (85%) and *herniarin*, 7 - *Methoxycoumarin* (4%), *methyleugenol* and *trans-ocimen* (2%), *chavicol*, *eugenol*, E - *methylcinnamat*, *cis-davanone*, *davanone* derivates, *phytol cis-isomer* and *ocimen* (1%). *Germacrene D*, *G-decalactone*, and *allo-ocimene* was identified, but in insignificant amounts.

From the essential oil from the leaves of *A. vulgaris* 15 constituent have been established and identified in terms of quality and quantity through the analysis of GC-MS, and the essential oil of *A. vulgaris* (extract) 14 constituent were identified by GC-MS.

The essential oil of *A. vulgaris* from plant material contained mainly *terpinene-4-ol* (18%), followed by *spathulenol* (12%), *hexadecanoic acid* and *tau muurolol* (11%), *terpineol* (10%), *caryophyllene oxide* (8%), *cuminol* (7%), *borneole* (5%), *eugenol* and *1,4-p-mentadien - 7-ol*(4%), *linalool oxide* and *sabinene hydrate / hidroxicitronella* (3%), *phenylethyl alcohol* and *trans-carveole* (2 %). Traces of *germacren D* were also identified.

The essential oil of *A. vulgaris* (CH₂Cl₂ extract) was rich in *cis- crisantenyl acetate* (19%), *borneol* and *terpinene -4 - ol* (17%), *spatulenol* (9%), *a-terpineol* (8%), *camphor* (7%), *eugenol* (4%), *phenyl-ethylalcohol* and *caryophyllene oxide* (3%), *d-cadinen*, *b-selinen*, *germacren D*, *1,4-p-7-ol-metadien*, *cuminol*, *p-cimene -8 -ol* (2%) and *farnesene* (1%).

The essential oil of *A. abrotanum* (CH₂Cl₂ extract) contained 10 constituents The analysis revealed that this essential oil preparation was rich in *cis davanone* (47%), followed by *nordavanone* (34%), *estragole* (6%), *terpineol* and *cis-β-3-ol terminene* (5%) and *cis -piperitone oxide* (3%).

The essential oil of *A. abrotanum* (plant material) 11 constituents were identified in terms of quality and quantity by GC-MS. Chemical analysis showed that the essential oil of *A. abrotanum* was rich in *cis-davanone* (27%), followed by *ether davanone*, *nordavanone*, *davana oil* (16%), *1-terpineol* (8%), *t-piperitol* and *phytol isomer* (7%), *cis-β -terpineol* (6%), *estragole*, *davana ether* (5%) and *piperitone A* (3%). Two constituent remained unidentified.

The essential oil of *A. absinthium* (CH₂Cl₂ extract) 13 constituent were identified and quantitatively determined by GC-MS analysis. It was found that the main constituent of this essential oil were: *β-thujone* (21%), *nerole*, *bisabolon* (16%), *spathulenol* (9%), *herniarin*, *methoxy - umbeliferone* (8%), *estragole* (7%), *bisabololoxide* (5%), *caryophyllene oxide*, *cis- crisantenyl acetate* and *geraniol* (4%), *iso-3-thujanol* (3%) and *eugenol* (1%).

The volatile fractions studied showed a great chemical diversity. The four *Artemisia* species had distinct volatile patterns and there were also differences in the composition between the two different extracts, the distilled oil and the CH₂Cl₂ extract, of the same species, as presented in Annex 4.

Chapter 11

In vitro testing of Artemisia extracts and essential oils on *Candida albicans*

Essential oils of *A. absinthium*, *A. abrotanum*, *A. dracunculus* *Artemisia vulgaris* and the standards: *linalool*, *cineole*, *thujone*, *caryophyllene* and *eugenol*, were, both alone and in combinations as equal mixtures of standards, tested for antifungal activity against *Candida albicans* (ATCC 10231), by Method of Disks, according to the Standard Rules for Antimicrobial Susceptibility Testing using Impregnated Disks. The methodology used was made according to microbiological standards.

In vitro testing was performed in three plates, containing microcomprimates with Nystatin and filter papers containing essential oils and extracts. After testing standards we continued to test standard mixtures in order to conclude the existence or lack of standards antifungal potential, its antagonist or synergic effect in mixtures. All mixtures were carried out by mixing equal quantities of pure liquid standard (50% / 50% mixture of 50 μl).

In vitro tests of the extracts were negative, extracts presenting no fungicidal activity.

Tests and GC-MS analysis suggests that only some specific constituent have antifungal activity and most likely *davanone*, *linalool* and *eugenol*, will be used more frequently in future research. All oils have caused fungicidal effect, so that we can conclude that compounds found in different quantities are responsible for this effect, but it is difficult to attribute the work in a complex mixture of a single constituent.

Essential oils gave all positive results in the following descending order: *A. abrotanum* > *A. abrotanum* (CH₂Cl₂) > *A. vulgaris* (CH₂Cl₂) > *A. vulgaris* > *A. dracunculus* > *A. dracunculus* (CH₂Cl₂) > *A. absinthium* (CH₂Cl₂).

Standards tested proved the following descending order regarding the fungicidal effect: **eugenol** > **linalool** > **caryophyllene** > **thujone** > **cineole**.

Consequently we can asses the effectiveness of oils and extracts reporting the inhibition zone size to the one given by Nystatin and expressing the results as a percentage, we can make the following classification:

Essential oils with greater efficacy than Nystatin

- the essential oil of *A. abrotanum* effectively higher by 11.9%,
- the essential oil of *A. abrotanum* (CH₂Cl₂) with greater efficacy by 2.3%.
- the essential oil of *A. dracunculus* effectively equal to Nystatin.

Essential oils with lower efficiency than Nystatin

- the essential oil of *A. vulgaris* (CH₂Cl₂) with lower efficiency by 19%,

- the essential oil of *A. vulgaris* with lower efficiency by 20%,
- the essential oil of *A. dracuncululus* effectively lower by 26%,
- the essential oil of *A. dracuncululus* (CH₂ Cl₂) with lower efficiency by 38%,
- the essential oil of *A. absinthium* effectively lower by 38%,
- extract of *A. abrotanum* effectively lower by 66%,

Resulted in the following reporting standards of effectiveness

- eugenol with 32.2% higher efficiency compared to Nystatin,
- linalool effectively lower by 31.7% compared to Nystatin,
- caryophyllene effective with 60.9% lower compared to Nystatin,
- thujone effective with 65.8% lower compared to Nystatin,
- cineole effective with 67.8% lower compared to Nystatin.

Mixtures of standards

- thujone mixed with linalool efficacy lower by 17%,
- cineole mixed with linalool effective with 19.5% lower,
- thujone mixed with cineole had a lower efficiency to 24.3%,
- caryophyllene mixed with linalool efficacy was lower by 39%,
- cineole mixed with linalool, thujone and caryophyllene had a lower efficacy of 39%
- linalool mixed with cineole and thujone had a lower efficiency of 46.3%,
- linalool mixed with cineole and caryophyllene had an efficacy 49.7% lower,
- linalool mixed with caryophyllene and thujone had a lower efficacy of 53.6% compared to Nystatin,
- cineole mixed with thujone and caryophyllene had an efficacy lower by 56%,
- caryophyllene mixed with cineole had a lower efficacy of 60.9%,
- caryophyllene mixed with thujone had an efficacy lower with 65.8%,
- linalool mixed with eugenol had a lower efficacy of 5.88%,
- eugenol mixed with cineole effectiveness was higher by 13.7%,
- eugenol mixed with caryophyllene effectiveness was higher by 11.7%,
- eugenol mixed with thujone effectiveness was higher by 49%,
- the mixture of all standards had greater efficacy with 111%
- linalool in mixture with eugenol, thujone and caryophyllene had greater efficacy with 123.5%
- eugenol in mixture with linalool, cineole and thujone had a lower efficiency of 2.35%,
- eugenol and linalool mixed with thujone had an efficacy 35.29% higher compared to Nystatin.

As a result of tests carried out we can state that *A. abrotanum* plant is the most promising application of phyto-medication against candidiasis.

Eugenol is the standard with the highest antifungal potential of the standards tested. After analyzing the results, cineole tested as single standard proved medium fungicidal effect, but in the standard combinations tested, it's presence proved an inhibitory one. Chemical mechanisms that give rise to this chemical phenomenon are still unclear. Thujone as simple standard had a weak fungicide effect, but in the combinations tested had an enhancer effect. Chemical mechanism is still unknown.

Chapter 12.

Histo-cytological aspects in laboratory animals experimentally infected with *Candida albicans* and treated with eugenol

12. 1. Histo-cytological aspects in male rats experimentally infected with *Candida albicans* and treated with eugenol

Research purposes

Eugenol (4-allyl-2 methoxyphenol) is a phenolic compound present in nature, especially in certain plants. Following GC / MS analysis performed in Chapter 12 and Chapter 13, we evaluated the compound eugenol with the highest antifungal potential, this making it an ideal candidate for testing *in vivo*.

Anti-*Candida* activity of phenolic compounds from *Artemisia* plants - eugenol - was studied in the treatment of oral candidiasis in immunosuppressant male rats.

Objective

In vivo experiment was designed according to the protocol developed by Cham et al. to identify with certainty the effects of eugenol treatment in infections with *Candida albicans* occurred in immunosuppressive rats in oral infection, in the target organs and evaluation of histo-cytological changes of organs in immunosuppressed male Wistar rats, experimentally infected with *Candida albicans* and treated with eugenol.

Animals

In vivo experiment performed on Wistar rat lines, young males about the same weight (average weight 190 ± 10 grams). For the experiment, immunosuppressed rats were used to highlight the evolution of

infection with *Candida albicans*. The animals were maintained in facilities for this purpose, temperature and light controlled (22 ° C, cycle of 12 hours starting at 8), and had free access to food and water ad libitum.

Rats had impaired immunity with dexamethasone (Dex) (Corthametasone, Vetoquinol) and treated with tetracycline soluble powder 4% (Tc) (Laprophan) for one week before experimental infection, rats were given drinking water with 0.5 mg / liter of dexamethasone with tetracycline (0.1%).

On infection, the dose of dexamethasone was increased to 1 mg / liter, while the tetracycline concentration was reduced to 0.01% and was maintained throughout the experiment.

Rats were infected orally, twice every 24 h (days 0 and 1) with 0.1 ml saline suspension which contained 3.1×10^3 3108 viable cells of *C. albicans*, strain ATCC 10 231 (Fig. 188).

Treatment was performed with eugenol purchased from Aldrich Sygma, Germany and Nystatin.

Series

Experimental series consisted of three groups each consisting of fifteen individuals:

- ICAE - made up of males immunosuppressed, infected with *C. albicans* and treated with eugenol,
- ICAN - made up of males immunosuppressed, infected with *C. albicans* and treated with Nystatin
- ICA - made up of males immunosuppressed, infected with *C. albicans* and the placebo (saline)

Lots of animals that were immunosuppressed and infected, but who received saline were used as negative control group.

All animals were immunosuppressed during a week pre-infection. The animals were infected on day 0 and 1 of the experiment, after which we began treatment for a period of seven days. Rats (five in each group) were euthanized after 3, 6 and 9 days after infection and samples were collected to achieve histo-cytological investigations. Group treated with eugenol received eugenol 0.5 mL (24 mM) orally twice daily for eight days. Group treated with Nystatin received a suspension of 0.5 mL. Lot considered the control group received 0.5 mL saline under the same conditions. The substances were diluted in 0.8% agar.

Tongue, spleen, kidneys, liver and intestine were collected and processed by histological techniques HE stained (hematoxylin - eosin). Microscopy was performed on the objectives x 100 x 200 and x 400.

Following infection and administration of three different types of substances, eugenol results suggest a potential drug with efficacy in treating candidiasis. The results obtained after treatment with eugenol are comparable with those obtained by using Nystatin.

The main cyto-histological alterations were identified in the treated and infected batch with saline, considered as control subjects. In this case, changes were observed mainly in organs: tongue, intestine, liver, spleen and kidney, respectively.

In the immunosuppressed, infected and treated with placebo rats we observed histological lesions: dystrophy of the lingual epithelial cells with basement membrane discontinuity with acanthosis and parakeratosis. The tongue of the immunosuppressed individuals infected and treated with eugenol or Nystatin is without any histological changes.

In the intestine, immunosuppressed rats infected and which only received saline, the main damage was evident in the results observed in cyto-histological analysis of organs taken on the third day of treatment. These changes consisted of the destruction of large areas of the intestinal villi, discrete edema of the villous axis and lympho-histiocytic-glandular infiltration.

In immunosuppressed rats infected and treated with eugenol and Nystatin these changes were not present, the only change present in both groups was discreet edema of the intestinal glands.

In case of the liver, in the group treated with placebo with *hydropic dystrophy accompanied by karyolysis and karyopicnosis phenomena* were observed. To a lesser extent these changes were observed in the case of batch treated with eugenol or Nystatin, this reaction is basically attributed to the immunosuppressive medication.

At a splenic level as a consequence of immunosuppression and infection, there was a dramatic reduction in the first phase of leucopoiesis areas.

In infected males treated with saline, splenic lymph nodes are present only in the form of lymphocytic cords.

In the kidney, after three days, in males immunosuppressed, infected and treated with serum there was the presence of more serious changes. Histological phenomena highlighted were: extensive degeneration troubled nephrocytes in contortions tubules, disappearance of the urinifere areas and destruction of the Bowman capsule. In sections taken on the sixth day glomerulonephritis was highlighted and on day nine these processes were at a lower intensity.

In immunosuppressed males infected and who received either eugenol or Nystatin these changes were much reduced in intensity as we expand them being present in the sixth day of treatment.

The results can fit eugenol in the same efficacy group with Nystatin allowing us to consider eugenol as a good candidate as a therapeutic agent for oral candidiasis and therefore will be taken into account in future studies of its pharmacokinetic and toxicology.

Eugenol did not cause acute toxicity in rats treated.

12. 2. Histo-cytological aspects in female rats infected vaginally with *Candida albicans* and treated with eugenol

Research purposes

Vulvovaginal candidiasis is a common disease widely affecting approximately one third of all women at least once in life. About 5% of these women are subject to recurrent attacks of vaginal candidiasis. It is often associated with other disorders such as diabetes, antibiotics, corticosteroid therapy, and pregnancy.

Phenolic compound eugenol showed very good efficacy *in vitro* in the antifungal tests made by us allowing us to continue with an experiment *in vivo*.

The methodology is the same as the one presented previously. Group treated with 0.5 ml eugenol received (~ 4 mg / animal) orally twice daily for eight days. Group treated with Nystatin received a suspension of 0.5 ml (~ 0054 mg / animal it). Lot considered the control group received 0.5 mL saline under the same conditions. All active substances were administered diluted in 0.8% agar solution.

Fragments of tissue harvested from the ovary, spleen, kidneys and liver, for cito - histological investigations. The main changes in terms were observed histologically: liver, spleen, kidneys and ovaries respectively.

In the batch of rats immunosuppressed, infected with *Candida albicans* and treated with eugenol, the results are compared with those of the immunosuppressed rats batch infected with *Candida albicans* and treated with Nystatin. Changes resulting from immunosuppression, and infection was reduced from the beginning of the experiment (Day III) and even canceled by the next analysis (on the sixth and ninth day).

The histological analysis performed on ovary sections, in the lot immunosuppressed, infected and treated with placebo (saline), degenerative lesions were found as being lesions in the oocytes and degenerative ovarian follicles accompanied by edema in the cortical region. In lots immunosuppressed, infected and treated with active substances, the results do not indicate any change, having a normal aspect. The only similarity between the three groups, most likely attributed to the phenomenon of immunosuppression has been the interstitial cell degeneration essential responsible for secretion of sex hormones in both groups.

The liver presented degenerative processes of hepatocytes with *hydropic dystrophy accompanied by karyolysis and karyopichnosis phenomena* affecting the hepatic function and the cellular integrity in female immunosuppressed, infected and treated with eugenol or Nystatin (to a lesser extent), and especially in the immunosuppressed, infected and treated with placebo. This reaction is in principle assigned to the immunosuppressive medication but it is poorly presented in the case of lots treated with eugenol or Nystatin. These changes however were not present in the sixth day of treatment when cytoplasmic and nuclear structure of the hepatocyte returned to normal.

In the case of the kidney, in females immunosuppressed, infected and treated with saline, the installation of a degenerative phenomenon was found, manifested by Bowman capsule destruction and disappearance of urinifere areas respectively. This tended to glomerulonephritis until the end of the experiment, the changes being irreversible results. In case of the females immunosuppressed, infected and treated with eugenol or Nystatin, these changes were much reduced in intensity and in scope.

In the spleen, in both situations, a dramatic reduction of the leucopoiesis areas was found.

Doses of eugenol used by us in the experiments were so low that there was no toxicity. Furthermore, eugenol, being a natural compound has the advantage of having volatile molecules that can penetrate tissue areas inaccessible to other antifungal substances.

Chapter 13

General conclusions

In this thesis emerged in total: 92 general conclusions and recommendations for personal contributions.

Bibliography

This thesis is based on 237 bibliographic titles from which 59 web sources and 3 published original works of thesis topic.

Prezenta teză conține:

Rezumate:	română/engleză
Tabele:	19
Figuri:	77
Grafice:	7
Scheme:	2
Foto:	125
Anexe:	4
Partea generală:	72 pagini
Partea specială:	133 pagini
Bibliografie:	237 titluri

REZUMATUL

Tezei de doctorat cu titlul:

Investigații fitoterapeutice în afecțiunile fungice la femele

Termenii cheie :

fitoterapie
Candida albicans
Extracte, uleiuri esențiale
In vitro
In vivo
Eficacitate

Partea I-a

STUDIUL BIBLIOGRAFIC

Partea bibliografică este dedicată prezentării aspectelor legate de:

- Fungii și infecțiile fungice, introducere, etiologie și clasificarea infecțiilor
- *Candida albicans*
- **Tratamentul alopatic al *C. albicans***
- Fitoterapia, ca metodă de terapie alternativă.
- Plante cu eficacitate cunoscută și în afecțiunile fungice (unde sunt prezentate 12 plante dintre cele recunoscute în fitoterapie).

- Fitoconstituenții plantelor și în special ai plantelor aparținând genului *Artemisia*.

Astfel, în **Capitolul 1**, intitulat Fungii și infecțiile fungice, este prezentată ca și introducere o scurtă rememorare a termenului generic de fung și o scurtă caracterizare a acestuia.

Partea de etiologie începe cu descrierea celor două categorii de organisme răspunzătoare de infecțiile fungice: levurile (en. „yeasts”, prototipul pentru levuri fiind *Candida spp*) și hifele sau filamentele (en. „moulds”, prototipul pentru hife este *Aspergillus spp.*).

Infecțiile fungice prezintă multiple clasificări. Astfel, din punct de vedere al localizării, infecțiile fungice pot fi clasificate în: *infecții fungice superficiale*, *infecții fungice subcutanate* și *infecții fungice invazive sau sistemice*. Infecțiile fungice invazive sunt împărțite la rândul lor în: *fungemie*, *infecție fungică invazivă* și *infecție fungică diseminată iar cealaltă caracterizare a acestora le împarte în: infecții fungice invazive endemice* (sau cu afectare pulmonară) și *infecții fungice invazive oportuniste*

Capitolul 2 prezintă informații strict legate de *Candida albicans*, principala levură responsabilă de afecțiunile fungice genitale la femei. Cel mai adesea, infecția este produsă de *Candida albicans*, urmată, ca incidentă, la mare distanță, de speciile: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei* și *C. guilliermondii*, precum și *C. kefyr*, *C. lusitaniae*. Diferențierea între aceste specii este dată însă de caracterele morfo-tinctoriale singulare, și caracterele clinice.

Dintre toate spp. de *Candida*, *C. albicans* este mai prezentă, fiind capabilă de a fi izolată, în principal din sistemul gastro-intestinal, sistemul respirator și genital, având preferința pentru suprafețele mucoase și pentru zonele de joncțiune mucocutanate ale animalelor cu sânge cald.

Capitolul 3 prezintă caracterele necesare cultivării *Candidei albicans in vitro*. Tulpinile de *Candida albicans* se dezvoltă pe mediul Sabouraud solid, o altă soluție de cultivare fiind utilizarea mediilor cromogene care se bazează pe modificarea culorii mediului în funcție de genurile cultivate.

Din punct de vedere al caracterelor de identificare, identificarea culturilor de *C.albicans* se poate face pe baza: caracterelor morfotinctoriale, caracterelor de cultură (testului filamentării rapide, formarea clamidosporilor), caractere biochimice (zimograma, auxonograma), caracterelor moleculare, caracterelor imunologice (testul de aglutinare a candidiei, testul de fixare a complementului, testul de precipitare, imunofluorescența și ELISA; patru tipuri de antigene *Candida*), fungigramei. Caracteristicile morfologice și biochimice ale microorganismelor se utilizează pentru a realiza o identificare preliminară, însă pentru identificarea taxonomică finală se utilizează testelor moleculare, teste care vizează: izolarea și purificarea ADN nuclear, amplificarea genei pentru ARNr 5.8S, obținerea profilelor de restricție a ampliconului genei pentru ARNr 5.8S.

Capitolul 4 este o retrospectivă a medicației candidicide utilizate în prezent. Antifungicele alocate se pot clasifica astfel în două mari grupe: **antifungicele topice și antifungicele sistemice.** Aceste două mari categorii sunt divizate mai mult în mai multe subgrupuri.

Antifungicele topice se divid în **antifungice chimioterapice (colorante)** (*fenol, hexaclorfenol, clorură de bezalconiu, fuxină și rezorcină*, din grupa *fenolicelor*: *pentaclorfenolul (Fungifen liniment)*, la *clorigene* (clorura de clorhexidină)(*Alkema unguent*), sau hexaclorfen (sol. 0,5%)), **iodoforii (Povidona)**, **acizii organici (Acidul salicilic) și imidazolicile (Clotrimazol, Econazol, Miconazol, Ketoconazol, Tiabendazo, Candicidina, Saramicetina, Tricomicina).**

Antifungicele sistemice se subdivid în: **antibioticele antifungice (Pimaricina, Stamicinul (Nistatinul), Amfotericina), aureobazidinele** (bazifungina), **azolii antifungici** cuprind două grupe: imidazolii (*Ketoconazol, Miconazol, Amfotericină B*) și triazolii (*Voriconazolul, Posaconazolul, Ravuconazolul, Fluconazolul, Itraconazolul, Micetina, Alilaminele* (terbinafina, *Morolfinele, 5-flucitozina*) și **echinocandinele** (caspofungin, micafungin, anidulafungin) fiind ultimele clase de antifungice utilizate în terapia curentă.

Capitolul 5 prezintă introducerea în fitoterapie și istoricul acesteia și concluzionează că un studiu realizat de Organizația Mondială a Sănătății a raportat că aproximativ 80% din populația lumii se bazează pe medicamente neconventionale, în special surse pe bază de plante, în cazuri primare de asistența medicală.

Plantele cu eficacitate cunoscută și în afecțiunile fungice care au fost prezentate în cadrul **Capitolului 6** sunt: Pelinul-alb (*Artemisia absinthium*), Pelin negru (*Artemisia vulgaris*), Tarhon (*Artemisia dracunculul L.*), Lemnul Domnului (*Artemisia abrotanum*), Gălbenelele (*Calendula officinalis L.*), Rozmarinul (*Rosmarinus officinalis*), Cimbrul de cultură (*Thymus vulgaris*), Coada-soricelului (*Achillea mellifolium*), Coada calului (*Equisetum arvense*), Ienupăr (*Juniperus communis*), Afinul (*Vaccinium myrtillus L.*), Cimbrul de grădină. (*Satureja hortensis L.*).

Capitolul 7 prezintă compoziția chimică a plantelor medicinale în general, principalii constituenți ai plantelor fiind: hidrocarburile monoterpene, compuși cu structura monoterpenică. (alcoolii terpenoidici, esterii terpenoidici și neterpenoidici, oxizii monoterpeneici, cetonele monoterpeneice), sesquiterpenoidele (alcoolii sesquiterpenici, hidrocarburile sesquiterpenice), acizii polifenol carboxilici, compuși triterpenici, rezinele, saponinele, mucilagiile. substanțele amare, flavonoidele. carotenoidele. taninii. compuși triterpenici și alcaloizii. În legătură cu constituenții conținuți de plantele aparținând genului *Artemisia*, literatura de specialitate relevă faptul că speciile cuprind în principal terpenoide, flavonoide, cumarine, acizi cafeoilquinici, steroli și acetilene.

Partea a II-a

CERCETĂRI PROPRII

Capitolul 8. Aspecte histo-citologice preliminare la animalele de laborator infectate experimental cu *Candida albicans*

8.1. Aspecte histo-citologice preliminare la șobolani masculi infectați oral cu *Candida albicans*

Scop și obiective

Bioentități capabile să manifeste o puternică și extinsă acțiune antisanogenă, cu stări morbide specifice (*microze*) a căror evoluție, de cele mai multe ori trenantă / rebelă la tratamente, candidozele rămân un topic actual. În acest context, o abordare legată de evoluția candidozei la animalele de laborator în preambulul unor studii care să confirme sau să infirme eficacitatea diferitelor scheme terapeutice aplicate credem că este necesară.

Se propune un studiu in vivo pentru identificarea cu certitudine a efectelor infecțiilor cu *Candida albicans* apărute pe fond imunosupresiv la șobolani consecutiv infecției orale pe organele țintă și evaluarea modificărilor histo-citologice ale organelor la masculii de șobolan Wistar imunosupresați și infectați experimental cu *Candida albicans*, în ideea evaluării infecției invazive candidozice.

Animalele

Experimentul a fost concepu in vivo conform protocolului realizat de Chami și col.(24) pe linii de șobolani Wistar, masculi tineri cu aproximativ aceeași greutate, (greutatea medie de 190 ± 10 grame), iar pentru experiment au fost utilizați șobolani imunosupresați pentru a se evidenția evoluția infecției cu *Candida albicans*.

Animalele au fost întreținute în spații destinate acestui scop, cu temperatură și lumină controlate (22°C , ciclul de 12 ore începând cu ora 8), și au avut acces liber la hrană și apă ad libitum.

Metodologia

Șobolani au fost imunodepresați cu dexametazonă (Dex) ^(Corthametasone, Vetoquinol) și tratați cu tetraciclină 4% pulbere hidrosolubilă (Tc) ^(Laprophan) timp de o săptămână înainte de infecția experimentală; șobolani au primit apă potabilă cu 0,5 mg / litru de dexametazonă cu tetraciclină (0,1%).

În ziua de infecție, doza de dexametazonă a fost ridicată la 1 mg / litru, în timp ce tetraciclină a fost redusă la concentrația de 0,01% și a fost menținută pe toată durata experimentului.

Șobolani au fost infectați pe cale orală (Fig. 83), de două ori, la intervale de 24 h (zilele 0 și 1) cu 0,1 ml de suspensie salină care a conținut $3.108 3,1 \times 10^3$ celule viabile de *C. albicans*, tulpina ATCC 10231.

Proble de organe recoltate au fost: creier, limbă, tract respirator, intestin, ficat, splină și rinichi.

Tehnică cito-histologică s-a bazat pe colorația Hematoxilina-Eozină, microscopia fiind efectuată la obiectivele x100, x200, respectiv x400 și imaginile procesate la microscopul Olympus CX 41 cu softul de captare imagini și interpretare date. Secțiunile histologice sunt prezentate în figurile 94-104.

Modificările cele mai pregnante au fost identificate în cazul loturilor de șobolani imunosupresați și infectați cu *Candida albicans*. Candidoza a afectat organele masculilor de șobolani în următoarea ordine: limbă, intestin, ficat, splină și rinichi, în infecția experimentală pe cale orală, însă nu a afectat histo-arhitectonica pulmonului, traheei, sistemului nervos în infecția experimentală pe cale orală la masculii de șobolan.

Examinând histologic limba modificările au fost înregistrate doar în cazul indivizilor din loturile imunosupresate și infectate, limba indivizilor imunosupresați fiind fără nici un fel de modificare histologică. S-a observat evoluția progresivă a gravității leziunilor histologice de la ziua a treia către sfârșitul perioadei, principalele modificări fiind: paracheratoza, acantoza, distrofia celulelor epiteliale linguale cu discontinuitatea membranei bazale.

La nivelul intestinului la șobolani imunosupresați principalele leziuni s-au constatat în prima parte a imunodepresiei (ziua a treia). Principalele modificări histologice au fost: distrugerea pe suprafețe întinse a vilozităților intestinale, edemul discret al glandelor intestinale, edemul discret al axului vilozităților, infiltrări limfo-histiocitare peri-glandular.

Capacitatea de regenerare a intestinului a făcut ca la sfârșitul perioadei arhitectonică tisulară să se refacă aproape complet, situație care în parte a fost valabilă și în cazul loturilor imunosupresate și infectate, cu precizarea că leziunile din prima parte au fost mult mai grave.

La nivel hepatic, în ziua a treia și a șasea s-au observat procese de tip degenerativ ale hepatocitelor cu distrofie balonizantă însoțită de fenomene de carioliză și cariopicoză care au afectat funcția hepatică și integritatea celulară la masculii imunosupresați (într-o mică măsură), cât mai ales la cei imunosupresați și infectați.

La probele din ziua a noua s-a constatat țesut hepatic normal ceea ce confirmă healing-ul regenerativ, observație justificată prin revenirea la normal și a structurii citoplasmice și nucleare a hepatocitului și implicat refuncționalizarea acestuia.

La nivel splenic în ambele situații se constată reducerea dramatică în prima fază a zonelor de leucopoeză, fenomen care afectează decisiv funcția leucoformatoare, zonele de eritropoeză rămânând nemodificate cu o evoluție spre refacerea țesutului limfoid. În cazul masculilor infectați, limfonodulii splenici rămân sau sunt prezenți doar sub forma unor cordoane limfocitare.

La nivel renal după trei zile s-a constatat în cazul masculilor infectați și imunosupresați instalarea fenomenelor degenerative pe o arie extinsă, manifestate prin intumescența tubule a nefrocitelor din tubii contorși distali și proximali, precum și distrucția capsulei Bowman și respectiv dispariția spațiilor urinfere.

Aceste modificări afectează grav funcția renală într-o primă fază, fenomenele proliferând spre glomerulonefrită odată cu creșterea timpului de expunere până în ziua a noua evoluțiile au avut tendință reversibilă spre refacerea funcției la nivelul corpusculilor renali. În cazul masculilor imunosupresați aceste modificări au fost mult mai reduse și ca intensitate și ca extindere.

8.2. Aspecte histo-citologice preliminare la femelele de șobolan infectate genital cu *Candida albicans*

Obiectiv

Identificarea cu certitudine a efectelor infecțiilor cu *Candida albicans* apărute pe fond imunosupresiv la șobolani consecutiv infecției vaginale pe organele țintă. Evaluarea modificărilor histo-citologice ale

organelor la femelele de șobolan Wistar imunosupresate și infectate experimental cu *Candida albicans* în ideea evaluării infecției invazive candidozice.

Metodologia este identică cu cea de la experimental prezentat anterior, singurele diferențe fiind modalitatea de infecție (cale genitală) și organele preluate (tractul genital, tractul digestiv, splină, rinichi și pulmon).

Principalele alterări ale arhitectonicii cito-histologice s-a indentificat în principal organele: ficat, splină, rinichi și respectiv ovar. Secțiunile histologice sunt prezentate în figurile 107 – 114.

La nivel hepatic, în ziua a treia și a șasea s-au observat procese de tip degenerativ ale hepatocitelor cu distrofie balonizantă însoțită de fenomene de carioliză și cariopicnoză care afectează funcția hepatică și integritatea celulară la femelele imunosupresate (într-o mică măsură), cât mai ales la cele imunosupresate și infectate.

La probele din ziua a noua s-a constatat apariția sau instalarea fenomenelor inflamatorii concretizate printr-un exudat limfo-histiocitar masiv, care poate evolua spre două direcții: una spre distrucția arhitectonicii și compromiterea totală a funcției hepatice și una, cea pe care am indentificat-o noi în acest experiment, spre heallingul regenerativ, observație justificată prin revenirea la normal a structurii citoplasmice și nucleare a hepatocitului și implicit refuncționalizarea acestuia.

La nivel renal după trei zile s-a constatat în cazul femelelor infectate și imunosupresate instalarea fenomenelor degenerative pe o arie extinsă, manifestate prin intumescența turbure a nefrocitelor din tubii contorți distali și proximali, precum și distrucția capsulei Bowman și respectiv dispariția spațiilor urinifere.

Aceste modificări afectează grav funcția renală fenomenele proliferând spre glomerulonefrită odată cu creșterea timpului de expunere până în ziua a noua evoluțiile fiind în toate cazurile ireversibile. În cazul femelelor imunosupresate aceste modificări au fost mult mai reduse și ca intensitate și ca extindere.

La nivel splenic în ambele situații se constată reducerea dramatică a zonelor de leucopoeză fenomen care afectează decisiv funcția leucoformatoare, zonele de eritropoeză rămânând nemodificate.

În cazul femelelor infectate, limfonodulii splenici rămân sau sunt prezenți doar sub forma unor cordoane limfocitare, infecția cu *Candida albicans* blocând evoluția așteptată și acceptată în bolile infecțioase, aceea de reactivitate și proliferare leucocitară.

În cazul ovarului s-au constatat leziuni degenerative ale ovocitelor însoțite de edemul foliculilor ovarieni în regiunea corticală.

Spre sfârșitul duratei de expunere fenomenele au scăzut în intensitate edemul folicular rămânând prezent atât la femelele imunosupresate cât și la cele imunosupresate și infectate dar fără a se constata o diferențiere netă între cele două loturi.

În plus, la sfârșitul perioadei de expunere s-a constatat instalarea degenerescenței celulelor interstițiale responsabile de secreția hormonilor sexuali la ambele loturi.

Capitolul 9

Extrakte și uleiuri esențiale obținute din plante aparținând genul *Artemisia*

Cercetare realizată la Viena, Universitatea de Medicină Veterinară, sub conducerea Prof. Dr. Ivo Schmerold și cu ajutorului Prof. Dr. Klaus Stolze din cadrul Institutului de Toxicologie moleculară.

Scopul cercetării

Scopul acestei cercetări a fost obținerea unor extracte și uleiuri esențiale din plante aparținând genului *Artemisia*, bogate în compuși fenolici cu potențial antifungic. Literatura de specialitate citează efectul fungicid al extractelor și uleiurilor esențiale din plante, acest fapt ajutându-ne cu informații necesare.

Obiectivele cercetărilor noastre se referă la:

1. Realizarea unor extracte din planta medicinală *Artemisia absinthium* (material vegetal preparat din partea aeriană prezent comercial sub formă de ceai) prin extracție utilizând coloane SPE și diferiți solvenți și prin extracție utilizând cloroformul ca solvent
2. Realizarea unor extracte din părțile aeriene ale plantelor *A. absinthium*, *A. dracunculus*, *A. abrotanum* și *A. vulgaris* colectate din Austria și România prin macerare cu diclorometan.
3. Realizarea unor uleiuri esențiale din părțile aeriene ale plantelor *A. absinthium*, *A. dracunculus*, *A. abrotanum* și *A. vulgaris* colectate din Austria și România

Justificarea demersului

Prezenta cercetare din cadrul planului doctoral își propune ca obiective studiul comparativ al unor plante aromatice din genul *Artemisia*, plante care pot să aibă potențial anti-candida. Astfel, ținând seama de multitudinea compușilor bioactivi din plantele aromatice și medicinale, îndeosebi a uleiurilor esențiale și a

compușilor fenolici (mono-, di- sau polifenoli) care sunt cunoscuți ca având potențial antimicrobian, ne-am propus caracterizarea chimică a compoziției acestor plante și relația acestor parametri cu acțiunea antifungică, testată *in vitro* pe tulpina de *Candida albicans* (ATCC 10231), prin metoda discurilor, conform Normelor Standard pentru Testarea Sensibilității Antimicrobiene a Discurilor Impregnate.

Plantele luate în studiu

În studiul de față s-au utilizat 4 tipuri de plante din familia *Astraceae* (*Compositae*), genul *Artemisia*, respectiv: *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. dracunculus* și *A. vulgaris*. *Artemisia vulgaris* a fost colectată din împrejurimile Timișoarei în lunile iulie-august 2010. *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. dracunculus* au fost colectate din Grădina Botanică aparținând Institutului de Botanică și Farmacognozie din cadrul Universității de Medicină Veterinară din Viena, Austria.

Metode utilizate

Metode utilizate pentru obținerea extractelor de *A. absinthium* (material vegetal uscat)

Obținerea extractelor cu ajutorul coloanei SPE

Metodă de extracție prin separare cu ajutorul coloanei special pentru SPE (extracție pe fază solidă) (Chromabond C18). Metoda de extracție este o metodă originală, sugerată de Prof. Klaus Stolze din cadrul Institutului de cercetare de Farmacologie biochimică și Toxicologie moleculară din Universitatea de Medicină Veterinară din Viena.

Prin această metodă s-a dorit obținerea unor fracții din plantă pentru o mai bună separare a substanțelor component. Materialul folosit a fost *A. absinthium* cumpărată sub formă de Ceai de pelin (producător Stef Mar S.R.L., Râmnicu Vâlcea).

În prealabil materialul vegetal a fost pisat în cu ajutorul mojarului cu pistil iar apoi a fost încărcat în coloana SPE. Solvenții utilizați în cele 4 etape ale extracției au fost: n-Hexan, etanol, metanol, amestec metanol / apă 50%/50%, apă. Astfel au rezultat cinci tipuri de extracte

Extracția pentru fiecare solvent în parte s-a realizat de 2 ori. Cantitatea de amestec rezultată (solvent-constituenți preluați din materialul vegetal) a fost evaporată.

Toate extractele rezultate au fost evaporate de solvent în vacuo și redizolvate în metanol sau în faza mobilă în funcție de tipul de analiză realizată.

Avantajul acestei metode de preparare a extractelor cu ajutorul coloanei SPE este că s-a dovedit o metodă ideală pentru o separare cât mai bună a compușilor din plantă, separare care face analiza HPLC mai eficientă.

Dezavantajul însă decurge din același fapt, această separare fină a compușilor face aceste fracții utilizabile doar pentru HPLC, analizele ulterioare dovedind ineficacitatea acestor fracții *in vitro* (fapt cauzat cel mai probabil datorită necesității prezenței compușilor în amestec, efectul lor fiind potențat sub această formă).

Obținerea extractelor de cloroform

Tehnica de lucru a constat din utilizarea a 3 g produs vegetal. Acestea au fost dizolvate în 80 ml cloroform iar amestecul rezultat a fost agitat timp 10 minute la temperatura camerei. Extractul rezultat a fost evaporat de solvent în vacuo și redizolvat în metanol sau în faza mobilă în funcție de tipul de analiză realizată.

Realizarea unor extracte din părțile aeriene ale plantelor prin macerare cu diclormetan

Plantele utilizate au fost *A. dracunculus* și *A. abrotanum*. În flacoane Erlenmayer de 250 ml s-au introdus câte 16 g frunze proaspăt recoltate. S-au lăsat la macerat pentru 2 săptămâni. Apoi amestecul a fost filtrat și solventul evaporat în vacuo cu ajutorul rotavaporului.

Metoda de realizare a uleiurilor esențiale

Au existat 2 metode de realizare, una preluată din literatura de specialitate și una propusă de Prof. Klaus Stolze.

I. Prima a fost cea preluată din literatura de specialitate și în cazul căreia s-a utilizat doar frunze sau flori după caz însă material proaspăt și care prevede extracția uleiurilor esențiale din surse vegetale cu ajutorul distilării la abur.

În vederea extracției uleiurilor volatile s-a folosit un dispozitiv de tip Clevenger. Produsul vegetal a constat din material proaspăt format din frunze de *A. abrotanum*, *A. dracunculus* și frunze și flori de *A. vulgaris* și *A. absinthium*. Materialul a fost exact cântărit (cantitatea folosită a fost în medie de 15 g) și introdus în balonul aparatului. S-a adăugat aproximativ 150 ml de apă distilată. Acest volum a fost completat pe toată durata distilării. Se lasă 3-4 ore la distilare (viteza de distilare este moderată). După terminarea timpului de distilare și de răcire a refrigerentului se coboară încet stratul de ulei în tubul gradat.

Întreaga cantitate de soluție obținută a fost apoi supusă unei extracții cu ajutorul unui balon de extracție și cu diclormetan. Au fost testați mai mulți solvenți (diclormetan, pentan, hexan) și s-a concluzionat faptul că diclormetanul este cea mai bună soluție. Amestecul de solvent și ulei esențial rezultat în urma extracției a fost evaporat de solvent.

II. A doua metodă de obținere a uleiurilor esențiale este format din 2 etape separate și are ca bază pentru distilare extractul rezultat printr-o metodă originală.

1. Etapa de extracție bazată pe agitarea continuă a unui amestec de plantă/solvent.
2. Distilarea extractului rezultat din prima etapă.

În cadrul etapei de hidrodistilare, pașii făcuți au fost identici cu metoda preluată din literatura de specialitate și prezentată anterior.

Avantajele metodei originale de obținere a uleiurilor esențiale sunt acelea că generează o cantitate mai mare de ulei esențial decât metoda oficială.

Dezavantajele acestei metode sunt legate de timpul mai îndelungat necesar, excesul de solvenți și consumabile precum și manopera mai prelungită necesară.

Capitolul 10.

Identificarea compușilor chimici din extractele și uleiurile esențiale ale unor plante din genul *Artemisia*

Scop și obiective

Scopul cercetării a fost acela de a identifica compușii conținuți de extractele și uleiurile esențiale obținute din plantele din genul *Artemisia*: *A. abrotanum*, *A. dracunculus*, *A. absinthium* și *A. vulgaris*.

Obiectivele noastre au fost de utilizare a tehnicii TLC/HPTLC pentru identificarea artemisininei în extractele testate, utilizare a tehnicii HPLC pentru obținerea cromatogramelor reprezentative ale extractelor și uleiurilor esențiale testate, obținerea cromatogramelor unor standarde selectate (pe baza potențialului antifungic citat în literatura de specialitate) precum și identificarea acestor standarde prin metoda de adăugare "spike" a uleiurilor esențiale și utilizare a tehnicii GC-MS pentru cuantificarea calitativă și cantitativă a compușilor conținuți de uleiurile esențiale testate.

ANALIZA EXTRACTELOR PRIN TLC / HPTLC

TLC / HPTLC a fost realizată în baza unor testări prelabile pentru determinarea celui mai bun eluent sau sistem de eluenți folosit precum și cel mai potrivit amestec de reagenți sub formă de spray. Ca și material de analizat s-au testat extractele obținute prin utilizarea coloanei SPE.

Cromatografia în strat subțire (TLC) precum și cromatografia în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) au fost realizate conform literaturii de specialitate iar evaluarea s-a făcut în funcție de caracteristicile fiecărei soluții folosite.

Astfel evaluarea s-a făcut fie ca:

- direct în spectrul vizibil sau cu ajutorul luminii UV la lungimile 254, respectiv 366nm
- în spectrul vizibil și/sau în UV la 366nm după sprayere cu reagenți de culoare

În cazul nostru au fost folosite atât plăci cu bază de aluminiu cât și plăci HPTLC speciale.

În cazul analizei TLC/HPTLC a extractelor vegetale, sistemele de eluent ideal și cantitățile necesare stabilite au fost : EtOAc / CH₂Cl₂ / HCOOH / CH₃COOH / H₂O.

Pentru o mai bună evidențiere a substanțelor conținute de extracte s-a utilizat metoda de sprayere cu reagenți de culoare, amestecul ideal de reagenți fiind (în cazul extractelor din plante): Anisaldehida/Reagent cu acid sulfuric (AS).

Consecutiv aplicării reagenților, artemisinina a putut fi identificată în cadrul extractelor prin prezenta culorii roz, evidențiate cu ajutorul lămpii cu UV, la 366 nm în cadrul extractelor testate doar în extractul etanolic de *A. absinthium*, forma uscată utilizată însă nefiind suficientă pentru o cuantificare exactă.

ANALIZA HPLC A EXTRACTELOR ȘI ULEIURILOR ESENȚIALE PREPARATE

Analiza prin HPLC realizată cu ajutorul echipamentului Shimadzu HPLC SPO –SAV cu detector cu UV la 205 nm respectiv 254 nm, cu injector LC- 6A, și cu detector Shimadzu Refractive Index precum și cu un echipament HPLC Shimadzu SCL-6B, cu autoinjector Shimadzu SIL-5B, sistem Waters Inline - Degasser și spectromonitor Milton Roy 3100. De asemenea s-a utilizat și un detector ELSD Alltech Varex MKIII. Software-ul utilizat pentru preluarea și interpretarea datelor: software class, N-2000 CHROMTECK (Shimadzu).

Artemisinina a putut fi detectată doar cu ajutorul detectorului ELSD. Sistemul ideal și folosit pentru detectorul ELSD a fost: coloana Merck 250x4.6mm, condiții izocratice 1ml/min: 30% H₂O; 50% Acetonitril, 20% MeOH, iar în cazul detectorului ELSD condițiile ideale au fost determinate ca și: Nebl 3 psi, temp drift 90°C, 2L/min. Artemisinina a fost detectată la 6,3 min (Fig. 150) doar cu ajutorul acestui tip de detector atașat la HPLC.

În urma analizării cu HPLC cu detector de UV s-au detectat și celelalte standarde, identificarea standardelor în uleiurile esențiale testate fiind realizată prin utilizarea tehnicii de adăugare "spike" a uleiurilor esențiale cu fiecare standard în parte. Linaloolul a fost identificat la 32,365 minute, cineolul, compus dintr-un

amestec de izomeri a produs o serie de 5 peak-uri la: 41,485 min, 43,885 min, 44,780 min, 45,885 minute. α -*tuiona* a generat un peak la 33,065 minute, β – *cariofilenul* la 42,832 minute iar eugenolul la 27,740 minute.

Anexa 3 cuprinde curbele de calibrare ale standardelor urmărite, curbe de calibrare care au demonstrat liniaritatea analizei efectuate prin HPLC.

ANALIZA GC-MS A ULEIURILOR ESENȚIALE PREPARATE

Analiza GC/MS a fost realizată în cadrul Institutului de Botanică și Farmacognozie din Universitatea de Medicină Veterinară din Viena, datorită ajutorului d-lui Prof. Remigius Chizzola și d-lui Prof. Franz Chlodwig.

GC/MS a fost realizată în cazul uleiurilor esențiale și anume: *A. absinthium* rezultat din distilarea extractului obținut prin extracție cu diclormetan, *A. abrotanum* (ambele variante de obținere), *A. dracunculus* (ambele variante), *A. vulgaris* (ambele variante).

Analiza prin GC/MS a fost realizată cu ajutorul aparatului Hewlett-Packard 6890 GC legat la un detector cuadripol selectiv de masă Hewlett-Packard 5973.

Separarea a fost realizată cu o coloană Zebtron ZB-5MS cu lungime de 27 m, diametrul interior de 250 μ m mm și grosimea filmului de 0,25 μ m. Condițiile analitice pentru GC/MS au fost: gazul utilizat a fost heliu cu un debit constant de 1.3 mL/min, temperatura injectorului a fost de 250°C, volumul injectat a fost de 1 μ l iar split ratio utilizat a fost de 20:1. Temperatura programului utilizată a fost: 60°C pentru un minut, apoi crescută la o rată de 5°C/min până la 220°C, ulterior la 15°C/min până la 280°C, iar la final susținută izoterm la 280°C pentru un minut. Linia de transfer către MSD a fost setată la 280°C și condițiile de scanare au fost M/Z 40-300 la o viteză de 1,75 scanări/sec. Ca și standard intern s-a utilizat Bifenilul (mg/m).

Compoziția uleiurilor esențiale au fost identificați prin compararea timpilor de retenție relativi și a spectrelor de masă cu cele din Registrul datelor spectrelor de masă și citărilor din literatura de specialitate.

Toate analizele GC/MS efectuate au evidențiat prezența substanțelor cu efect antifungic citat de literatura de specialitate, în afară de cele identificate prin HPLC. Aceste substanțe sunt: davanona, eugenolul precum și terpineol. Toate cromatogramele și tabelele cu compușii identificați raportați fiecărui ulei esențial testat sunt prezentate în Anexa 2.

În uleiul esențial de *A. dracunculus* (extract CH_2Cl_2) 10 constituenți au fost identificați și cuantificați prin analiza GC-MS. Uleiul esențial de *A. dracunculus* (din extract) a fost bogat în derivați de davanonă (26%), urmată de herniarină (13%), nordavanonă, ulei de davanonă și *cis-davanonă* (11%), fitol izomer (7%), derivați de davanonă (4%), eugenol, metileugenol (2%) și un element constitutiv necunoscut (23%).

Din uleiul esențial de *A. dracunculus* (din frunze) au fost identificați și analizați cantitativ prin GC-MS, 15 constituenți. Analiza a relevat că uleiul esențial *A. dracunculus* conține o mare cantitate de estragol (85%) și herniarin, 7-metoxicumarină (4%), metal-eugenol și trans-ocimen (2%), chavicol, eugenol, E - metilcinamat, *cis-davanonă*, davanonă derivat, fitol izomer și *cis-ocimen* (1%). Germacrenul D, g-decalactona, biciclogermacrena, și allo-ocimenul au fost identificați, dar în cantități nesemnificative.

Uleiul esențial de *A. vulgaris* (extract CH_2Cl_2) a fost bogat în *cis-crizantenilacetat* (19%), borneol și terpinen-4-ol (17%), spatulenol (9%), α -terpineol (8%), camfor (7%), eugenol (4%), fenil-etilalcol și oxid de cariofilen (3%), d-cadinen, b-selinen, germacrenul D, 1,4-p-metadiena-7-ol, cuminol, p-cimen -8-ol (2%) și farnesen (1%).

Uleiul esențial de *A. vulgaris* din materialul vegetal a conținut în principal terpinen-4-ol (18%), urmat de spatulenol (12%), acid hexadecanoic și tau muurolol (11%), terpineol (10%), oxid de cariofilen (8%), cuminol (7%), borneol (5%), eugenol și 1,4-p-mentadien-7-ol (4%), linalool oxid și sabinen hidrat/hidroxicitronel (3%), feniletil alcool și trans-carveol (2%). Urme de germacren D au fost, de asemenea, identificate.

În uleiul esențial de *A. abrotanum* (extract CH_2Cl_2) 10 constituenți au fost identificați prin analiza GC-MS. Analiza a relevat faptul că acest ulei esențial preparat a fost bogat în *cis davanonă* (47%), urmată de nordavanonă (34%), estragol (6%), *cis- β -terpineol* și terminen 3-ol (5%) și *cis-piperiton oxid* (3%).

În uleiul esențial de *A. abrotanum* (material vegetal) 11 constituenți au fost identificați din punct de vedere calitativ și cantitativ prin GC-MS. Analiza chimică a arătat că ulei esențial de *A. abrotanum* a fost bogat în *cis-davanonă* (27%), urmate de eter davanonă, nordavanonă, ulei de davanonă (16%), 1-terpineol (8%), t-piperitol și phytol izomer (7%), *cis- β -terpineol* (6%), estragol și eter de davanonă (5%) și piperitonă (3%). Doi constituenți au rămas neidentificați.

În uleiul esențial de *A. absinthium* (extract CH_2Cl_2) 13 constituenți au fost identificați și determinați cantitativ prin analiza GC-MS. Sa constatat că principalul constituent al uleiului esențial de *A. absinthium* obținut din extract a fost β -*tuiona* (21%), nerol, α -bisabolon (16%), spatulenol (9%), herniarină, metoxiumbeliferon (8%), estragol (7%), bisabololoxid (5%), oxid de cariofilen, *cis-crizantenil acetat* și geraniol (4%), *izo-3-tuianol* (3%) și eugenol (1%).

Cei mai importanți compuși esențiali din uleiurile testate sunt prezentați în anexa 4.

Fracțiunile volatile studiate au arătat o mare diversitatea chimică. Cele patru specii de pelin au avut tipare volatile distincte și au prezentat, de asemenea, diferențe în compoziție între cele două tipuri de uleiuri diferite, uleiul obținut din planta distilată și din extractul de CH_2Cl_2 , din aceeași specie, așa cum este prezentat în anexa 4.

A. abrotanum a fost caracterizată de sesquiterpena davanonă și derivații săi, care nu au putut fi toți identificați. Monoterpenele cum ar fi 1-terpineol sau trans-piperitol și fenilpropanoid estragol au fost prezenți numai în cantități foarte mici. Toți compușii principali găsiți în uleiul distilat au fost, de asemenea, prezenți și în uleiul obținut din extractul diclorometanic.

Compusul principal din uleiul de *A. dracunculus* a fost estragolul, aceasta a reprezentat aproximativ 80% din ulei. Cu toate acestea, în uleiul obținut din extract acest compus nu a mai putut fi recuperat. S-au găsit în schimb cantități mici de fenilpropanoid chavicol și metileugenolul. Aceste uleiuri din extracte au conținut, de asemenea, unele davanone și derivații lor. Atât, uleiul obținut prin distilarea direct a plantei cât și cel obținut din extract au conținut un compus derivat de cumarină și anume herniarina.

Din *A. absinthium* doar un extract de CH_2Cl_2 a fost obținut. Peak-ul principal în cromatogramă nu a putut fi identificat. În plus, uleiurile au încorporat β -tuiona și nerolul ca compuși majoritari și estragolul, spatulenolul și α -bisobololul ca alte componente majore. Herniarina a fost, de asemenea, prezentă în acest ulei.

Principalele componente volatile în *A. vulgaris* au fost 1,8-cineolul, terpinen-4-ol-ul și borneolul. O diferență notabilă între cele două preparate volatile a fost faptul că 1,8-cineol, principalul compus din uleiul obținut din extractul de CH_2Cl_2 , nu a fost regăsit în uleiul distilat obținut din planta distilată.

Cis-și nordavanona, estragolul, uleiul de davanonă, β -tuiona, herniarin, nerolul, cis-crizantenil acetat, terpineolul, borneolul, terpinen-4-ol, cis- β -terpineolul, eugenolul, camforul, spatulenolul, oxidul de cariofilen și metileugenolul au fost principalele componente ale uleiurilor de *Artemisia*.

Descoperirile noastre sugerează ca *A. absinthium* din Austria aparține chemotipul de ulei bogat în tuionă.

Cele două proceduri diferite de preparare a uleiului esențial au dus la produse cu compoziție chimică diferită.

Astfel, uleiul esențial obținut din *A. vulgaris* (material vegetal) a aparținut tipului bogat în monoterpene și terpinen-4-ol, similar cu tipurile de *A. vulgaris* din Franța.

Uleiul esențial obținut din extract a fost bogat într-un monoterpenuid: cis-crizantenil acetat, similar cu unele uleiuri esențiale de *A. vulgaris* din Lituania. Cu toate acestea nu s-au găsit date în literatură în ceea ce privește prezența acetatului de crizantenil în uleiuri esențiale de *Artemisia*.

Cele două forme de uleiuri esențiale obținute din *A. dracunculus* au avut ca și compus comun major o cumarină cunoscut: herniarin, rezultând astfel o compoziție chimică asemanătoare cu tarhon francez și canadian.

Cele două tipuri de uleiuri esențiale obținute din *A. abrotanum* au avut în comun ca și compus major: cis-davanona.

Capitolul 11.

Testarea in vitro a extractelor și uleiurilor esențiale produse din plante de genul *Artemisia* pe *Candida albicans*

Au fost luate în studiu uleiurile esențiale din *A. absinthium*, *A. abrotanum*, *A. dracunculus* și de *Artemisia vulgaris*, standardele linalool, cineol, tuiona, cariofilenul și eugenolul, fiind testate atât singure, cât și în combinații de amestecuri egale de standarde, și au fost testate pentru activitatea antimicrobică față de specia *Candida albicans* (ATCC 10231), prin Metoda Discurilor, conform Normelor Standard pentru Testarea Sensibilității Antimicrobiene a Discurilor Impregnate. Metodologia utilizată a fost realizată conform normelor microbiologice.

Testarea in vitro s-a efectuat în 3 plăci, conținând câte un microcomprimat de Nistatin iar hârtiile de filtru conțin următoarele uleiuri esențiale și extracte în funcție de numerotare.

După testarea standardelor singure s-a continuat cu testarea amestecurilor de standard pentru a se putea concluziona existența potențialului antifungic al standardelor sau inexistența acestuia, efectul sinergic sau antagonist al acestora în amestecuri. Toate amestecurile au fost realizate prin amestecul a unor cantități egale de standard lichide pure (50%/50%, amestec de 50 μ l). Testările in vitro a extractelor obținute au avut rezultate negative, extractele neprezentând activitate fungicidă.

Testele și analiza GC-MS sugerează că numai anumiți constituenți specifici au activitate antifungică și cel mai probabil davanona, linaloolul și eugenolul, vor fi utilizate mult mai frecvent în cercetările viitoare.

Toate uleiurile au cauzat un efect fungicid, așa că putem concluziona că compușii găsiți în cantități diferite sunt responsabili pentru acest efect, dar este dificil să se atribuie activitatea dintr-un amestec complex unui singur element constitutiv.

Uleiurile esențiale au dat toate rezultate pozitive în următoarea ordine descrescătoare: *A. abrotanum* > *A. abrotanum* (CH₂Cl₂) > *A. vulgaris* (CH₂Cl₂) > *A. vulgaris* > *A. dracunculul* > *A. dracunculul* (CH₂Cl₂) > *A. absinthium* (CH₂Cl₂).

Standardele testate au avut efect fungicid în următoarea ordine descrescătoare: eugenol > linalool > cariofilen > tuionă > cineol.

Consecutiv raportării procentuale a eficacității uleiurilor și extractelor (din punct de vedere al dimensiunii zonei de inhibiție) la eficacitatea antifungicului selectat (Nistatin) putem realiza următoarea clasificare:

Uleiuri esențiale cu o eficacitate mai mare decât Nistatinul exprimată procentual astfel:

- uleiul esențial de *A. abrotanum* cu eficacitate mai mare cu 11.9% decât Nistatinul,
- uleiul esențial de *A. abrotanum* (CH₂Cl₂) cu eficacitate mai mare cu 2.3% decât Nistatinul,
- uleiul esențial de *A. dracunculul* cu eficacitate egală cu a Nistatinului.

Uleiuri esențiale cu o eficacitate mai scăzută decât a Nistatinului, exprimată procentual:

- uleiul esențial de *A. vulgaris* (CH₂Cl₂) cu eficacitate mai scăzută cu 19%, comparativ cu Nistatinul,
- uleiul esențial de *A. vulgaris* cu eficacitate mai scăzută cu 20%, comparativ cu Nistatinul,
- uleiul esențial de *A. dracunculul* cu eficacitate mai scăzută cu 26%, comparativ cu Nistatinul,
- uleiul esențial de *A. dracunculul* (CH₂Cl₂) cu eficacitate mai scăzută cu 38%, comparativ cu

Nistatinul,

- uleiul esențial de *A. absinthium* cu eficacitate mai scăzută cu 38%, comparativ cu Nistatinul,
- extractul de *A. abrotanum* cu eficacitate mai scăzută cu 66%, comparativ cu Nistatinul.

Standardele au rezultat în următoarea raportare a eficacității:

- eugenolul cu eficacitate mai mare cu 32.2%, comparativ cu Nistatinul,
- linaloolul cu eficacitate mai scăzută cu 31.7%, comparativ cu Nistatinul,
- cariofilenul cu eficacitate mai scăzută cu 60.9%, comparativ cu Nistatinul,
- tuiona cu eficacitate mai scăzută cu 65.8%, comparativ cu Nistatinul,
- cineolul cu eficacitate mai scăzută cu 67.8%, comparativ cu Nistatinul.

Amestecurile de standarde au rezultat în diferite procente de eficacitate, cele pozitive fiind:

• eugenolul în amestec egal cineolul a avut o eficacitate mai ridicată cu 13.7%, comparativ cu Nistatinul,

• eugenolul în amestec egal cu cariofilenul a avut o eficacitate mai ridicată cu 11.7%, comparativ cu Nistatinul,

• eugenolul în amestec egal cu tuiona a avut o eficacitate mai ridicată cu + 49%, comparativ cu Nistatinul,

• eugenolul în amestec egal cu linaloolul, cineolul, cariofilenul și tuiona au avut o eficacitate mai mare cu 111%, comparativ cu Nistatinul,

• eugenolul în amestec egal cu linaloolul, cariofilenul și tuiona au avut o eficacitate mai mare cu 123.5%, comparativ cu Nistatinul,

• eugenolul în amestec egal cu linaloolul și tuiona au avut o eficacitate mai mare cu 35.29%, comparativ cu Nistatinul.

Ca și consecință a testărilor efectuate putem enunța că *A. abrotanum* este cea mai promițătoare plantă cu aplicabilitate fito-medicația candidozelor.

Eugenolul este standardul cu cel mai mare potențial antifungic dintre standardele testate.

În urma analizei rezultatelor obținute, cineolul testat ca și standard singur a dovedit un efect fungicide mediu, însă în cadrul combinațiilor de standard testate, prezența cineolului s-a dovedit inhibitoare. Mecanismele chimice care dau naștere acestui fenomenului chimic sunt încă neclare.

Tuiona ca și standard simplu are un efect fungicid slab, însă în cadrul combinațiilor testate, tuiona a avut un efect potențator. Mecanismul chimic este încă necunoscut.

Capitolul 12.

Aspecte histo-citologice la animalele de laborator infectate experimental cu *Candida albicans* și tratate cu eugenol

12. 1. Aspecte histo-citologice la șobolani masculi infectați experimental cu *Candida albicans* și tratați cu eugenol

Scopul cercetării

Eugenolul (4-alil-2 metoxifenol) este un compus fenolic prezent în natură, mai ales în anumite plante. Consecutiv analizelor GC/MS realizate în Capitolul 12 și analizele microbiologice realizate în Capitolul 13, am evaluat eugenolul ca fiind compusul cu cel mai mare potențial antifungic, acest fapt făcându-l candidatul ideal pentru testarea in vivo.

Activitatea anti-candida a compusului fenolic din plantele *Artemisia* - eugenol - a fost studiată, fiind raportată la eficacitatea terapeutică în tratamentul candidozei orale experimentale induse la șobolani masculi imunosupresați.

Obiectiv

Experimentul a fost conceput in vivo conform protocolului realizat de Chami și col. pentru identificarea cu certitudine a efectelor tratamentului cu eugenol a infecțiilor cu *Candida albicans* apărute pe fond imunosupresiv la șobolani consecutiv infecției orale, pe organele țintă și evaluarea modificărilor histocitologice ale organelor la masculii de șobolan Wistar imunosupresați, infectați experimental cu *Candida albicans* și tratați cu eugenol.

Animalele

Experimentul in vivo realizat pe linii de șobolani Wistar, masculi tineri cu aproximativ aceeași greutate, (greutatea medie de 190 ± 10 grame). Pentru experiment au fost utilizați șobolani imunosupresați pentru a se evidenția evoluția infecției cu *Candida albicans*. Animalele au fost întreținute în spații destinate acestui scop, cu temperatură și lumină controlate (22°C , ciclu de 12 ore începând cu ora 8), și au avut acces liber la hrană și apă *ad libitum*.

Șobolani au fost imunodepresați cu dexametazonă (Dex) ^(Corthametasona, Vetoquinol) și tratați cu tetraciclina 4% pulbere hidrosolubilă (Tc) ^(Laprophan) timp de o săptămână înainte de infecția experimentală; șobolani au primit apă potabilă cu 0,5 mg / litru de dexametazonă cu tetraciclina (0,1%).

În ziua de infecție, doza de dexametazonă a fost ridicată la 1 mg / litru, în timp ce tetraciclina a fost redusă la concentrația de 0,01% și a fost menținută pe toată durata experimentului.

Șobolani au fost infectați pe cale orală, de două ori, la intervale de 24 h (zilele 0 și 1) cu 0,1 ml de suspensie salină care a conținut $3.108 \text{ } 3,1 \times 10^3$ celule viabile de *C. albicans*, tulpina ATCC 10231 (fig. 188).

Tratamentul a fost realizat cu eugenol cumpărat de la Sygma Aldrich, Germania și Nistatin.

Loturile

Seria experimentală a fost constituită din trei loturi formate fiecare din câte cincisprezece indivizi:

- ICAE - constituit din masculi imunosupresați, infectați cu *C. albicans* și tratați cu eugenol,
- ICAN - constituit din masculi imunosupresați, infectați cu *C. albicans* și tratați cu Nistatin
- ICA - constituit din masculi imunosupresați, infectați cu *C. albicans* și la care li s-a administrat placebo (ser fiziologic)

Loturile de animale care au fost imunosupresate și infectate, dar la care s-a administrat ser fiziologic au fost utilizate ca și grupul de control negativ.

Toate animalele au fost imunosupresate pe durata unei săptămâni pre-infecție. Animalele au fost infectate în ziua 0 și 1 a experimentului, după care a început tratamentul pe o durată de șapte zile. Șobolani (câte cinci din fiecare lot) au fost eutanasiați după 3, 6 și respectiv 9 de zile de la infectare și s-au recoltat probe în vederea realizării unor investigații histocitologice. Lotul tratat cu eugenol a primit 0.5 mL eugenol (24 mM) oral de două ori pe zi, timp de opt zile. Lotul tratat cu antifungicul Nistatin a primit o suspensie de 0.5 mL. Lotul considerat lotul de control a primit 0.5 mL ser fiziologic în aceleași condiții. Substanțele au fost diluate în soluție de agar 0.8% (180).

Limba, splina, rinichii, ficatul și intestinul au fost recoltate și au fost prelucrate după tehnica histologică cunoscută și colorate HE (hematoxilină - eozină). Microscopia a fost efectuată la obiectivele x 100, x 200, respectiv x 400. Secțiunile histologice sunt prezentate în figurile 189 – 199.

Consecutiv infectării și administrării în cadrul tratamentului a trei tipuri diferite de substanțe rezultatele obținute sugerează eugenolul ca și un potențial drog cu eficacitate în tratarea candidozei. Rezultatele obținute în urma tratării infecției experimentale cu eugenol sunt comparative cu cele obținute consecutiv administrării antifungicului Nistatin.

Principalele alterări ale arhitectonicii cito-histologice s-au identificat în cazul lotului infectat și tratat cu serul fiziologic, considerat ca și lot de control. În acest caz, modificările au fost observate în principal în organele: limbă, intestin, ficat, splină și respectiv rinichi.

Examinând histologic limba, modificările au fost înregistrate doar în cazul indivizilor din lotul de animale imunosupresate, infectate și tratate placebo. Limba indivizilor imunosupresați, infectați și tratați cu eugenol sau Nistatin fiind fără nici un fel de modificare histologică.

În cazul lotului de șobolani imunosupresați, infectați și tratați cu placebo s-a observat evoluția progresivă a gravității leziunilor histologice pornind din prima zi de sacrificare către sfârșitul perioadei, principalele modificări fiind: distrofia celulelor epiteliale linguale cu discontinuitatea membranei bazale paracheratoza și acantoza.

La nivelul intestinului, la șobolani imunosupresați, infectați și la care li s-a administrat doar ser fiziologic, principalele leziuni fiind evidente în cadrul rezultate observate din analiza cito-histologică a organelor prelevate în ziua a treia de tratament. Aceste modificări au constat din distrugerea pe suprafețe întinse a vilozităților intestinale, edemul discret al axului vilozităților, infiltrări limfo-histiocitare periglandular.

În cazul șobolanilor imunosupresați, infectați și tratați cu eugenol și Nistatin aceste modificări nu au fost prezente, singura modificare prezentă în cazul ambelor loturi a fost edemul discret al glandelor intestinale.

La nivel hepatic, în cazul lotului tratat cu placebo, s-au observat procese de tip degenerativ ale hepatocitelor cu distrofie balonizantă însoțită de fenomene de carioliză și cariopicnoză care au afectat funcția hepatică și integritatea celulară. Într-o mai mică măsură aceste modificări au fost observate și în cazul loturilor tratate cu eugenol sau nistatin, această reacție hepatică fiind în principiu atribuită medicației imunosupresive.

La nivel splenic ca și consecință a imunosupresiei și infecției, s-a observat o reducere dramatică în prima fază a zonelor de leucopoeză.

În cazul masculilor infectați și tratați cu ser fiziologic, limfonodulii splenici sunt prezenți doar sub forma de cordoane limfocitare. Acest fapt care nu este evidențiat în cazul secțiunilor histologice realizate din splina prelevată de la șobolanii tratați cu eugenol și nistatin, acest fenomen putând fi explicat prin interferența substanțelor active la nivel leucocitar, deblocând proliferarea leucocitară, reactivitate interferată se pare de către *C. albicans*.

La nivel renal după trei zile s-a constatat în cazul masculilor imunosupresați, infectați și tratați cu ser prezența unor modificări mai grave care au inclus afectat în mod grav funcția renală. Fenomenele evidențiate histologic au fost: degenerescență extinsă exprimată prin intumescența turbure a nefrocitelor din tubii contorși, dispariția spațiilor urinifere și distrucția capsulei Bowman. În cazul secțiunilor prelevate în ziua a șasea, a fost evidențiată glomerulonefrită. În ziua a noua aceste modificări devenind de intensitate mai scăzută.

În cazul masculilor imunosupresați, infectați și la care li s-a administrat fie eugenol, fie nistatin aceste modificări au fost mult mai reduse și ca intensitate și ca extindere ele ne mai fiind prezente din ziua a șasea de tratament. Rezultatele obținute pot încadra eugenolul în aceeași grupă de eficacitate cu antifungicul Nistatin. Eficacitatea *in vivo* asupra candidozei orale implementate experimental ne permite să considerăm eugenolul un agent antifungic puternic și poate fi propus ca și agent terapeutic pentru candidoza orală și prin urmare se vor lua în considerare în viitor studiile farmacocinetice și toxicologice ale acestuia. Eugenolul nu a provocat toxicitate acută la șobolanii tratați.

12. 2. Aspecte histo-citologice preliminare la femelele de șobolan infectate experimental cu *Candida albicans* și tratate cu eugenol

Scopul cercetării

Candidoza vulvo-vaginală este o afecțiune comun răspândită care afectează aproximativ o treime din toate femeile, cel puțin o dată în viață. Aproximativ 5% dintre aceste femei sunt supuse la atacuri recurente de candidoză vaginală. Este adesea asociată cu alte afecțiuni, cum ar fi diabetul zaharat, antibioterapia, corticoterapia și sarcina, deși în multe cazuri, nu există factori clar predispozanți.

Efectul antifungic al uleiurilor esențiale a fost remarcat în mai multe studii. Activitatea specifică anticandida este, de asemenea, prezentată în literatura de specialitate. Compusul fenolic eugenol a dovedit o foarte bună eficacitate *in vitro* în testele antifungice realizate de noi aceste rezultate pozitive generând necesitatea completării lor cu un experiment *in vivo*.

Obiectiv

Se propune un studiu *in vivo* pentru identificarea cu certitudine a efectelor tratamentului cu eugenol a infecțiilor cu *Candida albicans* apărute pe fond imunosupresiv la femele de șobolan Wistar consecutiv infecției genitale pe organele țintă și evaluarea modificărilor histo-citologice ale organelor la loturile luate în studiu consecutiv unui tratament aplicat cu eugenol, Nistatin și placebo (ser fiziologic).

Animalele

Experimentul a fost conceput *in vivo* conform protocolului realizat de Chami și col. pe linii de șobolani Wistar, femele tinere cu aproximativ aceeași greutate, (greutatea medie de 190 ± 10 grame). Pentru experiment au fost utilizați șobolani imunosupresați pentru a se evidenția evoluția infecției cu *Candida*

albicans. Animalele au fost întreținute în spații destinate acestui scop, cu temperatură și lumină controlate

(22°C, ciclul de 12 ore începând cu ora 8), și au avut acces liber la hrană și apă *ad libitum*.

Metoda

Femelele au fost imunodepresate cu dexametazonă (Dex) ^(Corthametasone, Vetoquinol) și tratate cu tetraciclina 4% pulbere hidrosolubilă (Tc) ^(Laprophan) timp de o săptămână înainte de infecția experimentală, femelele au primit apă potabilă cu 0,5 mg / litru de dexametazonă cu tetraciclina (0,1%). În ziua de infecție, doza de

dexametazonă a fost ridicată la 1 mg / litru, în timp ce tetraciclina a fost redusă la concentrația de 0,01% și a fost menținută pe toată durata experimentului.

Infecția

Femelele au fost infectate pe cale genitală, de două ori, la intervale de 24 h (zilele 0 și 1) cu 0,1 ml de suspensie salină care a conținut $3.108\ 3,1 \times 10^6$ celule viabile de *C. albicans*, tulpina ATCC 10231.

Loturile

Seria experimentală a fost constituită din trei loturi formate fiecare din câte cincisprezece femele:

- ICAE - constituit din femele imunosupresate, infectate cu *C. albicans* și tratate cu eugenol,
- ICAN - constituit din femele imunosupresate, infectate cu *C. albicans* și tratate cu Nistatin
- ICA - constituit din femele imunosupresați, infectate cu *C. albicans* și la care li s-a administrat

placebo (ser fiziologic)

Loturile de animale care au fost imunosupresate și infectate, dar la care s-a administrat ser fiziologic au fost utilizate ca și grupul de control negativ. Toate animalele au fost imunosupresate pe durata unei săptămâni pre-infecție. Animalele au fost infectate în ziua 0 și 1 a experimentului, după care a început tratamentul pe o durată de șapte zile. Femelele (câte cinci din fiecare lot) au fost eutanasiate după 3, 6 și respectiv 9 de zile de la infectare și s-au recoltat probe în vederea realizării unor investigații histocitologice. Scheletul experimentului este prezentat schematic în figura 201.

Lotul tratat cu eugenol a primit 0.5 μ L (~4 mg/animal) oral de două ori pe zi, timp de opt zile. Lotul tratat cu antifungicul Nistatin a primit o suspensie de 0.5 μ L (~ 0.054 mg/animal s.a.). Lotul considerat lotul de control a primit 0.5 mL ser fiziologic în aceleași condiții. Toate substanțele active administrate au fost diluate într-o soluție de agar 0.8%.

Fragmentele de țesut recoltate din ovar, splină, rinichi și ficat, destinate investigațiilor citohistologice. Secțiunile histologice rezultate sunt prezentate în figurile 201 – 209.

Principalele modificări din punct de vedere histologic au fost observate în: ficat, splină, rinichi și respectiv ovar.

În cazul lotului de șobolani imunosupresați, infectați cu *Candida albicans* și tratați cu eugenol, rezultatele sunt comparative cu cele ale lotului de șobolani imunosupresați, infectați cu *Candida albicans* și tratați cu Nistatin. Modificările rezultate de imunosupresie și infecție au fost diminuate de la începutul experimentului (ziua a III-a) și chiar anulate la analizele următoare (ziua a VI-a și a IX- a).

În urma analizei secțiunilor histologice realizate pe ovar, în cazul lotului imunosupresat, infectat și

tratată cu placebo (ser fiziologic), s-au constatat leziuni degenerative ale ovocitelor însoțite de edemul

foliculilor ovarieni în regiunea corticală. În cazul loturilor imunosupresate, infectate și tratate cu substanțele active, rezultatele sunt similare și nu indică nici o modificare, aspectul histologic fiind unul normal. Singura asemănare dintre cele trei loturi, asemănare atribuită cel mai probabil fenomenului de imunosupresie a fost

instalarea degenerescenței celulelor interstițiale responsabile de secreția hormonilor sexuali la ambele loturi.

La nivel hepatic, în ziua a treia și a șasea s-au observat procese de tip degenerativ ale hepatocitelor cu

distrofie balonizantă însoțită de fenomene de carioliză și cariopicnoză care afectează funcția hepatică și

integritatea celulară la femelele imunosupresate, infectate și tratate cu eugenol sau nistatin (într-o mică măsură), cât mai ales la cele imunosupresate, infectate și tratate cu placebo. Această reacție hepatică fiind în principiu atribuită medicației imunosupresive fiind și ea slab prezentă în cazul loturilor tratate cu eugenol sau nistatin. Aceste modificări însă nu au mai fost prezente din ziua a șasea de tratament când structura citoplasmatică și nucleară a hepatocitului a revenit la normal.

În cazul rinichiului, după trei zile s-a constatat în cazul femelelor infectate, imunosupresate și tratate cu ser fiziologic, instalarea fenomenelor degenerative, manifestate prin intumescența turbure a nefrocitelor din tubii contorți și distrucția capsulei Bowman Acest fenomen a tins spre glomerulonefrită până spre sfârșitul experimentului, modificările rezultate fiind ireversibile.

În cazul femelelor imunosupresate, infectate și tratate cu eugenol sau nistatin, aceste modificări au fost mult mai reduse și ca intensitate și ca extindere.

La nivel splenic în ambele situații se constată reducerea dramatică a zonelor de leucopoeză fenomen care afectează decisiv funcția leucoformatoare, zonele de eritropoeză rămânând nemodificate.

În cazul femelelor infectate, limfonodulii splenici rămân sau sunt prezenți doar sub forma unor cordoane limfocitare, infecția cu *Candida albicans* blocând evoluția așteptată și acceptată în bolile infecțioase, aceea de reactivitate și proliferare leucocitară.

Dozele de eugenol utilizate de noi în cadrul experimentului au fost atât de scăzute încât nu s-a observat nici o toxicitate la nivelul căii de administrare. Mai mult, eugenolul, fiind un compus natural are avantajul de a avea molecule volatile care pot penetra zone de țesut inaccesibile altor substanțe antifungice.

Capitolul 13

Concluzii generale

Din prezenta teză au reieșit în total: 92 de concluzii generale precum și contribuții personale cu recomandări.

Bibliografia

Prezenta teză se sprijină pe 237 de titluri bibliografice din care din surse web 59 și respectiv 3 titluri de lucrări originale publicate din topicul tezei