

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„N. TESTEMIȚANU”

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 615.276:615.324:595.7(043.2)

GUȚU INA

PROPRIETĂȚILE ANTIINFLAMATOARE ALE PREPARATELOR DE  
ORIGINE ENTOMOLOGICĂ

314.01 – FARMACOLOGIE ȘI FARMACOLOGIE CLINICĂ

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific:



**Bacinschi Nicolae,**

doctor habilitat în științe medicale,  
conferențiar universitar

Consultant științific:



**Gudumac Valentin,**

doctor habilitat în științe medicale,  
profesor universitar

Autor:



**Guțu Ina**

CHIȘINĂU 2023

© Guğu Ina, 2023

## CUPRINS

ADNOTARE .....	5
LISTA ABREVIERILOR .....	8
LISTA TABELELOR .....	10
LISTA FIGURILOR .....	12
INTRODUCERE .....	14
1. PREPARATE ENTOMOLOGICE – SINTEZE, SUGESTII ȘI PERSPECTIVE .....	21
1.1 Substanțe biologice active din insecte – sursă de preparate entomologice.....	21
1.2 Proprietățile farmacologice ale preparatelor de origine entomologică .....	30
1.3 Concluzii .....	53
2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE.....	55
2.1. Caracteristica generală a studiului .....	55
2.2. Screening-ul proprietăților antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului .....	56
2.2.1. Studiul <i>in vitro</i> a proprietăților antiinflamatorii și antioxidante ale preparatelor de origine entomologică. ....	57
2.2.2. Modelarea inflamației acute exudative .....	61
2.3. Studiul acțiunii antiinflamatoare a preparatelor de origine entomologică în inflamația indusă prin lipopolizaharide.....	62
2.4. Determinarea acțiunii antiinflamatoare a imuheptinului și imupurinului în inflamația subacută.....	64
2.4.1. Modelarea inflamației subacute prin implantarea subcutanată a două discuri de fetru .....	65
2.4.2. Modelarea inflamației cronice proliferative și imune (granulomul de fetru) cu impregnarea suplimentară a discului stâng cu adjuvant Freund.....	66
2.5. Metode de cercetare a indicilor imunologici și biochimici.....	67
2.6. Prelucrarea statistică a datelor.....	70
2.7. Concluzii .....	70
3. SCREENING-ul PROPRIETĂȚILOR ANTIINFLAMATORII ȘI ANTIOXIDANTE ALE PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ.....	72
3.1. Cercetarea <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> a acțiunii antiinflamatoare a imuheptinului și imupurinului.....	72
3.2 Influența imupurinului și imuheptinului asupra inflamației induse prin lipopolizaharide.....	82
3.3. Concluzii la capitolul 3. ....	104

4. INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ ASUPRA INFLAMAȚIEI SUBACUTE .....	107
4.1. Acțiunea imuheptinului și imupurinului asupra inflamației subacute induse de corp străin.....	107
4.2. Influența preparatelor de origine entomologică asupra inflamației subacute induse de adjuvant Freund. ....	114
4.3. Concluzii la capitolul 4 .....	121
SINTEZA REZULTATELOR .....	123
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI .....	139
BIBLIOGRAFIE .....	141
ANEXE.....	155
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII .....	167
CV-ul AUTORULUI.....	168

## ADNOTARE

**Guțu Ina, „Proprietățile antiinflamatoare ale preparatelor de origine entomologică”, teză de doctor în științe medicale, 314.01- Farmacologie și farmacologie clinică, Chișinău 2023**

**Structura tezei:** introducere, 4 capitole, concluzii, recomandări, bibliografie - 200 surse, anexe - 12, 126 pagini text, 30 tabele, 27 de figuri. Rezultatele au fost publicate în 11 lucrări științifice.

**Cuvinte-cheie:** entomologic, imuheptin, imupurin, citokine, antiinflamator, antioxidant.

**Scopul studiului:** evaluarea proprietăților antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului, evidențierea posibilelor mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare și perspectiveilor de studiu clinic.

**Obiectivele cercetării:** screening-ul *in vitro* și *in vivo* a proprietăților antiinflamatorii ale preparatelor de origine entomologică autohtone; studiul influenței imuheptinului și imupurinului asupra inflamației induse de lipopolizaharide; cercetarea acțiunii imupurinului și imuheptinului asupra proceselor exudative și proliferative ale inflamației; aprecierea influenței imuheptinului și imupurinului asupra nivelului markerilor procesului inflamator și parametrilor sistemului pro- și antioxidant; evidențierea posibilelor mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare și perspectiveilor de utilizare clinică a imuheptinului și imupurinului.

**Noutatea și originalitatea științifică a cercetării:** s-au obținut date noi referitor la efectul membranostabilizator și antioxidant, influenței asupra markerilor inflamației și sistemului pro- și antioxidant ale imuheptinului și imupurinului. Au fost definite posibilele mecanisme de acțiune ale efectului antiinflamator și perspectivele studiului clinic ale imuheptinului și imupurinului.

**Problema științifică importantă soluționată în teză:** s-au obținut date referitoare la acțiunea antiinflamatoare a imupurinului și imuheptinului, ce dezvoltă direcția științifică – farmacologia preparatelor de origine entomologică.

**Semnificația teoretică a lucrării:** s-au obținut date referitoare la influența imuheptinului și imupurinului asupra sistemului de citokine, proceselor exudative și proliferative ale inflamației, corelației dintre procesul inflamator și sistemul pro- și antioxidant pe modele de inflamație.

**Valoarea aplicativă a cercetării:** imuheptinul și imupurinul au demonstrat proprietăți antiinflamatorii, cu unele particularități comparativ cu AINS și (proprietățile antioxidante, influența mai benefică asupra proceselor proliferative) și AIS (modularea citokinelor pro-și antiinflamatorii, influențarea stresului oxidativ), posibil, datorită componenței variate de substanțe biologice active și proprietăților imunotrope.

**Implementarea în practică:** date despre proprietățile antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului au fost implementate în procesul de studiu la disciplinele farmacologie și farmacologie clinică, iar metodele de investigații în procesul de cercetare.

## ANNOTATION

**Guțu Ina, „The antiinflammatory properties of the entomological preparations", PhD thesis in medical science, pharmacology and clinical pharmacology - 314.01, Chisinau 2023.**

**Structure of the thesis:** introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, bibliography of 200 titles, 12 annexes, illustrated by 30 tables, 27 figures and has 126 pages of basic text. The results obtained were published in 11 scientific papers.

**Key words:** entomological, imuheptin, imupurin, cytokines, antiinflammatory, antioxidant.

**The research aims:** to evaluate the anti-inflammatory properties of imuheptin and imupurin and determine the possible mechanisms of anti-inflammatory action and clinical study perspectives.

**Research objectives:** *in vitro* and *in vivo* screening of the anti-inflammatory properties of entomological preparations; the study of the influence of imuheptin and imupurin on inflammation induced by lipopolysaccharides, the exudative and proliferative phases of inflammation; assessing the impact of imuheptin and imupurin on inflammatory markers and the parameters of the pro- and antioxidant system; highlighting the possible mechanisms of their anti-inflammatory action and the prospects for clinical use of imuheptin and imupurin.

**Scientific novelty and originality of the research:** new data were obtained regarding the membrane-stabilizing and antioxidant effect, the influence on inflammation markers and the pro- and antioxidant system of imuheptin and imupurin. The possible mechanisms of action of the anti-inflammatory effect and the clinical trial prospects of imuheptin and imupurin were defined.

**The scientific problem important solved:** data were obtained regarding the anti-inflammatory activity of imupurin and imuheptin, which develops the scientific direction - the pharmacology of preparations of entomological origin.

**The theoretical significance of the study:** data were obtained regarding the influence of imuheptin and imupurin on the cytokine system, the exudative and proliferative processes of inflammation and the correlation between the inflammatory process and the pro- and antioxidant system on models of inflammation.

**The applicative value of research:** imuheptin and imupurin have demonstrated anti-inflammatory properties, with some particularities compared to NSAIDs (antioxidant properties, more beneficial influence on proliferative processes) and AIS (modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines, regulation of oxidative stress), possibly due to the varied composition of biologically active substances and immunotropic properties.

**Implementation of the scientific results:** facts on the anti-inflammatory properties of imuheptin and imupurin were implemented in the study process in the disciplines of pharmacology and clinical pharmacology, and investigation methods in the research process.

## РЕЗЮМЕ

диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук Гуцу Инны,  
«Противовоспалительные свойства препаратов энтомологического происхождения»,  
314.01- Фармакология и клиническая фармакология, Кишинев 2023

**Структура диссертации:** введение, 4 главы, выводы, рекомендации, библиография – 200 источников, 126 страниц текста, приложений – 12, 30 таблиц, 27 рисунков. Результаты опубликованы в 11 работах.

**Ключевые слова:** энтомологический, имугептин, имупурин, цитокины, противовоспалительный, антиоксидантный.

**Цель исследования:** исследование противовоспалительных свойств имугептина и имупурина, выявление возможных механизмов противовоспалительного действия и перспектив клинического применения.

**Задачи исследования:** скрининг *in vitro* и *in vivo* противовоспалительных свойств препаратов энтомологического происхождения; изучение влияния имугептина и имупурина на воспаление, индуцированное липополисахаридами; изучение влияния на экссудативные и пролиферативные процессы; определение влияния имугептина и имупурина на уровень маркеров воспалительного процесса и показатели про- и антиоксидантной системы; выявление возможных механизмов противовоспалительного эффекта и перспективы клинического применения.

**Новизна и научная оригинальность исследования:** получены новые данные о мембраностабилизирующем и антиоксидантном действии имугептина и имупурина, о влиянии на маркёры воспаления, на про- и антиоксидантную систему. Определены возможные механизмы действия противовоспалительного эффекта и перспективы клинических исследований имугептина и имупурина.

**Решенная научная задача:** получены данные о противовоспалительном действии имупурина и имугептина, что расширяет научное направление - фармакология препаратов энтомологического происхождения.

**Теоретическая значимость:** на моделях воспаления получены данные о влиянии имугептина и имупурина на цитокиновую систему, экссудативные и пролиферативные процессы, взаимосвязь воспалительного процесса с про- и антиоксидантной системой.

**Прикладное значение:** имугептин и имупурин продемонстрировали противовоспалительные свойства, с некоторыми особенностями по сравнению с НПВП (антиоксидантные свойства, более выраженное влияние на пролиферативные процессы) и СПВП (модуляция про- и противовоспалительных цитокинов, влияние на окислительный стресс), возможно, благодаря составу биологически активных веществ и иммуотропных свойств.

**Внедрение научных результатов:** данные о противовоспалительных свойствах имугептина и имупурина внедрены в учебный процесс по фармакологии и клинической фармакологии, а используемые методы в изучении - в исследовательский процесс.

## LISTA ABREVIERILOR

AAPH - 2,2'-azobis-(amidinopropan) diclorhidrat  
AAT – activitate antioxidantă totală  
ABTS - acidul 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)  
AGE – produșii finali de glicare avansată  
AIQ – abaterea intercuartilă  
ADN – acid dezoxiribonucleic  
ARN - acid ribonucleic  
ARNm – ARN mesager  
CAT - catalaza  
DAM – dialdehida malonică  
DS – deviația standard  
GPO - glutationperoxidaza  
GR – glutationreductaza  
GSH - glutation  
GST – glutationtransferaza  
IL-10 – interleukina-10  
IL-1 $\beta$  – interleukina-1beta  
IL-6 – interleukina-6  
iNOS – oxid-nitric sintetaza inductibilă  
LPS – lipopolizaharide  
LPB – proteine de legare a lipopolizaharidelor  
MAPK – proteinkinaza activată de mitogeni  
MRO - metaboliți reactivi ai oxigenului  
NO – oxid nitric  
NF-kB – factorul nuclear kappa B  
NK – celule *natural killer*  
OxHLIA - testul de inhibare a hemolizei oxidative  
PAM – peptide antimicrobiene  
PBS – tampon fosfat salin 0.1 M, pH 7.4  
PGE2 – prostaglandina E<sub>2</sub>  
POL – peroxidarea lipidelor  
PON - paraoxonaza



PPOA – produși proteici de oxidare avansată

SAO - sistem antioxidant

SO - stresul oxidativ

SOD – superoxid dismutaza

SRA – specii reactive de azot

SRO – specii reactive de oxigen

TNF $\alpha$  – factorul de necroză tumorală  $\alpha$

## LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1. Analize cantitative ale substanțelor biologice active extrase din țesuturile diferitor stadii de dezvoltare ale Lepidopterelor (L), Coleopterelor (C) și Dipterelor (D).....	25
Tabelul 1.2. Conținutul calitativ și cantitativ al aminoacizilor în produsele biologice active (entoheptin, imuheptin, imupurin) (mg/100mg).....	26
Tabelul 3.1.1. Influența imuheptinului (extract etanolic) asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor.....	72
Tabelul 3.1.2 Influența imuheptinului (extract hidric) asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor.....	73
Tabelul 3.1.3 Influența imupurinului (extract etanolic) asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor.....	75
Tabelul 3.1.4 Influența imupurinului (extract hidric) asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor.....	76
Tabelul 3.1.5. Influența imupurinului și imuheptinului asupra edemului urechii la șoricei indus prin xilen (3 ore).....	81
Tabelul 3.2.1. Influența imuheptinului asupra activității superoxid-dismutazei și catalazei în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS .....	86
Tabelul 3.2.2. Influența imupurinului asupra activității superoxid-dismutazei și catalazei în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS .....	87
Tabelul 3.2.3. Influența imuheptinului asupra nivelului glutatión-reductazei, glutatión-peroxidazei și glutatión-transferazei în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS .....	88
Tabelul 3.2.4. Influența imupurinului asupra nivelului glutatión-reductazei, glutatión-peroxidazei și glutatión-transferazei în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS .....	89
Tabelul 3.2.5 Influența imuheptinului asupra AGEs și PPOA în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS .....	92
Tabelul 3.2.6 Influența imupurinului asupra nivelului AGEs și PPOA în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS .....	93
Tabelul 3.2.7. Influența imuheptinului asupra tiolilor și raportului SH-liber/SH-total în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS .....	95
Tabelul 3.2.8. Influența imupurinului asupra tiolilor și raportului SH-liber/SH-total în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS .....	97

Tabelul 3.2.9. Influența imuheptinului asupra homeostaziei tiol-disulfurice în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS .....	99
Tabelul 3.2.10. Influența imupurinului asupra homeostaziei tiol-disulfurice în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS .....	100
Tabelul 3.2.11. Influența imuheptinului asupra activității antioxidante totale (după ABTS și CUPRAC) în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS .....	101
Tabelul 3.2.12. Influența imupurinului asupra capacității antioxidante totale (după ABTS și CUPRAC) în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS .....	102
Tabelul 4.1.1 Influența imuheptinului și imupurinului asupra inflamației subacute.....	107
Tabelul 4.1.2. Influența imuheptinului și imupurinului asupra nivelului AGE și PPOA în inflamația subacută.....	109
Tabelul 4.1.3. Influența imuheptinului și imupurinului asupra parametrilor sistemului tiol-disulfidic în inflamația subacută .....	111
Tabelul 4.1.4. Influența imuheptinului și imupurinului asupra enzimelor sistemului antioxidant în inflamația subacută.....	112
Tabelul 4.1.5. Influența imuheptinului și imupurinului asupra activității antioxidante totale și parametrilor sistemului oxidant în ser în inflamația subacută.....	113
Tabelul 4.2.1. Influența imuheptinului și imupurinului asupra inflamației subacute prin adjuvantul Freund.....	114
Tabelul 4.2.2. Influența imuheptinului și imupurinului asupra proceselor exudative și proliferative ale inflamației subacute prin adjuvantul Freund .....	115
Tabelul 4.2.3 Influența imuheptinului și imupurinului asupra tabloului sângelui periferic în inflamația subacută prin adjuvantul Freund.....	116
Tabelul 4.2.4. Influența imuheptinului și imupurinului asupra formulei leucocitare în sângele periferic în inflamația subacută prin adjuvantul Freund.....	117
Tabelul 4.2.5. Influența imuheptinului și imupurinului asupra nivelului citokinelor în inflamația subacută prin adjuvantul Freund.....	118
Tabelul 4.2.6. Influența imuheptinului și imupurinului asupra parametrilor sistemului prooxidant și antioxidant în ser în inflamația subacută prin adjuvantul Freund.....	118
Tabelul 4.2.7. Influența imuheptinului și imupurinului asupra parametrilor sistemului tiol-disulfidic în inflamația subacută prin adjuvantul Freund.....	120

## LISTA FIGURILOR

Figura 1.1. Ordinele de insecte consumate la nivel global și Africa [Numbi M.et al. 2022].....	21
Figura 1.2. Compoziția nutrienților din insectele comestibile [Zhou Y.2022].....	22
Figura 1.3. Conținutul de proteine în diferite specii de insecte [Zhou Y.et al. 2022].....	23
Figura 1.4. Beneficiile și siguranța insectelor comestibile [Aguilar-Toalá J.E.,2022].....	28
Figura 1.5. Mecanismele patogentice de acțiune ale LPS [Ijiru T.P.,2022]. ....	44
Figura 2.1. Design-ul cercetării .....	55
Figura 3.1.1 Influența imuheptinului asupra reducerii radicalului ABTS.....	77
Figura 3.1.2. Influența imupurinului asupra reducerii radicalului ABTS.....	78
Figura 3.1.3. Influența extractului etanolic al imuheptinului asupra activității paraoxonazei/arilesterazei.....	78
Figura 3.1.4. Influența extractului hidric al imuheptinului asupra activității paraoxonazei/arilesterazei.....	79
Figura 3.1.5. Influența extractului etanolic al imupurinului asupra activității paraoxonazei/arilesterazei.....	79
Figura 3.1.6. Influența extractului hidric al imupurinului asupra activității paraoxonazei/arilesterazei.....	80
Figura 3.2.1 Influența imuheptinului asupra nivelului de TNF-alfa în macrofagele stimulate prin LPS.....	81
Figura 3.2.2 Influența imuheptinului asupra nivelului de IL-6 în macrofagele stimulate prin LPS.....	82
Figura 3.2.3 Influența imuheptinului asupra nivelului de IL-10 în macrofagele stimulate prin LPS.....	82
Figura 3.2.4 Influența imupurinului asupra nivelului de TNF-alfa în macrofagele stimulate prin LPS.....	83
Figura 3.2.5 Influența imupurinului asupra nivelului de IL-6 în macrofagele stimulate prin LPS.....	83
Figura 3.2.6 Influența imuheptinului asupra nivelului de IL-10 în macrofagele stimulate prin LPS.....	84
Figura 3.2.7. Influența imuheptinului asupra nivelului DAM în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS .....	84
Figura 3.2.8. Influența imupurinului asupra nivelului DAM în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS.....	85

Figura 3.2.9. Influența imuheptinului asupra nivelului CP în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS .....	94
Figura 3.2.10. Influența imupurinului asupra nivelului CP în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS .....	94
Figura 4.1.1. Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului de TNF-alfa în inflamația subacută.....	107
Figura 4.1.2. Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului de IL-6 în inflamația subacută .....	108
Figura 4.1.3. Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului de IL-10 în inflamația subacută .....	108
Figura 4.1.4. Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului de CP în inflamația subacută .....	109

## INTRODUCERE

**Actualitatea și importanța problemei abordate.** Procesul inflamator este o reacție de răspuns a organismului la agresiunea cauzată de factorii infecțioși și neinfecțioși, care se manifestă prin reacții acute și/sau cronice cu implicarea majorității organelor. Dezvoltarea procesului inflamator este o reacție de apărare pentru menținerea homeostaziei, însă durată prelungită sau exprimarea exagerată poate induce o gamă variată de stări patologice. Tulburările complexe, ce însoțesc procesul inflamator sunt acompaniate de stres oxidativ, cauzat de activitatea celulelor polimorfonucleare și disfuncția mitocondrială. Utilizarea în practica medicală a antiinflamatoarelor steroidiene și nesteroidiene este argumentată și studiată multilateral. Elaborarea unor substanțe noi din aceste grupe nu este lipsită de dezavantaje determinate nu numai de reacțiile adverse, uneori periculoase, ci și de incapacitatea de a influența asupra unor căi patogenetice implicate în procesele inflamatorii sau de redirecționarea cu formarea excesivă a unor autacoizi (serotonina, bradikinina, substanța P), citokine, (TNF-alfa, interleukine, limfokine) etc. Concomitent, tot mai elocvent se demonstrează implicarea în procesul inflamator și a sistemului imun, inclusiv limfocitelor T și B, neutrofilelor și macrofagelor. Din aceste considerente, prezintă un interes deosebit preparatele de altă genă, inclusiv de origine biologică, vegetală, animalieră și entomologică ce manifestă concomitent proprietăți imunotrope, antiinflamatoare și antioxidante [52, 157, 159].

Insectele sunt considerate o sursă bogată de substanțe biologice active (proteine, peptide, aminoacizi esențiali și neesențiali, lipide, acizi grași saturați și nesaturați, carbohidrați, vitamine și minerale etc.), ce se formează în procesele de morfogeneză și adaptare a acestora pentru a menține homeostazia și supraviețuirea. Substanțele biologice active din insecte (fenoli, flavonoizi, polipeptide, glicozidele, acizii grași etc.) au demonstrat proprietăți: antioxidante, imunomodulatoare, antiinflamatoare, antibacteriene, antifungice, antivirale, antitumorale, hepatoprotectoare, antidiabetice, antihipertensive, hipolipemice și antitrombotice [2, 18, 38, 41, 46, 68, 86, 103, 118, 127, 130, 177, 199]. Interesul față de insecte este determinat de posibilitatea obținerii din extractele și liofilizatele acestora a unui șir de compuși bioactivi, produse naturale, și/sau derivați sintetici prin aplicarea tehnologiei moleculare și a bioingenieriei. S-a constatat, de asemenea, că un șir de SBA pot fi comune sau specifice pentru anumite insecte, ce prezintă un domeniu vast și de perspectivă în elaborarea preparatelor native (extracte, liofilizate etc.) și a analogilor sintetici ca medicamente noi [17, 18, 19, 22, 36, 38, 39, 67, 69, 127, 130, 131].

Arsenalul actual de preparate pentru tratamentul proceselor inflamatorii este constituit din medicamentele nesteroidiene, steroidiene și antiinflamatoare cu acțiune specifică cu o eficacitate bună, însă problemele de inofensivitate face necesară cercetarea de substanțe noi cu proprietăți antiinflamatoare, posibil și cu mecanisme diferite ce ar permite creșterea tolerabilității acestora. Actualmente, există o bază variată și documentată de recomandări metodice de studiu *in vitro* și *in vivo* a proprietăților antiinflamatoare a substanțelor noi, ce permit determinarea influenței asupra inflamației cu elucidarea mecanismelor și particularităților de acțiune [87, 158, 195, 196].

Studiile recente au demonstrat o corelație între evoluția procesului inflamator și stresul oxidativ în diferite maladii și stări patologice. Tratamentul și profilaxia inflamației, și a dezechilibrului sistemului pro- și antioxidant rămân mereu actuale. Studiul mecanismelor și particularităților de acțiune a medicamentelor de altă origine va deschide noi perspective de control a evoluției proceselor inflamatorii și stresului oxidativ în diferite maladii și stări patologice. Prin urmare, se impune necesitatea cercetării, elaborării și implementării unor preparate cu acțiune antiinflamatoare și antioxidantă, lipsite de dezavantajele celor existente.

**Starea actuală în domeniu și identificarea problemelor de cercetare.** Studiul proprietăților farmacologice ale produselor de origine entomologică a constituit o nouă direcție de cercetări științifice a catedrei de farmacologie și farmacologie clinică, inițiată în anii 2002-2003, sub egida profesorului Victor Ghicavii, membru corespondent al AȘM în colaborare cu profesorul Mircea Ciuhrii. A demarat cercetarea produselor de origine entomologică autohtone (entoheptin, imuheptin, imupurin, adenoprosin), obținute din țesuturile de *Lymantria dispar* la diferite etape de dezvoltare. Cercetările experimentale și clinice au fost direcționate în studiul proprietăților antibacteriene, antifungice, antivirale, hepatoprotectoare, imunomodulatoare și mai puțin antiinflamatorii.

Un aspect de perspectivă în studiul preparatelor de origine entomologică autohtone a constituit elucidarea proprietăților antiinflamatoare. În acest context, s-a inițiat screening-ul proprietăților antiinflamatoare pe model de edem indus de formaldehidă, care a permis să constatăm, că preparatele de origine entomologică (entoheptin, imuheptin, imupurin) nu preîntâmpinau dezvoltarea inflamației, dar manifestau o activitate antiinflamatoare comparabilă cu cea a diclofenacului. Involuția edemului a avut loc timp de 24-48 ore de la inducerea inflamației, iar substanțele cercetate au manifestat efect antiinflamator la administrarea cu 3-5 zile înainte de administrarea agentului flogogen. Analiza comparativă a potențialului antiinflamator al entoheptinului, imupurinului și imuheptinului a evidențiat o activitate antiinflamatoare de diferită intensitate și anume, entoheptinul fiind superior diclofenacului,

imuheptinul similar antiinflamatorului nesteroidian, iar imupurinul o acțiune antiinflamatoare mai intensă decât în lotul animalelor netratate [18, 22, 33].

Aceste rezultate au servit drept bază pentru inițierea unui studiu mai aprofundat al proprietăților antiinflamatoare ale preparatelor entomologice autohtone cu diversificarea metodelor de studiu *in vitro* și *in vivo* pentru a elucida influența acestora asupra parametrilor procesului inflamator și antioxidant cu determinarea posibilelor mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare a imuheptinului și imupurinului.

În proiectul dat s-a cercetat experimental influența preparatelor de origine entomologică (imuheptin, imupurin) pe modele de inflamație *in vitro*, *ex vivo* și *in vivo*, cu determinarea markerilor inflamației și parametrilor sistemului pro- și antioxidant cu specificarea particularităților acțiunii antiinflamatoare și antioxidante a imuheptinului și imupurinului.

**Scopul studiului** a constat în evaluarea proprietăților antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului, evidențierea posibilelor mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare și perspectiveilor de studiu clinic.

**Obiectivele cercetării:**

1. Screening-ul *in vitro* și *in vivo* a proprietăților antiinflamatorii ale preparatelor de origine entomologică autohtone;
2. Studiul influenței imuheptinului și imupurinului asupra inflamației induse de lipopolizaharide;
3. Cercetarea acțiunii imupurinului și imuheptinului asupra proceselor exudative și proliferative ale inflamației;
4. Aprecierea influenței imuheptinului și imupurinului asupra nivelului markerilor procesului inflamator și parametrilor sistemului pro- și antioxidant;
5. Evidențierea posibilelor mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare și perspectiveilor de utilizare clinică a imuheptinului și imupurinului.

**Ipoteza de cercetare.** Preparatele de origine entomologică (imuheptin și imupurin) prin conținutul de substanțe biologice active și fiind demonstrate în studiile anterioare efectele imunomodulatoare, hepatoprotectoare, antioxidante vor ameliora evoluția procesului inflamator și restabili dezechilibrul sistemului pro- și antioxidant, induse de agenții proinflamatori (corpi străini, substanțe iritante, LPS).

**Metodologia cercetării.** În baza recomandărilor existente, s-au utilizat metode de cercetare *in vitro*, *ex vivo* și *in vivo*, care au permis evaluarea aspectelor procesului inflamator și posibilelor mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare a substanțelor studiate [87, 128, 134, 140, 158, 178, 195, 196].



Studiul experimental al medicamentelor cu acțiune antiinflamatoare s-a subdivizat în investigații screening și de cercetare specifică aprofundată. Pentru etapa de screening s-a recurs la metode de studiu *in vitro*: evaluarea acțiunii membranostabilizatoare în cadrul hemolizei oxidative; studiul activității antioxidante (testul ABTS); determinarea activității paraoxonazei/arilesterazei [62, 87, 178, 134, 140, 128]. La fel, investigațiile screening au inclus un model de inflamație acută *in vivo* - edemul urechii la șoricelii prin aplicarea de xilen [29]. Ulterior, experimental s-a modelat *ex vivo* inflamația prin stimularea macrofagelor peritoneale cu lipopolizaharide [27].

Pentru evaluarea influenței imuheptinului și imupurinului asupra componentului exudativ și proliferativ al inflamației, s-a optat pentru modelul de inflamație subacută - “granulomul de fetru” prin introducerea subcutanată a 2 discuri de fetru sterile sau a fetrului infiltrat cu adjuvantul Freund [158, 195, 196].

**Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute.** Studiul experimental realizat a pus în lumină aspectele acțiunii antiinflamatoare a preparatelor de origine entomologică – imuheptin și imupurin, obținute din țesuturile insectelor de Lepidoptere, specia *Lymantria dispar* la diferite etape de evoluție (ou, pupe). Au fost determinate particularitățile acestora asupra diferitor faze ale procesului inflamator. Testele *in vitro* au permis dezvăluirea efectului membranostabilizator și antioxidant dependente de concentrație și timp. Studiul *in vivo* a relevat repercusiunile administrării preparatelor entomologice asupra fazelor exudative și proliferative ale inflamației, cu o pondere mai mare asupra proceselor proliferative. În premieră s-a determinat influența imupurinului și imuheptinului asupra raportului dintre citokinele proinflamatoare (TNF-alfa, IL-6) și antiinflamatoare (IL-10), concomitent cu aprecierea indicatorilor statutului redox: produsele POL (DAM), enzimele antioxidante (SOD, catalază, GR, GPO, GST), starea sistemului tiol-disulfidic.

**Problema științifică soluționată în teză.** În cadrul cercetărilor s-au obținut rezultate referitoare la acțiunea antiinflamatoare a imupurinului și imuheptinului, continuând direcția științifică a catedrei – farmacologia preparatelor de origine entomologică. Rezultatele obținute au permis de a defini aspectele acțiunii antiinflamatoare și antioxidante ale preparatelor de origine entomologică în procesele inflamatorii de diferită genă și de a înainta ipotezele mecanismelor de acțiune.

**Semnificația teoretică.** Rezultatele obținute au demonstrat corelația dintre inflamație și sistemul pro- și antioxidant pe diferite modele ale procesului inflamator. Pentru imuheptin și imupurin s-au obținut date concludente despre influența asupra sistemului de citokine, proceselor exudative și proliferative ale inflamației, corelației dintre stresul oxidativ și procesul inflamator.

Rezultatele relatate și analiza literaturii științifice au permis de a contura câteva ipoteze referitor la mecanismele posibile de realizare a efectului antiinflamator în corelare cu activitatea antioxidantă (modularea citokinelor pro- și antiinflamatorii, inhibarea ciclooxigenazei și lipooxigenazei, rolul reducerii stresului oxidativ în atenuarea procesului inflamator) ale imuheptinului și imupurinelui. În baza studiului realizat s-a concluzionat, că imuheptinul și imupurinelul pot fi recomandate în tratamentul de durată al maladiilor inflamatorii prin atenuarea proceselor exudative și proliferative, stresului oxidativ datorită componentelor sale (proteine, polipeptide, aminoacizi esențiali, lipide, acizi grași polinesaturați, antioxidanți etc.).

**Valoarea aplicativă a lucrării.** Studiul actual a relevat unele efecte ale AINS și AIS în funcție de doza administrată în procesele inflamatorii acute, subacute și cronice, date ce ar putea fi luate în considerație în tratamentul diferențiat al maladiilor inflamatorii, inclusiv cu procese autoimune. Preparatele de origine entomologică pot fi considerate eficiente ca antiinflamatoare și prezintă unele particularități față de antiinflamatoarele nesteroidiene (proprietățile antioxidante, influența mai benefică asupra proceselor proliferative) și steroidiene (modularea citokinelor pro- și antiinflamatorii, influențarea stresului oxidativ), posibil, datorită componentei variate de substanțe biologice active și proprietăților imunotrope. Rezultatele obținute vor permite desfășurarea ulterioară a cercetărilor clinice.

#### **Implementarea rezultatelor.**

Studiul a permis de a sistematiza proprietățile antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinelui și de a înainta unele ipoteze ale mecanismelor efectului antiinflamator, date implementate în procesul de studiu la disciplinele farmacologie și farmacologie clinică pentru studenți, și în cadrul Laboratorului de Biochimie a IP USMF „Nicolae Testemițanu” (act de implementare nr. 94 din 13.06.2023). Rezultatele obținute vor permite demararea studiilor clinice de evaluare a proprietăților antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinelui.

#### **Aprobarea rezultatelor științifice.**

Rezultatele cercetărilor au fost raportate și discutate în cadrul următoarelor foruri științifice:

- Zilele Universității și Conferințele Științifice Anuale ale colaboratorilor și studenților USMF „Nicolae Testemițanu” Chișinău, 2015, 2017, 2019, 2020, 2021;
- Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 21-23 octombrie 2020, Chișinău.
- Научно-практической конференции «Актуальные вопросы фармакологии и биохимии, посвященной 100-летию профессора А.А.Столярчука». 15-16 октября 2020 года, стр. 19-22, г.Винница, Украина.

- The Second Eurasian Conference The Coronavirus Pandemic: Diagnosis, Treatment and Consequences, Vacu - June 2 – 3, 2021;
- III Центральназиатского Конгресса клинической фармакологии «Современное состояние и перспективы развития клинической фармакологии», г. Бишкек, Кыргызская Республика, 28-29 октября 2021 г.

**Publicații la tema tezei.** La subiectul tezei au fost publicate 11 lucrări, inclusiv 1 articol în reviste din străinătate Scopus, 2 articole în reviste din străinătate, incluse în baza de date EBSCO, 3 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil – categoria B+, B și C, 2 articole în culegeri științifice internaționale, 2 teze la forurile științifice internaționale, 1 teză la forurile științifice naționale, un certificat de inovator (nr. 6060 din 29.05.2023). Din publicațiile la tema tezei, 2 sunt ca monoautor și 7 de prim autor.

**Cuvinte-cheie:** entomologic, imupurin, imuheptin, substanțe biologice active, Lepidoptere, *Lymantria*, acțiune antiinflamatoare, acțiune antioxidantă.

**Sumarul compartimentelor tezei.** Teza este constituită din introducere, reviu literaturii, material și metode, rezultatele studiului, sinteza rezultatelor, concluzii și recomandări, bibliografie, anexe. Teza este expusă pe: 126 pagini text de bază, include 30 tabele, 27 figuri, 200 surse bibliografice, 12 anexe.

**În introducere** sunt expuse actualitatea temei și importanța problemei abordate, starea actuală în domeniu și identificarea problemelor de cercetare, scopul și obiectivele lucrării, ipoteza de cercetare, metodologia cercetării, noutatea științifică, problema științifică soluționată, semnificația teoretică, valoarea aplicativă a lucrării, implementarea rezultatelor, aprobarea rezultatelor științifice, publicații la tema tezei, cuvintele cheie, sumarul compartimentelor tezei.

**Capitolul 1. Preparate entomologice – sinteze, sugestii și perspective** este dedicat analizei literaturii, cu prezentarea insectelor ca sursă de substanțe biologice active cu variate efecte benefice asupra sănătății. Un alt compartiment reflectă aspecte referitor la acțiunea antioxidantă, antiinflamatoare, hepatoprotectoare, imunomodulatoare etc. cu evidențierea influenței asupra parametrilor fiziologici, biochimici, imunologici, posibilelor mecanisme de acțiune și beneficiilor în tratamentul afecțiunilor și stărilor patologice.

**Capitolul 2. Material și metodele de cercetare** - sunt expuse modelele experimentale aplicate pentru realizarea scopului și obiectivelor cercetării, descrierea metodelor de determinare a parametrilor morfo-funcționali și biochimici, selectarea metodelor de prelucrare statistică în funcție de indicii cercetați.

**Capitolul 3. Screening-ul proprietăților antiinflamatorii și antioxidante ale preparatelor de origine entomologică** include rezultatele cercetărilor experimentale screening:

metodelor *in vitro* și *in vivo* de testare a proprietăților antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului; studiul influenței imuheptinului și imupurinului asupra procesului inflamator indus de lipopolizaharide prin determinarea profilului citokinic, evaluarea sistemului pro- și antioxidant.

**Capitolul 4. Influența preparatelor de origine entomologică asupra inflamației subacute** – include rezultatele influenței imuheptinului și imupurinului asupra proceselor exudative și proliferative, conținutului de citokine, parametrilor sistemului pro- și antioxidant, echilibrului tiol-disulfidic în modele experimentale prin implantarea discurilor de fetru simplu și infiltrat cu adjuvantul Freund.

În compartimentul **Sinteza rezultatelor** s-a efectuat analiza rezultatelor obținute prin prisma datelor din literatură în vederea: argumentării proprietăților antiinflamatorii și antioxidante ale imuheptinului și imupurinului; analizei comparative cu preparatele de referință (diclofenac, dexametazonă) pentru determinare avantajelor și/sau dezavantajelor acțiunii antiinflamatoare; evidențierii posibilelor mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare și antioxidantă; stabilirii perspectivelor de cercetări clinice.

În compartimentul **Concluzii și recomandări** s-au generalizat datele cercetărilor experimentale pentru argumentarea realizării scopului și obiectivelor studiului, evidențierea momentelor-cheie ce denotă raționalitatea, semnificația teoretică și valoarea aplicativă a studiului.

# 1. PREPARATE ENTOMOLOGICE – SINTEZE, SUGESTII ȘI PERSPECTIVE

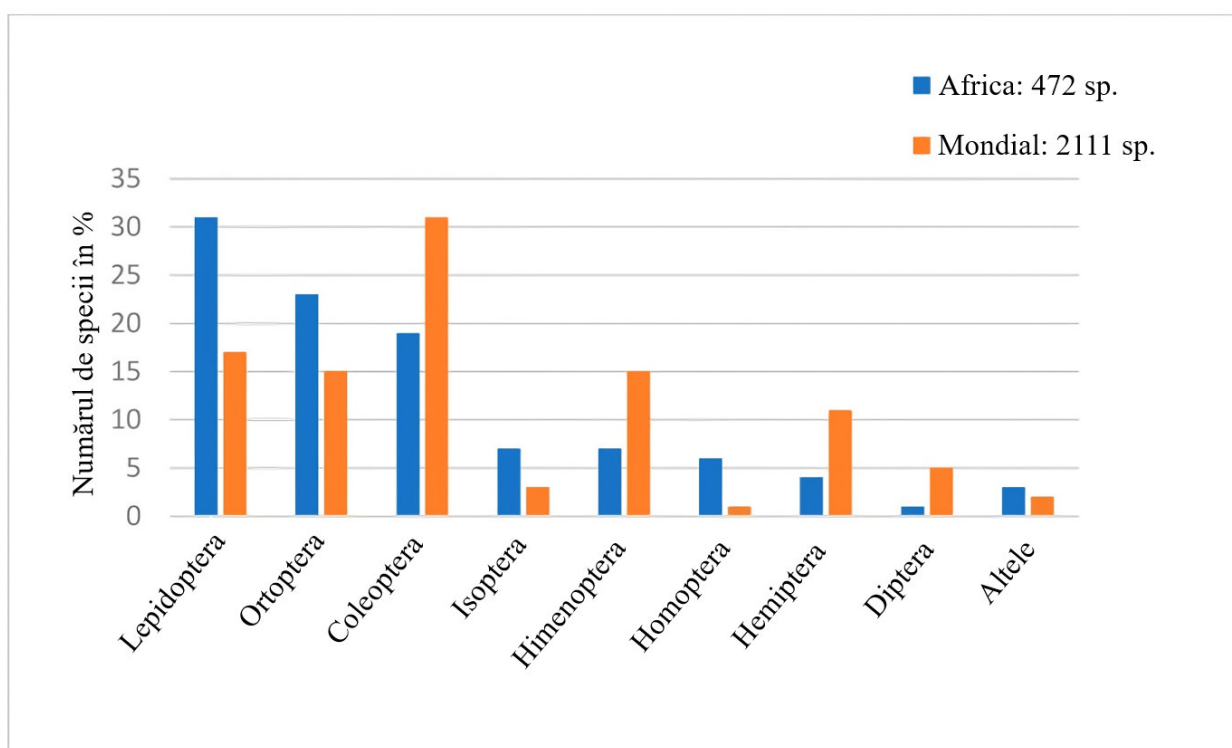
## 1.1 Substanțe biologice active din insecte – sursă de preparate entomologice

Entomologia și entomofagia au devenit o nouă direcție în știință și alimentație. Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură, în 2013, a subliniat necesitatea examinării practicilor moderne în domeniul științei alimentare pentru a crește comerțul, consumul și acceptarea insectelor. Regulamentul Parlamentului European și al Consiliului Uniunii Europene în 2015 a inclus insectele întregi și părțile lor în categoria alimentelor noi. În plus, în 2015, Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA) a oferit un aviz științific privind consumul de insecte și a sugerat o listă de specii de insecte cu potențial ridicat de utilizare drept aliment pentru animale și oameni. În 2021 EFSA, conform regulamentului Uniunii Europene 2015/2283, a emis un aviz pozitiv cu privire la siguranța larvelor uscate de *Tenebrio molitor* (TM) sau viermele galben de făină, *Locusta migratoria* (LM) și *Acheta domesticus* (AD) și recent în ianuarie 2023 a fost emis avizul pozitiv pentru larvele de *Alphitobius diaperinus* pentru consum uman. Din punct de vedere nutrițional, insectele comestibile sunt propuse ca sursă alternativă de proteine pentru oameni și animale datorită nivelurilor ridicate de aminoacizi esențiali (EAA), acizi grași nesaturați, micronutrienți (de exemplu, vitamina B12, fier (Fe), zinc și calciu) și fibre. În plus, insectele comestibile au diferiți compuși bioactivi în compoziția lor cu potențiale efecte asupra sănătății [93, 103, 133].

Insectele, aparținând clasei, *Insecta*, încregăturii *Arthropoda*, și regnului *Animalia* sunt cel mai mare grup de nevertebrate din regnul animal. Populația lor variază între 2,6 și 7,8 milioane. O evaluare recentă a arătat că estimarea medie globală a speciilor de insecte constituie 5,5 milioane. Insectele sunt împărțite în 29 de ordine, majoritatea fiind *Lepidoptera*, *Isoptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera*, *Orthoptera* și *Hemiptera*. Entomofagia, practica consumului de insecte și nevertebrate, a însoțit istoria umanității de-a lungul secolelor, jucând un rol semnificativ în practicile culturale și religioase. Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură consideră insectele ca parte din dieta comună a cel puțin două miliarde de oameni din lume. Pentru consumul uman sunt disponibile diferite specii de insecte, precum coleoptere, lepidoptere și himenoptere care reprezintă 31, 18 și 14% din consumul total de insecte. Din punct de vedere ecologic, insectele reprezintă un substituent extrem de durabil al cărnii și produselor de origine animală, produc mult mai puține gaze cu efect de seră și necesită mai puțină apă, pământ și hrană pentru a-și dezvolta ciclul de viață, în comparație cu animalele [48, 110, 178].

Un alt avantaj major al insectelor comestibile este posibilitatea cultivării lor folosind deșeuri alimentare organice, cum ar fi compost, gunoi de grajd sau deșeuri vegetale, ceea ce poate reduce contaminarea dăunătoare a mediului. Deșeurile alimentare reprezintă amenințări serioase la adresa sustenabilității mediului înconjurător, de aceea utilizarea lor pentru creșterea insectelor oferă o abordare atractivă pentru “închiderea buclei” lanțului alimentar într-o economie circulară durabilă [112].

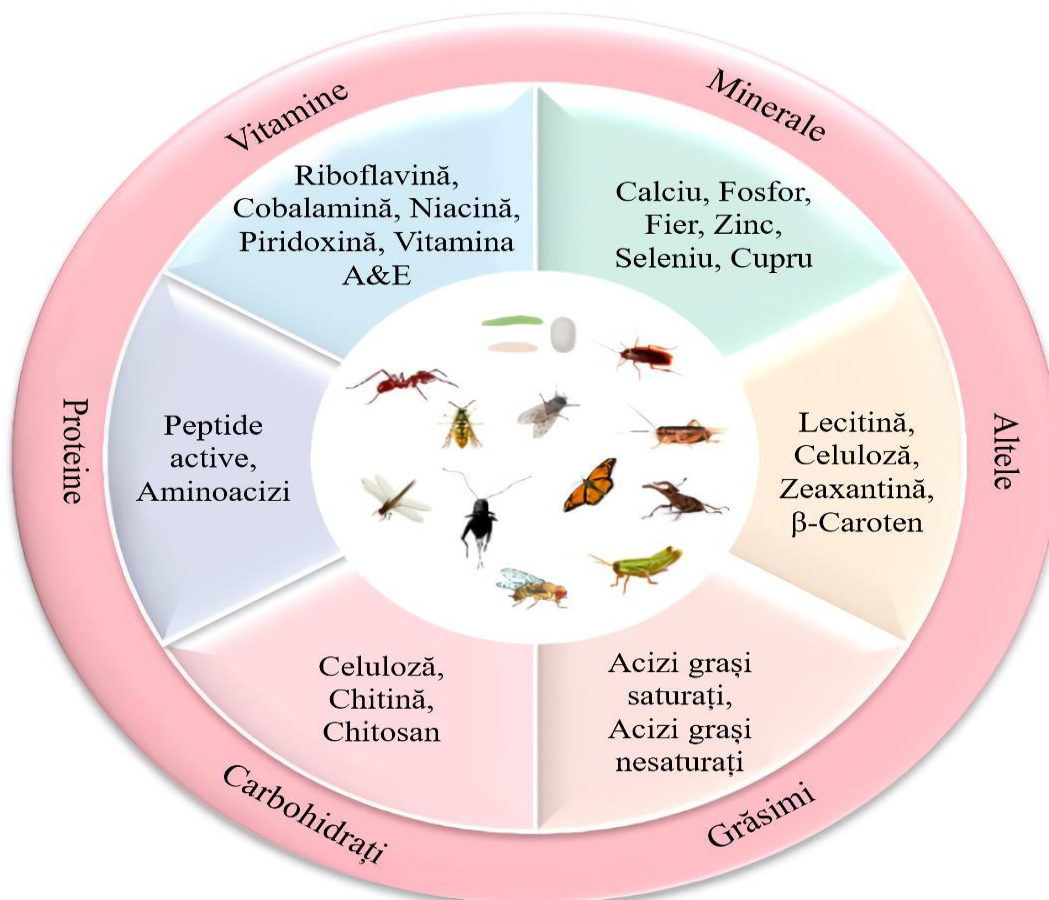
Insectele constituie o sursă nutritivă alternativă pentru circa 2 mld de oameni care consumă aproximativ 2000-2300 de insecte comestibile din 12 ordine, printre care cele mai frecvent utilizate sunt gândacii (Coleoptera), omizile, fluturii și moliile (Lepidoptera), albine, viespi și furnici (Himenoptera), lăcuste, greieri (Ortoptera), cicade, caligări (Himiptera), termite (Isoptera), muște (Diptera) etc.(fig.1.1). Lepidopterele constituie cea mai mare diversitate de specii utilizate, incluzând circa 128 familii, dintre care 36 sunt consumate de om sub formă de omizi și, mai rar, crisalide [89, 109, 113, 178].



**Figura 1.1 Ordinele de insecte consumate la nivel global și Africa [Numbi M.et al. 2022].**

Din punct de vedere nutrițional, insectele reprezintă o sursă de proteine biodisponibile de înaltă calitate, aminoacizi (de la 35% la 60%) dintre care aminoacizi esențiali (de la 10% la 30%), acizi grași polinesaturați, minerale (fosfor, calciu, mangan, cupru, zinc, sodiu, potasiu și fier), carotene, vitamine (B1, B2, B6, D, E, K, C etc.) și fibre insolubile, precum chitină (fig.1.2).

În ciuda faptului că insectele au fost folosite în medicina tradițională cu diferite scopuri există puține dovezi despre proprietățile funcționale ale insectelor [47, 48, 93, 110, 133, 178].



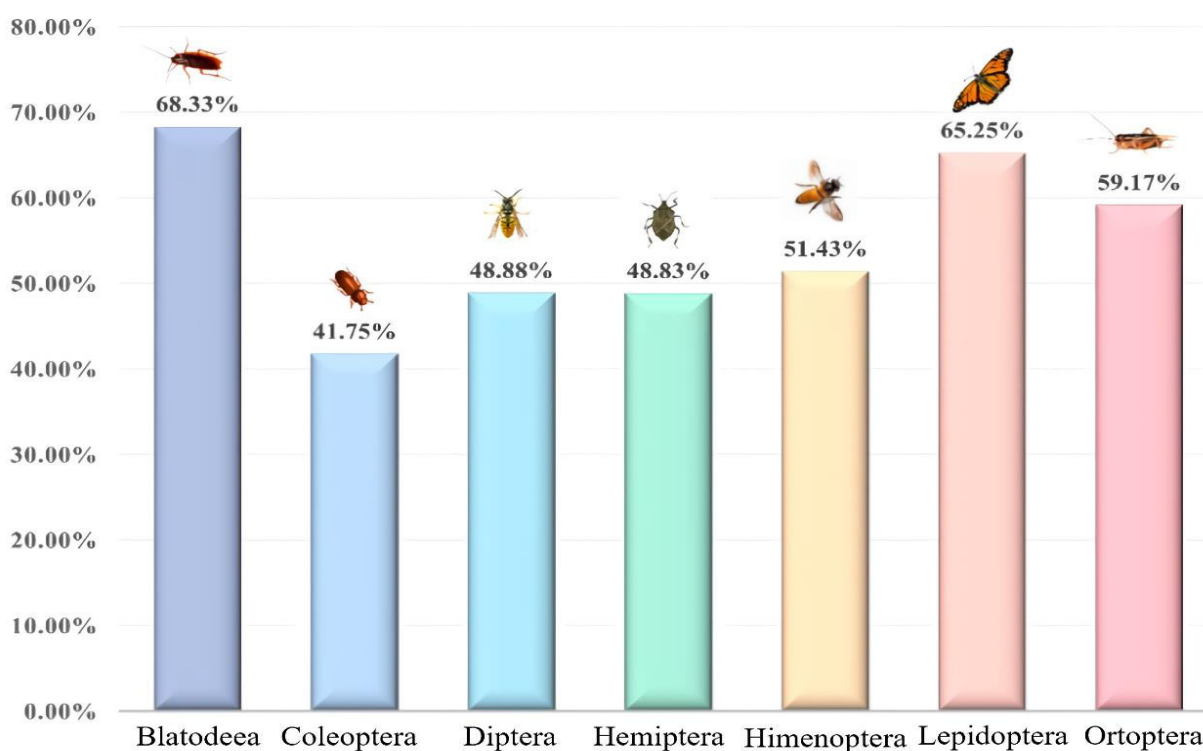
**Figura 1.2 . Compoziția nutrienților din insectele comestibile [Zhou Y.2022]**

Actualmente, în întreaga lume, în principal în țările tropicale, sunt consumate peste 2.000 de specii de insecte, printre care gândaci (coleoptere); omizi, fluturi, molii (lepidoptere); viespi, albine și furnici (himenoptere); greieri și lăcuste (ortoptere); cicadele, furnici de miere, afide, ploșnițe, cosași ai frunzelor, păduchi țestoși și gândaci adevărați (Hemiptera). Contribuțiile nutriționale ale insectelor sunt asigurate de: proteine (20-70%) cu un conținut de aminoacizi esențiali (46-96%); lipide (10-50%) ce include acizi grași saturați și nesaturați; fibre (8,5-27%); minerale (Ca, Cu, Zn, Mn, P etc.); vitamine (biotina, riboflavina, acidul pantotenic și acidul folic). Concentrațiile nutrienților pot varia în funcție de specie, stadiul de dezvoltare, dietă și condițiile climaterice [1, 89, 113, 133].

Rata de extracție și caracteristicile proteinelor din insecte prin diferite metode de extracție (apă, fracționare uscată, sonicare, presiune ultraînaltă etc.) poate varia în funcție de specie, sex, stadiul de viață, alimentație, regiune geografică și pot determina funcționalitatea proteinelor. Modificarea funcționalității proteinelor din insecte prin procedul de extracție este legată de

alterarea hidrofobicității de suprafață, a încărcăturii proteice și a compoziției proteinelor în funcție de greutatea moleculară [80, 86].

Studiul a circa 40 specii de insecte a demonstrat, că compoziția variază considerabil între specii. Astfel, proteinele și grăsimile sunt substanțele cele mai abundente în substanța uscată, conținutul de proteine variind între 6,25% și 80,26%, iar conținutul de grăsime a variat de la 2,2% la 43,0%. Proteinele, ca o componentă esențială a vieții, sunt responsabile de răspunsul imun, sinteza anticorpilor, îndeplinesc funcție enzimatică, fiind implicate în reacțiile biochimice, dar constituie și o sursă de energie în anumite condiții. Majoritatea studiilor, referitor la compoziția insectelor, au raportat o omniprezență a proteinelor în majoritatea insectelor (fig.1.3). Astfel, printre clasele de insecte cele mai bogate în proteine se enumără gândacii (*Blattodea*), fluturii, omizile (*Lepidoptera*), lăcustele și greierii (*Orthoptera*) etc. [177].



**Figura 1.3. Conținutul de proteine în diferite specii de insecte [Zhou Y.et al. 2022].**

Proteinele constituie componentul principal al omizilor. La analiza a 24 specii de omizi comestibile s-a stabilit, că proteinele constituiau 63,5%, lipidele 15,7% cu o valoare energetică de 457 kcal/100 g. Proteinele, datorită unei digestibilități înalte, furnizează aminoacizi esențiali (46-96%) și non-esențiali, inclusiv leucină (Leu), lizină (Lys), valină (Val), treonină (Tre), fenilalanină (Phe) și histidină (Hys), iar restul pot egala sau depăși cantitățile zilnice recomandate. Aportul de aminoacizi esențiali este important, în special în cazul alimentației



vegetariene [99, 113, 133]. Concomitent proteinele sunt o sursă de peptide bioactive, precum tripeptide și polipeptide [109].

Analiza componenței de aminoacizi în Lepidoptere (omizi, fluturi, molii) a demonstrat, că conținutul (în mg/g) a constituit: acid glutamic (Glu) – 103,4; leucină (Leu) – 62,7; lizină (Lys) – 57,7; valină (Val) – 54,1; alanină (Ala) – 48,9; serină (Ser) – 48,4; arginină (Arg) – 46,9; fenilalanină (Phe) – 46,3; prolină (Pro) - 44,9; glicină (Gly) – 43,8; izoleucină (Ile) – 40,4; treonină (Yhr) – 40,0; histidină (Hys) – 23,7; metionină (Met) – 22,1 [113].

Conținutul variat de lipide este determinat de etapa de dezvoltare, fiind mai consistent la stadiul de larvă. Lipidele se caracterizează printr-un conținut de acizi grași (80%), fosfolipide și sterol (colesterol). Acizii grași sunt constituiți din cei saturați (20-42%), mononesaturați (20-35%) și polinesaturați (16-39%). Acizii polinesaturați predomină în insectele din ordinele Lepidoptere, Isoptere, Himenoptere și Ortoptere [113, 178].

Lipidele din insecte au o valoare superioară de acizi grași esențiali în comparație cu alte surse. Metodele de extragere (apă, Folch, Soxhlet etc.) determină randamentul și tipurile de lipide, dar practic nu influențează compoziția acizilor grași. În funcție de aplicația dorită a lipidelor din insecte e necesar de a selecta procesul de extracție [86, 99].

Lipidele din insectele de Lepidoptere (fluturi, omizi, molii) s-au caracterizat printr-un conținut de acizi grași (19,4-39%), acizi mononesaturați (4,4-50,8%) și polinesaturați (1,7-62,1%) [113]. Omizile sunt cele mai bogate insecte în lipide, inclusiv acizi grași mono- și polinesaturați (acid linolenic (omega-3), acid linoleic (omega-6), acid oleic), care nu se sintetizează în organism. Compoziția mai multor specii de omizi utilizate, au conținut circa 32-57% acizi grași, 1-27% acizi grași mononesaturați și 37-54% acizi grași polinesaturați. Alte larve de Lepidoptere sunt compuse din circa 70% acizi grași nesaturați. Diferența în conținutul acizilor grași al insectelor din Lepidoptere depinde de dieta omizilor [99, 109].

Insectele din ordinul Lepidoptere au un ciclu de morfogeneză specific și foarte complicat, care include 4 etape de dezvoltare: ou, larvă, pupă și adult (imago). A fost realizate studii preclinice și clinice ale produselor biologice active, obținute din țesuturile de insecte din ordinul *Lepidoptera*, familia *Lymantridae*, genul *Lymantria*, specia *Lymantria dispar* (omida păroasă a stejarului, omida moliei țigănești), la etapa de ou (entoheptin), pupă (imupurin), larve (adenoprosin) și din ou și pupă în raport 25%:75% (imuheptin). S-a efectuat un studiu comparativ al analizei cantitative a produselor biologice active extrase la diferite etape de dezvoltare ale insectelor (ou, larvă, pupă și imago) din Lepidoptere, Diptere și Coleoptere cu reprezentantul mamiferelor (ouă de prepeliță) și lumii vegetale (*Aloe vera*) asupra conținutului de proteine, lipide și zahăr în substanța uscată (tab.1.1). Analiza datelor expuse au demonstrat, că

produsele entomologice din Lepidoptere au cel mai mare conținut de proteine la toate etapele de evoluție în comparație cu Coleopterele, Dipterele, ouăle de prepeliță și aloe. Concomitent, produsele din lepidoptere cedau celorlalte extrase după conținutul de lipide și zahăr [17, 41, 42].

**Tabelul 1.1 Analize cantitative ale substanțelor biologice active extrase din țesuturile Lepidopterelor (L), Coleopterelor (C) și Dipterelor (D) în diferite stadii de dezvoltare [17, 41, 42]**

SBA extrase din insecte	Substanță uscată	Proteine g/100g	Lipide g/100g	Zahăr g/100g
Ou L	91,27	66,26	16,91	2,380
Larva L	90,27	73,17	11,78	0,556
Pupa L	93,19	66,36	23,50	8,870
Imago L	91,48	55,93	9,02	-
Larva C	96,58	48,48	20,39	4,60
Imago C	90,36	65,20	6,57	4,200
Larva D	94,10	53,21	22,22	4,280
Imago D	95,00	44,67	38,62	2,060
Ou de prepeliță	96,92	43,14	29,50	2,060
Aloe	94,89	12,45	8,40	5,400

Analizele spectrale ale proteinelor produselor biologice active au demonstrat că acestea conțin întregul set de aminoacizi: esențiali (treonină, metionină, valină, izoleucină, leucină, fenilalanină, histidină, lizină, arginină, triptofan) și non-esențiali (acid asparagic, serină, acid glutamic, prolină, cisteină, glicină, alanină, tirozină) (tab.1.2). Astfel, entoheptinul conține 18,11 mg/100 mg de aminoacizi esențiali (48,4%), imuheptinul 25,67 mg/100mg (50,3%), iar imupurinul 28,05 mg/100mg (50,5%). Analizele proteinelor au demonstrat predominarea următorilor aminoacizi: fenilalanina, acidul glutamic, lizina, leucina, acidul asparagic și arginină. E necesar de menționat, prezența importantă a aminoacizilor cu catenă laterală dezvoltată – leucina, izoleucina, valina. Reieșind din datele obținute, entoheptinul conține 4,69 mg/100mg de astfel de aminoacizi, imuheptinul – 9,46 mg/100 mg, imupurinul 8 mg/100 mg. Importanță pot avea și aminoacizii aromatici (esențiali - fenilalanina, triptofan și non-esențiali - tirozina), care se conțin în cantități considerabile în preparatele entomologice cercetate (entoheptin – 7,43 mg/100 mg, imuheptin - 10,46 mg/100 mg, imupurin – 12,14 mg/100 mg) [17, 41, 42].

S-a stabilit, că insectele sunt surse importante de agenți activi pentru medicina modernă. Multe insecte, precum albinele, muștele, furnicile, gândacii etc. sunt utilizate pentru a obține remedii antibacteriene, antitumorale, imunostimulatoare, antiinflamatorii, antitrombotice etc.

Tubiechong este un produs entomologic obținut din femele *Eupolyphaga sinensis* Walker (ESW) sau *Polyphaga plancyi* Bolivar (PPB) cu o gamă largă de efecte, inclusiv anticoagulant, antitumoral, antioxidant, imunomodulator, hipolipemiant și hepatoprotector. Studiile chimice au indicat că Tubiechong a generat mulți compuși activi, inclusiv proteine, aminoacizi, peptide, acizi grași, alcaloizi, nucleozide, polizaharide, vitamine liposolubile și minerale. [166].

**Tabelul 1.2. Conținutul calitativ și cantitativ al aminoacizilor în produsele biologice active (entoheptin, imuheptin, imupurin) (mg/100mg) [17, 41, 42]**

Aminoacizii	Entoheptin	Imuheptin	Imupurin
Acid asparagic	3.7600	4.8654	5.2339
Treonină	1.5034	2.4291	2.7378
Serină	1.4694	1.7656	1.8645
Acid glutamic	5.1194	6.4128	6.8441
Prolină	1.7173	2.6409	2.9489
Cisteină	1.4021	1.4242	1.4317
Glicină	1.6783	2.1179	2.2646
Alanină	1.6476	2.5638	2.9693
Valină	1.3353	2.2382	2.5392
Metionină	0.4901	0.2687	0.1949
Izoleucină	1.3679	2.0239	2.2427
Leucină	1.9852	2.9554	3.2788
Tirozină	1.5905	2.6808	3.0443
Fenilalanină	4.0960	7.363	8.4520
Histidină	0.7521	1.2554	1.4232
Lizină	2.9281	3.6859	3.9386
Acid $\gamma$ -aminobutiric	0.8533	0.9108	0.9300
Arginină	1.9171	2.4314	2.6030
Triptofan	1.7402	0.9183	0.6445
<b>Total</b>	<b>37.3533</b>	<b>50.9525</b>	<b>55.4857</b>

Tubiechong este o sursă excelentă de proteine de înaltă calitate și este bogat în aminoacizi. Aminoacizii, peptidele și proteinele sunt cunoscute în mod obișnuit ca componente majore ale organismelor animale și au fost confirmate prin studii moderne ca componente specifice ale biomasei de origine animală cu scopuri nutritive și medicinale unice. S-a constatat, că Tubiechong conține 18 tipuri de aminoacizi, dintre care Gly, Ala, Pro, Tyr, Arg, Lys Ser și Ala. Aminoacizii hidrofobi reprezintă circa 46,7% și ar putea crește solubilitatea în lipide și

activitatea peptidelor produsului. S-a confirmat o activitate antioxidantă puternică pentru un produs peptidic și fracțiunile sale purificate [166].

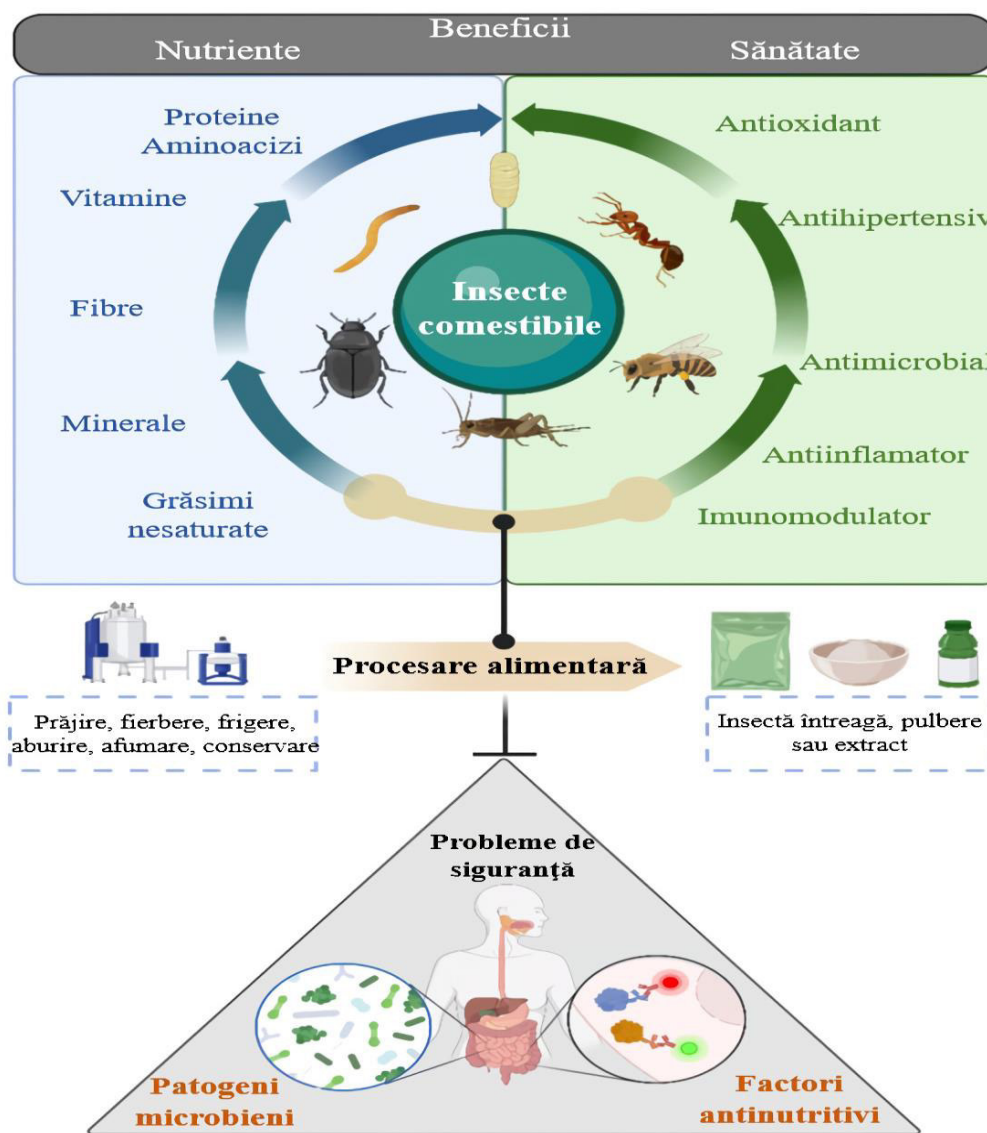
Lipidele extrase din ESW conțin circa 75% acizi grași nesaturați, iar acidul linoleic reprezintă 28,5%. Efectul tonic al preparatului Tubiechong se poate datora acizilor grași esențiali ca ingrediente nutriționale în combinație cu aminoacizii esențiali și unele vitamine. Analiza chimică a descoperit prezența a 6 componente lipidice, identificate ca acizi grași saturați și polinesaturați, care au reprezentat 97,55%. Extractul uleios de Tubiechong a constatat dintr-o cantitate semnificativă de acizi grași saturați și nesaturați, inclusiv acid palmitic (21,70%), acid cis-9-oleic (40,78%), acid cis-9,12-linoleic (21,86%), cis-9-palmitoleat (9,86%), cis-9,12,15-linolenat (1,69%) și miristat (1,67%). Extractul care conține o cantitate mare de acizi grași oleici și polinesaturați manifestă efecte antiinflamatorii, antitumorale și cardioprotectoare. Fenilpropanoizii, care includ: fenilpropanoizi simpli, cumarine, lignani, lignine și flavonoide, reprezintă un grup important de produse naturale cu efecte antimicrobiene, antioxidante, antiinflamatorii, antidiabetice și antitumorale. S-au evidențiat un grup de alcaloizi cu proprietăți antitumorale, imunomodulatoare, antiinflamatoare și antioxidante [166].

Lăcusta *Oxya yezoensis* are un conținut bogat de proteine (68,1%) și scăzut de acizi grași (4%) din masa uscată. Analiza componentei extractului metanolic a relevat un conținut de acizi grași ca acid linolenic, acid linoleic, acid palmitic și acid stearic. S-a raportat, că acizii grași nesaturați în pupele viermelui de mătase a îmbunătățit profilul lipidic și a anihilat parametrii stresului oxidativ la șobolanii cu hipercolesterolemie [136].

Insectele, indiferent de ordine și specie, au un conținut mare de calciu, cupru, mangan, zinc, iar unele se disting printr-un aport de fier (31-77 mg/100g) și zinc (14 mg/100g). Cantitatea de vitamine lipo- și hidrosolubile poate varia la fiecare specie de insecte cu un interval de 0,1-7,7 mg pentru tiamină, 0,11-8,9 mg – riboflavină, 0,47-5,4 mg pentru vitamina B12. Carbohidrații constituie fibrele insectelor, în principal se găsesc în chitina exoscheletului cu un conținut de 3-50 mg/kg greutate corporală. Chitina insectelor acționează ca celuloza umană, compuși care sunt asociați cu ameliorarea sistemului imun, reducerea reacțiilor alergice la oameni și protecție împotriva infecțiilor parazitare [113].

Substanțele biologic active din insecte (proteine, peptide, aminoacizi esențiali și non-esențiali, lipide, acizi grași saturați și nesaturați, carbohidrați, vitamine și minerale etc.) asigură variate proprietăți: antioxidante [2, 47, 86, 99, 103, 138, 178]; antiinflamatoare [2, 47, 86, 103, 178]; antimicrobiene [2, 47, 86, 103, 178]; antitumorale [47, 86, 99]; antidiabetice [86, 178]; antihipertensive [2, 47, 86, 99, 103, 178]; antiobezitate [86, 99, 103, 178]; hipolipemiante [86, 99, 103, 178]; antiproliferative [103]; antitrombotice [47].

Dezavantajele și provocările legate de consumul de insecte poate fi determinat de percepția consumatorului (neofobie, dezgust etc.), precum și de riscurile asociate cu consumul de insecte (sensibilizare primară și reacții alergice la proteinele de insecte, contaminarea cu virusuri și bacterii, conținutul de insecticide și pesticide, prezența micotoxinelor și antinutrienților (fig.1.4) [2, 80, 112].



de

**Figura 1.4 Beneficiile și siguranța insectelor comestibile [Aguilar-Toalá J.E.,2022].**

Entomofagia, deși capătă un interes tot mai mare, implementată pe scară largă ar putea prezenta un șir de restricții și dezavantaje. Siguranța asociată cu utilizarea insectelor comestibile ar putea fi un factor major care va determina includerea lor în dieta umană. Unele studii au raportat pericole pentru siguranța alimentelor și factorii nutriționali asociați cu insectele comestibile, care ar putea fi limitate prin metodele de procesare (fierberea, prăjirea, coacerea etc.). S-a demonstrat, că un pericol semnificativ prezintă micotoxinele produse în intestinalele insectelor, responsabile de

boli acute și cronice. La insectele comestibile s-a raportat prezența aflatoxinei, cea mai periculoasă micotoxină, nivelul căreia poate depăși limita reglementată și s-ar putea datora contaminării în condiții de uscare deschise și neigienice. Mai multe studii au raportat contaminarea insectelor comestibile cu diferite metale grele, dar nu s-au estimat pericole suplimentare în comparație cu sursele convenționale de hrană pentru animale. S-a determinat, că cantitatea de antinutrienți, care impune mai multe probleme de sănătate, nu depășește limita reglementată și, astfel, potențiala amenințare a antinutrienților la insectele comestibile este minoră. O problemă discutabilă prezintă contaminarea cu paraziți și microorganisme patogene, prezența reziduurilor de pesticide la insectele comestibile. S-a expus, că acest pericol se păstrează în cazul recoltării insectelor comestibile sălbatice, dar care se reduce semnificativ la creșterea industrială în condiții controlate. La insectele comestibile au fost identificați diverși alergeni, iar reacțiile alergice implică în principal tropomiozina și argininkinaza (peste 70%). Cu toate acestea, alergenii prezenți la insectele comestibile nu pot fi controlați bine prin modificări ale factorilor externi, deoarece sunt un factor de risc endogen pentru sănătate. De asemenea, s-a raportat că încălzirea și digestia nu pot elimina potențialele reacții alergice ale insectelor comestibile. Alergenii nedeclarați ar putea reprezenta o amenințare, chiar și cauze de deces, pentru persoanele sensibile la alergeni. Astfel, persoanele cu reacții alergice la crustacee (artropode) au arătat un potențial mare de reactivitate încrucișată cu insectele comestibile. În acest context, alergenii de insecte comestibile trebuie identificați și declarați, iar aportul de insecte comestibile ca surse de hrană trebuie luat în considerare cu atenție [2, 86].

În concluzie, insectele comestibile reprezintă o sursă remarcabilă de nutrienți prin conținutul de proteine, aminoacizi, lipide, chitină și vitamine în perspectiva atenuării problemelor deficitului de alimente la nivel mondial. Utilizarea insectelor necesită luarea în considerare atât a beneficiilor pentru sănătate, cât și aspectele de siguranță. În acest context, dacă beneficiile insectelor sunt demonstrate prin substanțele biologic active, ce manifestă variate proprietăți (antioxidante, antihipertensive, antiinflamatorii, antimicrobiene, imunomodulatoare etc.), atunci aspectele de siguranță, precum perceperea de consumatori (neofobie, dezgust etc.) și riscurile asociate cu consumul de insecte (sensibilizare, reacții alergice, contaminarea cu virusuri și bacterii, conținutul de insecticide și pesticide, prezența micotoxinelor și antinutrientelor) necesită o abordare mai argumentată cu dovezi științifice.

## **1.2 Proprietățile farmacologice ale preparatelor de origine entomologică**

Umanitatea, din timpurile străvechi a folosit natura în viața cotidiană, fie pentru rezolvarea problemelor nutriționale, fie pentru a combate sau preîntâmpina un șir de maladii. În acest context, plantele au fost sursele cele mai larg folosite în formă nativă (infuzii, decocturi, tincturi,

extracte), iar ulterior ca preparate neogalenice sau compuși purificați datorită conținutului de substanțe biologice active (flavonoide, glicozide, alcaloizi, terpeni etc.). Iar în ultimele decenii, insectele, datorită numărului mult mai mare comparativ cu plantele (circa 3 mln), au devenit un obiect important de studiu științific. Acestea prezintă interes prin numărul lor și prin modul de adaptare și reacționare la condițiile variate ale mediului. Insectele sunt capabile să producă o mulțime de substanțe biologice active (peptide, hormoni, feromoni, lipide, proteine, glucide, enzime, vitamine, antioxidanți, ioni etc.), ce pot servi ca un model de imitare sau, ce e și mai important, ca o sursă nouă pentru obținerea preparatelor medicamentoase. Interesul față de insecte a fost determinat de posibilitatea obținerii din extractele și/sau liofilizatele acestora a unui șir de compuși bioactivi, produse naturale și/sau derivați sintetici prin aplicarea tehnologiei moleculare și bioingineriei. Cercetările din ultimele decenii au demonstrat, că substanțele biologice active din insecte manifestă variate proprietăți: antioxidante [2, 46, 86, 95, 99, 102, 103, 127, 137, 138, 173, 174, 178, 193]; imunomodulatoare [2, 4, 38, 47, 86, 97, 109, 165, 167]; antiinflamatorii [2, 43, 46, 47, 51, 86, 103, 178]; antibacteriene [2, 47, 86, 100, 103, 130, 169, 174, 178, 195, 200]; antifungice [57, 195, 200]; antivirale [126, 175, 195, 200], antitumorale [23, 36, 38, 47, 86, 99, 195, 200]; hepatoprotectoare [41, 118, 127]; antidiabetice [86, 178]; antihipertensive [2, 86, 99, 103, 178]; hipolipemice [86, 99, 103, 178]; antiproliferative [103]; antitrombotice [41, 47, 130, 165].

**Acțiunea antioxidantă.** În organismul insectelor există un complex de enzime antioxidante și detoxicante, destinate eliminării speciilor reactive ale oxigenului, ce se formează în lupta cu agenții patogeni. La insecte se determină atât enzime antioxidante (SOD, Catalaza, GST, peroxidaze), cât și antioxidanți neenzimatici (compuși fenolici, alfa-tocoferol, acid ascorbic, tioli cu masă moleculară mică și mare). Enzimele antioxidante se caracterizează prin acțiune specifică înaltă pentru neutralizarea SRO, dar odată cu aceasta pot bloca și melanogeneza. S-a demonstrat că catalaza și SOD pot reduce intensitatea oxidării 3-4-dihidrofenilalaninei (DOPA) și dopaminei de către fenoloxidază. SOD este implicată în formarea tirozil-radicalului și altor SRO citotoxice, ce participă la eliminarea paraziților. Astfel, antioxidanții asigură controlul melanogenezei și o pot bloca, iar pe de altă parte – pot fi un atribut important al activității SRO, destinate nimicirii agenților patogeni. În procesele de neutralizare a SRO în hemolimfă, antioxidanților neenzimatici le revine rolul principal în menținerea echilibrului de oxido-reducere la dezvoltarea proceselor de incapsulare a agentului patogen [193].

Aproximativ 31 specii de insecte au fost cercetate experimental în vederea potențialului antioxidant pe modele *in vitro* și *in vivo*. Rezultatele studiilor au demonstrat, că fracțiunile și

hidrolizatele din insecte au manifestat proprietăți antioxidante *in vivo* (în ser, ficat etc.) și *in vitro* cu mecanisme de acțiune variind de la creșterea capacității antioxidante până la modularea enzimelor antioxidante endogene. Astfel, s-a constatat neutralizarea radicalilor, chelarea ionilor metalelor, modularea G-S-T și catalazei. Studiile disponibile au demonstrat clar că toate insectele testate, cu potență variabile, au fost capabile să reducă stresul oxidativ indus, modulând starea redox a fluidelor celulare și corporale și restabilind activitatea afectată a enzimelor antioxidante [46].

Insectele prezintă o sursă importantă de proteine, minerale, vitamine, acizi grași, antioxidanți datorită taxonomiei și obiceiurilor alimentare. Studiul, realizat de Di Mattia et al., a comparat activitatea antioxidantă a fracțiunii liposolubile și hidrosolubile a 12 specii de insecte comestibile cu sucul proaspăt de portocale și uleiul de măsline. Rezultatele au arătat, că extractele hidrosolubile din lăcuste, viermi de mătase și greieri prezintă cele mai mari valori relevate în testul TEAC (capacitate antioxidantă echivalentă cu Trolox), care manifestau o activitate de 5 ori mai mare decât cele ale sucului proaspăt de portocale. În plus, extractele hidrosolubile de lăcuste, omizi africane și greieri au avut o putere de reducere a ionilor ferici (FRAP) dublă față de sucul proaspăt de portocale. În ceea ce privește fracția liposolubilă, viermii de mătase, cicadele de seară și omizile africane au prezentat un TEAC de două ori mai mare decât uleiul de măsline. În cadrul aceluiași studiu s-a constatat, că după conținutul fenolic probele din insecte nu prezentau valori mai mari în comparație cu sucul proaspăt de portocale, ceea ce sugerează, că capacitatea lor antioxidantă se datorează nu doar acestei clase de compuși. Mai mulți autori au estimat, că proteinele pot să contribuie și ele la efectul antioxidant. Analiza comparativă a demonstrat, că principalii compuși antioxidanți din sucul de portocale sunt acidul ascorbic și substanțele fenolice solubile în apă, iar pentru uleiul de măsline, tocoferoli și substanțele fenolice amfifilice. Aceste date sugerează, că insectele sunt înzestrate cu un model deosebit de componente redox, variind de la compuși fenolici, proteine până la compuși neidentificați, capabili să contracareze stresul oxidativ în mediul apos și lipofil [48].

Extractele proteice și peptidele insectelor au atras atenția cercetătorilor. Produsele de hidroliză a proteinelor larvelor de muște domestice au determinat o activitate de captare a radicalilor superoxid și hidroxil, iar un hidrolizat de proteine din larve de viermi de mătase a prezentat o activitate mare de reducere a radicalilor DPPH și chelare a ionilor feroși. Peptidele bioactive, obținute din hidroliza greierilor întregi au demonstrat activitate antioxidantă, relevată prin reducerea radicalului DPPH. O peptidă purificată din furnica țesătoare (*Oecophylla smaragdina*) a prezentat o puternică reducere a radicalilor DPPH și ABTS. Concomitent cu produsele proteice, chitosanul din insecte, la fel, prezenta o sursă de substanțe active



antioxidante. Chitosanul izolat din larvele *Musca domestica* a demonstrat o capacitate antioxidantă marcată la testul DPPH, mai intensă chiar decât acidul ascorbic, și o capacitate de reducere și de chelare a ionilor feroși [178].

La analiza componentei hidrolizatorilor au fost identificați aminoacizii, care au contribuit la activitatea antioxidantă, așa ca: glutamatul (Glu), aspartatul (Asp), arginina (Arg) și lizina (Lys). S-a estimat, că aminoacizii aromatici și hidrofobi, prezenți în extractele de *Musca domestica*, au contribuit la reducerea radicalilor DPPH. Un șir de autori au confirmat activitatea antioxidantă a extractelor și hidrolizatorilor din *T.molitor* și *A.domesticus*, care era direct proporțională cu gradul de hidroliză și nivelul de peptide cu masa moleculară mică, ceea ce a determinat o capacitate mai mare de captare a radicalilor DPPH. Totodată, activitatea de reducere a radicalilor DPPH a extractelor hidrice, alcoolice și hidro-alcoolice din *T.molitor* și *A.domesticus* a fost în concordanță cu conținutul de compuși fenolici [4, 86].

Analiza prin cromatografie gazoasă a extractului din *T.molitor* a identificat 42 compuși, subdivizați în funcție de familia chimică în lipide, compuși de azot, acizi organici, carbohidrați, steroli, hidrocarburi și. O pondere mai mare au constituit-o lipidele, inclusiv acidul linoleic și acidul oleic, urmate de monogliceride. Acidul oleic a demonstrat influențe benefice incontestabile asupra sănătății, în timp ce acidul linoleic poate crește nivelul mediatorilor proinflamatori prin majorarea raportului n-6/n-3 a acizilor grași nesaturați peste 5. O revizuire recentă a determinat efectele pozitive ale acidului linoleic asupra sănătății cardiovasculare și cardiometabolice [103].

Aminoacizii liberi au constituit al II-lea grup de compuși a extractului de *T.molitor*, prolina constituind fracția majoră, urmată de tirozină și acid piroglutamic. Prolina - aminoacid esențial, poate modula mediul redox intracelular și proteja față de stresul oxidativ. Concomitent, prolina anihilează efectele LPS asupra parametrilor stresului oxidativ și complexelor moleculare ale lanțului respirator mitocondrial. Printre alți compuși cu proprietăți antioxidante au fost identificați acidul azelaic și acidul izocitric [103].

Activitatea antioxidantă la diferite insecte a fost asociată cu conținutul ridicat de proteine sau de prezența biopeptidelor. Biopeptidele, molecule proteice mici (6 kDa) compuse din mai puțin de 20 de resturi de aminoacizi, pot manifesta diverse proprietăți biologice, inclusiv antioxidante. S-a raportat, că biopeptidele din viermele bumbacului (*Spodoptera littoralis*) prezintă o capacitate evidentă de reducere a ionilor ferici (FRAP) și a radicalului DPPH. [138].

Neutralizarea radicalilor hidroxilici și peroxidului de hidrogen a fost cercetată, utilizând 29 de peptide antioxidante izolate din hidrolizatul din lăptișorul de matcă (LM), dintre care 12 peptide mici cu 2-4 reziduuri de aminoacizi (Ala-Lys, Phe-Arg, Ile-Arg, Lys-Phe, Lys-Leu, Lys-

Tyr, Arg-Tyr, Tyr-Asp, Tyr-Tyr, Leu-Asn-Arg și Lys-Asn-Tyr-Pro) au prezentat cea mai puternică activitate. Trei dipeptide (Lys-Tyr, Arg-Tyr și Tyr-Tyr) din LM au indicat o activitate puternică de cicatrizare datorită cedării atomului de hidrogen din grupa lor hidroxil fenolică [3].

Peptidele derivate din hidroliza enzimatică a *Eupolyphaga sinensis* Walker pot elimina radicalii liberi hidroxil, anionii superoxid și DPPH, reduce conținutul dialdehidei malonice (DAM) și majorarea activității catalazei, glutation peroxidazei (GPx), superoxid dismutazei (SOD) în ficat [166].

Derivații fenolici reprezintă o altă clasă importantă, responsabilă de potențialul antioxidant al insectelor. Compușii bioactivi fenolici acționează ca antioxidanți prin creșterea activității superoxid dismutazei (SOD), GPx, conținutului glutationului (GSH) și micșorarea nivelului monoxidului de azot (NO) și DAM [4].

Compușii fenolici posedă și alte activități biologice, precum antiinflamatorii, antioxidante, anticancerigene, antimicrobiene, antihipertensive și antihiperglicemiant. S-a raportat prezența acidului clorogenic, epicatechinei, acidului cumaric, acidului cafeic, acidului galic, kaempferolului și galatului de epicatechină în *Ascra cordifera*, *Brachygastra mellifica* și *Hermetia illucens*. La determinarea activității antioxidante prin metodele ABTS, DPPH și FRAP s-au constatat diferențe în funcție de alimentația insectelor și anume, s-a modificat conținutul de  $\delta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol și  $\alpha$ -tocoferol. În acest context, s-a estimat că și metaboliții insectelor reprezintă o sursă de compuși bioactivi, unii dintre care nu se găsesc în plante [138].

Este bine cunoscut că polifenolii manifestă proprietăți antioxidante în funcție de structura grupărilor funcționale. Grupările hidroxil determină acțiunea antioxidantă prin captarea radicalilor și capacitatea de chelare a ionilor metalelor. La fel, polifenolii pot determina suprimarea formării SRO prin inhibarea enzimelor implicate în producerea lor și/sau reglarea protecției antioxidante. Polifenolii pot interacționa cu compușii nepolari din membrana plasmatică cu reducerea oxidării lipidelor sau proteinelor. Unele flavonoide pot diminua disponibilitatea oxidanților și proteja, astfel, structura și funcția membranei. Polifenolii pot modula producerea de NO prin interacțiunea cu sintazele NO. Astfel, s-a relatat, că unele flavonoide (cvercetina, silibinina, luteolina) pot inhiba activitatea xantinoxidazei, responsabile de producerea radicalilor liberi. S-a confirmat, de asemenea, că flavonidele pot reduce activitatea peroxidazei și inhiba eliberarea de radicali liberi de către neutrofile și activarea acestora de alfa<sub>1</sub>-antritripsină [74].

Extractul metanolic din lăcusta *Oxya yezoensis* a determinat o activitate antioxidantă prin creșterea activității SOD și reducerea radicalului DPPH, care a fost în corelație cu conținutul de compuși fenolici. În aceleași condiții extractul hexanolic nu a prezentat activitate antioxidantă,

dar a manifestat inhibarea beta-hexozaminidazei prin conținutul bogat de acizi grași, precum acid linolenic, acid linoleic și acid oleic cu posibile efecte antialergice [136]. Compușii fenolici, la fel, par să joace un rol important în efectul antioxidant al extractelor de insecte, acestea derivând din metabolizarea de către insecte a fenolilor din plantele ingerate, cât și capacității insectelor de a sintetiza compuși fenolici *de novo* [107].

Investigațiile metabolomice pentru flavonoide din insectele comestibile sunt foarte limitate. Până în prezent, aproximativ 85 de compuși flavonoizi au fost identificați din 22 de specii de insecte din 3 familii pentru Hymenoptera, Acrididae și Lepidoptera. Insectele nu pot sintetiza flavonoide, dar le pot acumula din plantele ingerate. Xin Fu et al. a încercat o abordare metabolomică pentru a identifica flavonoidele la viermele de mătase de stejar chinezesc, *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville (*Lepidoptera: Saturniidae*). S-au identificat peste 200 de metaboliți flavonoizi din intestinul mediu al larvelor de *A. pernyi*, care aparțin la opt subclase, inclusiv flavone, flavonoli, flavonoide, flavanone, polifenoli, izoflavone, antociane și proantocianidine [167].

Extractele din *Acheta domesticus* și *Tenebrio molitor*, obținute prin procedee noi de extragere asistată cu ultrasunete și extracție lichidă sub presiune au relevat activitate antioxidantă marcată. Prin metoda cromatografiei de gaze cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS), s-a determinat că substanțele ce prezentau activitate antioxidantă, au constituit în principal compuși fenolici totali [102].

Catechina, o substanță de natură polifenolică identificată în extractul etanolic de *Holotrichia parallela* Motschulsky, poate deriva din cuticula insectelor sau din plantele pe care insectele le consumă [1].

Componența diferită a insectelor, determinată de stadiul de dezvoltare a acestora la momentul preparării extractelor asigură potențial antioxidant diferit. Studiul derivatelor din gândacul *Serrognathus platymelus castanicolor* Motschulsky, la diferite etape de dezvoltare, a demonstrat, că extractele metanolice din stadiul de pupă au manifestat o activitate antioxidantă mai mare decât adulții sau larvele, relevant în testele ABTS și ORAC [147].

S-a demonstrat, că afecțiunile inflamatorii sunt însoțite de stres oxidativ care agravează și mai mult evoluția procesului patologic. În cadrul procesului inflamator celulele sunt expuse la o varietate de oxizi cu formarea ulterioară a complexelor cu ADN-ul, lipidele și structurile proteice ce determină modificări organizaționale majore. Speciile reactive de oxigen (SRO), oxidanți binecunoscuți, induc diverse enzime protectoare, precum SOD, CAT, GR etc. pentru a reduce stresul oxidativ. Mecanismul enzimatic de apărare față de SRO stimulat prin utilizarea diverselor

alimente/biomateriale poate induce efecte antioxidante suplimentare și prin urmare ameliorarea procesului inflamator [143].

Studiile experimentale *in vitro* au demonstrat activitate antioxidantă marcată a supernatantului din gândacii integri de *Periplaneta americana* prin captarea radicalilor ABTS și DPPH într-o manieră dozo-dependentă. Cercetările pe model de inflamație, indusă prin caragenan, au relatat, că extractul din gândacii americani a redus nivelul de DAM și a restabilit conținutul de GSH și SOD. S-a constatat o corelație între stresul oxidativ și inflamație datorită SRO, care induc activarea NF-kB, ce reglează expresia IL-1-beta, IL-6 și TNF-alfa. Extractul din *Periplaneta americana* a inhibat expresia ARNm și producerea de citokine proinflamatorii în celulele stimulate prin LPS [105].

Extractele de Lepidoptera au potențialul de a atenua stresul oxidativ, precum și proprietăți imunostimulatoare. Son H-U. et al. a evaluat cinci specii de fluturi (*Papilio maackii*, *Papilio xuthus*, *Pieris rapae*, *Eurema hecabe* și *Sasakia charonda*), s-a cercetat supernatantul obținut după centrifugarea extractelor obținute cu diferiți solvenți (apă distilată, dimetil sulfoxid (DMSO), etanol și metanol). Extractul hidric și etanolic de *Papilio maackii* a demonstrat o activitate de reducere a radicalului DPPH de 80%, cel metanolic - 70% și extractul cu DMSO de 47%. Pentru extractele de *Pieris rapae* și *Eurema hecabe* s-a relevat o activitate antioxidantă cu 20% mai mică decât cea a altor tipuri de extracte. În testul FRAP, activitatea creștea într-o manieră dependentă de timp, cu excepția extractelor *Pieris rapae* și *Eurema hecabe*. S-a determinat, că extractul apos a prezentat o activitate antioxidantă mai mare decât orice alt sistem de solvenți. În general, cea mai activă probă a constituit extractul de *Papilio maackii*, indiferent de sistemul de solvent utilizat [143].

Lepidopterele conțin o mulțime de alcaloizi, inclusiv isoxantopteri, ce manifestă activități antibacteriene, antitumorale și antiinflamatorii, iar prin conținutul de compuși fenolici, larvele lor au demonstrat activitate antioxidantă [143].

Sistemul de apărare antioxidantă intracelulară, format din enzime antioxidante (SOD, CAT, GST etc.), substanțe neenzimatice (vitamina C, vitamina E etc.) și compuși cu grupări tiol (GSH) este capabil să reducă SRO sau să prevină formarea acestora. Incubarea extractului apos din *Vespa affinis* (EAVA) cu enzimele recombinante rGST și rCAT a crescut semnificativ activitatea lor în comparație cu cele observate în probele doar cu enzimă recombinată sau extract. Aceasta poate explica rolul inhibitor al acestuia în producerea de radicali liberi în sistemul liber celular, la incubarea EAVA cu plasmă umană a demonstrat creșterea activității GST. Studiul pe model de cultură celulară de monocite a demonstrat, că tratamentul cu un pro-oxidant, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a provocat o scădere semnificativă a activității GST și CAT, iar suplimentarea cu EAVA poate

preveni, de asemenea, producția intracelulară de SRO indusă de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> în monocite. Potențialul antioxidant al extractului apos din *Vespa affinis* a fost comparabil cu cel al N-acetilcisteinei, antioxidant standard împotriva expunerii la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. S-a observat, de asemenea, o majorare semnificativă a conținutului total de tiol în EAVA. Astfel, extractul hidric din *Vespa affinis* a demonstrat un rol benefic în stresul oxidativ, prin inhibarea producerii de radicali liberi și stimularea activității enzimelor antioxidante [52, 110].

Hidrolizatele din larvele de *Tenebrio molitor* au prezentat activitate de captare a radicalilor liberi, iar pe liniile celulare mioblastice, s-a demonstrat că greierul *Brachytrupes orientalis* scade producerea de SRO intracelulare, peroxidarea lipidelor și reglarea expresiei proteinei Nrf2 și glutatión S-transferazei, implicate în răspunsul la stres [48].

Lăptișorul de matcă (LM) suplimentat în dieta șobolanilor Sprague – Dawley alimentați cu fumonisină contaminată (FB) (200 mg/kg) a atenuat efectul nociv al FB prin îmbunătățirea formării GPx și reducerea efectelor peroxidării lipidelor și generării radicalilor liberi. LM poate preveni genotoxicitatea indusă de cadmiu și stresul oxidativ la șoareci, prin creșterea nivelului de GSH și reducerea nivelului de MDA. La șobolanii expuși la cisplatină și tetraclorură de carbon, administrarea LM poate crește rezistența împotriva stresului oxidativ a țesuturilor hepatice și renale, ceea ce se manifesta prin scăderea producției de MDA și creșterea concentrației enzimelor antioxidante celulare (SOD, CAT, GR și GPx). În mod similar, MRJP-2 (proteine majore din LM) manifestă acțiune antioxidantă prin scăderea activității caspazei-3 și a apoptozei celulare induse de stresul oxidativ, urmată de creșterea viabilității celulare [3].

Studiile pe modelele de animale au fost în concordanță cu rezultatele *in vitro* și au demonstrat efecte antioxidante ale insectelor cu un mecanism de acțiune variind de la creșterea capacității antioxidante până la modularea enzimelor antioxidante endogene. S-a estimat, că efectul antioxidant a fost mai evident în cazul prezenței factorilor de stres specifici, precum dieta bogată în grăsimi, stresul oxidativ, obezitatea, boala hepatică alcoolică sau iradierea UV [46].

Inflamația este un răspuns normal la infecții și alți factori nocivi și este mediată de sistemul imunitar înăscut și adaptativ al organismului, dar care fiind stimulat excesiv duce la dezvoltarea afecțiunilor inflamatorii cronice și boli autoimune. Totodată, afecțiunile inflamatorii sunt însoțite de stresul oxidativ, care agravează și mai mult evoluția procesului patologic. Medicamentele antiinflamatoare nesteroidiene și steroidiene sunt eficiente în diferite faze ale inflamației, dar pot produce concomitent diferite efecte secundare asupra gazdei. Prin urmare, atenția științifică se concentrează intens asupra entomoterapiei, deoarece compușii de origine entomologică pot inhiba secreția de citokine și pot regla expresia genelor, precum și a proteinelor pentru moleculele de semnalizare implicate în patofiziologia inflamației [53]. Concomitent preparatele

de origine entomologică prezintă o gamă de compuși bioactivi cu efecte benefice cum ar fi activitatea antioxidantă, imunomodulatoare, detoxifiantă, ce poate ameliora suplimentar evoluția procesului inflamator [4, 86, 103, 109, 166, 178].

Studiile experimentale pe *Drosophilla melanogaster* au demonstrat că rezistența la stresul oxidativ este influențată de peptidele antimicrobiene (diptericina etc.), care contribuie la menținerea și/sau restabilirea echilibrului redox prin creșterea activității enzimelor antioxidante și prevenirea majorării SRO și a depleției GSH [173].

Studiile statutului antioxidant (SOD, catalaza, GR, GPx, DT-diaforaza, G-6-PDH ) la pupele a 4 specii de *Plecoptera*, cu particularitățile ecologice și biologice, au demonstrat că fiecare din ele au un potențial enzimatic antioxidant important, care este condiționat de durata perioadei de pupă și mai puțin de condițiile permanente sau temporare ale mediului ambiant. Acestea relevă, că insectele respective au o suficientă variabilitate a mecanismelor și adaptarea ecologică îi permit să înfrunte condițiile nefavorabile [137].

S-a estimat, că compușii activi, precum aminoacizii esențiali arginina, histidina, lizina, metionina, cisteina și proteinele posedă și o capacitate antioxidantă, relevată prin testul de reducere a ionilor ferici, capacitatea de absorbție a radicalilor de oxigen și radicalului hidroxil, proprietăți de captare a peroxidului de hidrogen. S-a concluzionat că aminoacizii și proteinele inhibă oxidarea lipidelor prin mecanisme proiectate biologic (enzime antioxidante și proteine de legare a fierului) sau prin mecanisme nespecifice [26, 154].

Extractul etanolic din pupa de vierme de mătase (*Bombyx mori*) în studii experimentale a determinat o reducere a nivelului de glucoză din sânge și la o îmbunătățire a greutateii corporale prin inhibarea expresiei factorului de necroză tumorală renală TNF- $\alpha$ , proteinei chemoattractante monocitare-1, fibronectinei și protein kinazei activate mitogenice P38, precum și a majorat nivelul SOD și GPO. Extractul etanolic a redus nivelul TNF- $\alpha$ , FN și MCP-1 în rinichi, îngroșarea membranei glomerulare, a împiedicat creșterea matricei glomerulare mezangiale, mărirea glomerulară și scleroza locală în nefropatia diabetică experimentală. Concomitent, la nivelul rinichilor s-a restabilit nivelul enzimelor antioxidante și s-a diminuat conținutul DAM. S-a concluzionat, că extractul etanolic din pupa de vierme de mătase poate anihila stresul oxidativ și dezactiva fosforilarea proteinkinazei activate de mitogeni p38 la șoarecii cu diabet zaharat tip 2 și, astfel, reduce secreția de citokine inflamatoare și dezvoltarea fibrozei în nefropatia diabetică [162, 172].

**Acțiunea antiinflamatoare.** S-a constatat, că insectele constituie o sursă bună de peptide cu proprietăți antiinflamatoare. Activitatea antiinflamatoare prin inhibarea lipooxigenazei (LOX)

și ciclooxigenazei (COX)] a fost mai mare în peptidele și hidrolizatele obținute după digestia proteinelor insectelor, decât în insectele crude [1].

Chitina și chitosanul, produs de deacetilare a chitinei, manifestă proprietăți imunostimulatoare, antimicrobiene, antifungice, antiinflamatoare, antitumorale și antioxidante. Astfel, fragmentele de chitină de <40 μm au proprietăți antiinflamatoare prin creșterea eliberării de interleukină (IL)-10 și reglarea intensității inflamației locale [1].

Persoanele, care timp de 2 săptămâni au consumat un mic dejun îmbogățit cu 25 g de pulbere din greieri, au manifestat o reducere a nivelului TNF-α în plasmă. Frația de peptide din lăcusta *Schistocerca Gregaria* a prezentat activitate inhibitoare a LOX și COX-2 [48]

Sistemele antioxidante ale insectelor sunt de o importanță crucială în mecanismele de apărare împotriva xenobioticelor care produc specii reactive de oxigen (SRO) endogene la insecte. Nivelurile crescute de radicali din xenobiotice, precum metaboliții secundari din plante, sunt asociate cu stresul oxidativ în țesuturile intestinului mediu ale larvelor de lepidoptere. Xenobioticele (alelochimicele prooxidante, metalele grele, pesticidele) și metabolismul lor sunt asociate cu producerea de radicali liberi, care reacționează cu diverse biomolecule și afectează funcțiile celulare. Acești radicali sunt eliminați de sistemele de apărare antioxidante înnăscute, inclusiv enzimele antioxidante și diverși compuși antioxidanți. Deficiența sistemului de apărare antioxidantă duce la creșterea SRO, care interacționează cu multe biomolecule celulare, inclusiv proteine, lipide, enzime, carbohidrați și AND cu afectarea lor. Insectele, pentru a depăși efectele toxice ale SRO, au dezvoltat un mecanism antioxidant complex constituit în principal din acțiunea enzimatică a glutatation peroxidazei (GPX), catalazei (CAT), superoxid dismutazei (SOD), ascorbat peroxidazei și glutatation transferazelor (GST). La insecte, GST-urile sunt implicate în transformarea multor insecticide, iar supraexpresia lor este responsabilă pentru dezvoltarea rezistenței împotriva acelor insecticide. Glutatation-S-transferazele prezintă activitate glutatation peroxidazică independentă de seleniu și pot îndepărta componentele electrofile foarte reactive, precum hidroperoxizi lipidici (DAM, trans 4-hidroxi-2-nonenal), generate de peroxidarea lipidelor inițiată de SRO. După expunerea la xenobiotice, nivelurile crescute de DAM au fost corelate cu o varietate de leziuni ale țesuturilor și membranei celulare la animale [31].

Numeroase molecule purtătoare de informații și sistemele lor de transducție a semnalului sunt responsabile de integrarea și homeostazia insectelor. Eicosanoidele, produse bioactive sintetizate din acizi grași polinesaturați (acidul arahidonic etc.), sunt bine cunoscute pentru acțiunile lor importante în fiziologia și bolile mamiferelor. Unele studii au demonstrat că eicosanoizii mediază răspunsurile oxidative și antioxidante prin deteriorarea mediată de SRO în

țesuturile mamiferelor. Eicosanoizii acționează în multe domenii ale biologiei insectelor, inclusiv transportul de ioni, traficul de proteine, reproducere și apărarea imună, în care exercită variate influențe stimulative și inhibitoare. Pe baza acestor informații, Büyükgüzel și colab. au lansat pentru prima dată ipoteza că eicosanoizii acționează în apărarea antioxidantă în hemolimfa insectelor și în menținerea fiziologiei homeostatice. Aceste rezultate au condus la investigarea rolului eicosanoizilor în sistemele de apărare antioxidante ale altor țesuturi de insecte. S-a relevat modificarea răspunsului oxidativ și antioxidant de către inhibitorii de biosinteză a eicosanoidelor (EBI), evidențiat prin conținutul crescut de MDA și activitatea GST în intestinul mediu al larvelor *Galleria mellonella* (L.) [31].

La larvele de molia *Galleria mellonella* (Lepidoptere), crescute pe diete artificiale cu inhibitori ai biosintezei eicosanoidelor (dexametazonă, esculetină și fenidonă) s-a studiat influența asupra indicatorului stresului oxidativ (DAM) și a enzimei de detoxifiere - GST. Esculetina, inhibitor de lipooxigenază, a crescut semnificativ conținutul de DAM la concentrații de 0,01, 0,1 și 1,0%, iar activitatea GST a fost semnificativ crescută doar la cea mai mare concentrație testată. Dexametazona, inhibitor al fosfolipazei A2, a crescut semnificativ conținutul de DAM și activitatea GST la concentrații de 0,01, 0,1 și 1,0%. Fenidona, inhibitor dublu al COX și LOX, a crescut conținutul de DAM, iar în concentrații de 0,01 și 0,1% fenidona a crescut semnificativ activitatea GST. Aceste rezultate susțin postularea că eicosanoidele sunt operative în răspunsurile oxidative și antioxidante la insecte. Aceste date extind acțiunile eicosanoidelor cunoscute asupra sistemelor de apărare antioxidantă ale insectelor și indică faptul că eicosanoidele, cel puțin prostaglandinele sau produsele lipooxigenazei, acționează în reacțiile antioxidante enzimatiche ale insectelor [31].

Activitatea și nivelul enzimelor antioxidante sunt strâns legate de răspunsul celular la stresul oxidativ. Căile COX și LOX sunt responsabile pentru metabolismul acidului arahidonic la insecte ca și la vertebrate. Inhibarea biosintezei eicosanoidelor, care joacă roluri fiziologice importante la insecte, poate duce la producerea de SRO, care facilitează peroxidarea lipidelor. Prostaglandinele (PG) au fost biosintetizate în intestinale medii ale diferitor insecte lepidoptere. Eicosanoidele au fost implicate în funcția sistemelor oxidative și antioxidante în timpul procesului fiziologic și fiziopatologic al mamiferelor. Studiile pe nevertebrat marin au demonstrat scăderea activităților GR, CAT și SOD în urma tratamentului cu concentrații mici de prostaglandină E2 (PGE2), în timp ce concentrațiile mai mari de PGE2, invers, au crescut toate cele 3 enzime antioxidante și au inhibat apoptoza. Aceste date sunt în concordanță cu rezultatele, că tratamentul cu inhibitorii biosintezei eicosanoidelor a condus la modificări mari ale răspunsului oxidativ și antioxidant, remarcate prin conținutul crescut de DAM și activitățile



GST. Creșterea nivelului de peroxidare a lipidelor ca răspuns la esculetină nu a fost corelată semnificativ cu activitatea GST modificată, dar GST pare să fie semnificativ legată de modificările conținutului de DAM la larvele cu diete artificiale care conțin fenidonă și dexametazonă. Concentrațiile alimentare mari de dexametazonă au crescut conținutul de DAM și activitățile GST. Creșterea conținutului de DAM și a activității GST, asociate cu stresul oxidativ, ar putea fi rezultatul unui răspuns metabolic adaptiv la provocarea prooxidativă cauzată de inhibarea biosintezei eicosanoidelor la larvele de *G. mellonella*. Răspunsul oxidativ și antioxidant modificat poate reflecta o încercare a larvelor de a contracara producția crescută de SRO pentru a menține homeostazia [31].

Unele studii au demonstrat inducerea GST la afidele și muștele de casă expuse la xenobiotice și agenți oxidativi. Glutation-S-transferazele insectelor pot contribui la apărarea antioxidantă prin activitatea directă a GPx, prevenind și reparând daunele generate de SRO. Acestea catalizează etapele esențiale ale oxigenării acidului arahidonic în biosinteza PGF2 $\alpha$  și a prostaglandinei E2 (PGE2) și a unor produse LOX la mamifere. GST este asociată cu prostaglandin sintazele dependente de GSH (sintazele E și D2), ambele fiind membri ai proteinelor asociate membranei în metabolismul eicosanoidelor și glutatationului la mamifere. Unele produse de prostaglandine (PG) au indus, de asemenea, expresia GST-azelor. Produsele COX și LOX mediază răspunsurile imune celulare și umorale la *G. mellonella*, în care indometacina și esculetina au afectat fagocitoza hemocitară și cascada fenoloxidazei. Astfel, s-a concluzionat că inhibarea biosintezei eicosanoidului poate duce la o perturbare serioasă a apărării antioxidante, așa cum este evidențiată de activitățile GST modificate la larvele moliei de ceară. Studiile cu indometacină și dexametazonă indică faptul că deteriorarea viabilității celulare este însoțită de un dezechilibru al enzimelor antioxidante dependente de glutatation, GST și GPx asociate cu modificări în biosinteza eicosanoidului la unele vertebrate și nevertebrate. [31].

Activitățile enzimatiche modificate pot fi atribuite sintezei proteinelor aberante sau legate de stres ca răspuns la provocările oxidative determinate de inhibarea biosintezei eicosanoidului. S-a raportat, că prostaglandina A1 (PGA1) și prostaglandina E1 (PGE1) mediază expresia genică a unor proteine de protecție celulară, inclusiv proteina asemănătoare GST, subunitatea 2 GST, catalaza și superoxid dismutază implicate în funcția de detoxifiere și protecție împotriva SRO. Inhibitorii biosintezei eicosanoidelor pot provoca stres oxidativ prin SRO, precum și prin acțiunea lor inhibitoare asupra biosintezei eicosanoidelor, semnificativă pentru deteriorarea apărării antioxidante. Astfel, s-a demonstrat că răspunsurile antioxidante din intestinul mediu sunt modificate de un sistem fiziologic, care include biosinteza eicosanoidelor. Conținutul modificat de DAM din intestinul mediu și activitatea GST la larvele hrănite cu inhibitorii

biosintezei eicosanoidelor se pot dovedi de mare importanță pentru o mai bună înțelegere a rolului eicosanoizilor în răspunsul oxidativ și antioxidant în diferite țesuturi de *G. mellonella*. Funcțiile de reglare ale eicosanoidelor care sunt prezente la niveluri scăzute în țesuturile insectelor, sunt direcționate spre menținerea unei homeostazii a stării oxidative și antioxidante, ca și în menținerea fiziologiei homeostatice la evenimente cruciale din ciclurile de viață. Conținutul crescut de DAM și activitățile GST în țesutul intestinului mediu poate fi rezultatul inhibării biosintezei eicosanoidelor, care împiedică funcția de menținere a homeostaziei oxidative. Această sugestie a fost demonstrată la suplimentarea mai multor produse PG în dieta artificială, când s-au inversat efectele de deteriorare ale inhibitorilor biosintezei eicosanoidelor asupra diferitelor sisteme fiziologice în unele țesuturi ale larvelor de insecte lepidoptere, sugerând că produsele COX și LOX pot fi implicate în homeostazia fiziologică în majoritatea țesuturilor insectelor [31].

Ciclooxigenaza-2 (COX-2), un biomarker molecular specific procesului inflamator ce determină formarea eicosanoizilor (PG), poate fi studiată ca un indicator al activității antiinflamatoare a preparatelor cercetate la inducerea prin diferiți agenți biologici. Expresia promotorului genei COX-2 a fost studiată pentru cinci specii de fluturi (*Papilio maackii*, *Papilio xuthus*, *Pieris rapae*, *Eurema hecabe* și *Sasakia charonda*) sub formă de extrase prin apă distilată, dimetil sulfoxid (DMSO), etanol și metanol, care a determinat că fiecare probă nu a prezentat diferențe semnificative, dar extractul DMSO de *Papilio xuthus* a demonstrat cea mai puternică activitate în testul de expresie a promotorului [143].

Răspunsul inflamator constă într-o varietate mare de procese fiziologice și patologice. Mediatorii inflamației (TNF, IL-1, IL-6), produși local, activează endoteliul vascular, cu expresia moleculelor de adeziune, urmate de legarea, rularea și aderența celulară. Celulele polimorfonucleare și macrofagele ajung în țesuturi, migrează către stimulii inflamatori datorită gradientului de chemokine pentru fagocite și elimină ținta. Un răspuns inflamator excesiv poate provoca leziuni tisulare, în timp ce unul bine reglat poate proteja gazda și remodela structura țesuturilor, restabilind astfel funcția țesuturilor după leziune. Răspunsul inflamator acut poate duce la moartea pacientului, iar inflamațiile cronice pot provoca leziuni tisulare ireversibile sau induce insuficiență de organ [29].

Activarea macrofagelor, celule importante în răspunsul imun și inflamator, poate începe după ce LPS interacționează cu receptorii de recunoaștere a modelului (PRR) prezenți în membranele macrofagelor și poate induce producerea de citokine proinflamatorii, precum IL-6, IL-1 și TNF, și citokine imunostimulatoare, precum IL-12. Studiul diferitor doze ale extractelor apoase și metanolice de alga marină *Caulerpa mexicana* asupra macrofagelor, cu și fără

stimulare LPS, a demonstrat, că acestea nu au generat producerea de citokine proinflamatorii și au fost capabile să inhibe producerea acestor citokine induse de LPS, prezentând activitate antiinflamatoare *in vitro*. Mecanismele de acțiune ale acestor extracte, posibil, pot fi determinate de conținutul de substanțe care inhibă sau concurează cu ligandul LPS, receptorul Toll-like 4 (TLR4) sau molecula CD14, care este co-receptor pentru LPS sau se leagă cu unele molecule de pe suprafața macrofagelor, inhibând semnalele biochimice induse de LPS pentru producerea de citokine proinflamatorii [29].

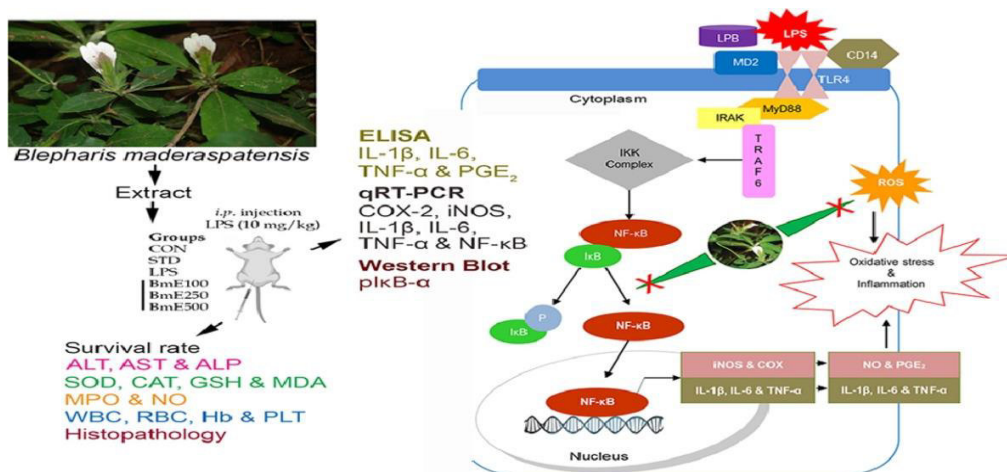
Proprietățile antiinflamatoare ale insectelor comestibile au fost evaluate atât *in vivo*, cât și pe modele celulare. În studiile *in vivo* s-a constatat o reducere a nivelurilor de citokine circulante, induse de diferiți factori de stres, la administrarea produselor entomologice. O creștere a nivelurilor de citokine a fost constatată numai la doze mari de *Hermetia illucens*, administrate peștilor sănătoși, fără a fi confirmate prin modificări inflamatorii la analiza histologică. În studii pe subiecți sănătoși s-a demonstrat reducerea nivelurilor circulante de TNF- $\alpha$ , date care necesită investigații suplimentare deoarece acestea, posibil, aveau un nivel redus de inflamație. Nivelul NF- $\kappa$ B - factor de transcripție implicat în răspunsurile inflamatorii, a fost scăzut în modelele celulare și la animale. Concomitent, nivelurile TLR4, a căror stimulare duce la activarea NF- $\kappa$ B, nu au fost afectate. În unele studii s-a arătat activitate în reducerea producției de NO în macrofage, un radical implicat în modularea inflamației și a imunității. În concluzie, dovezile din modelele celulare și animale susțin un efect asupra reducerii citokinelor inflamatorii prin modularea nivelurilor de NF- $\kappa$ B, fără a afecta imunoglobulinele [46].

Insectele, furnicile (ordinul *Hymenoptera*, familia *Formicidae*), albinele și viespele (*Hymenoptera*, subordinul *Apocrita*) posedă o multitudine de toxine neexplorate cu activități biologice marcate. Furnicile exprimă mai multe tipuri de peptide în veninurile lor, devenind astfel o sursă esențială de peptide bioactive. Cele mai studiate sunt furnicile din genurile *Solenopsis*, *Pachycondyla spp* și *Myrmecia*. În forme brute și izolate, caracterizarea și verificarea mai multor peptide bioactive din veninul speciilor *Pseudomyrmex*, cum ar fi peptida mirmexin, s-a dovedit a avea o activitate antiexudativă marcată. În studiile *in vivo* s-a observat, că poneratoxina, o peptidă cu 25 de reziduuri din *Paraponera clavate*, și unele peptide *Formicidae*, pot reduce edemul și manifesta o activitate antinociceptivă. Utilizarea topică a furnicilor gigantice macerate *Dinopera quadriceps* pentru tratamentul durerilor reumatice și colonicilor, iar extractele brute au redus edemul labei, migrarea leucocitelor, conținutul DAM și de nitriți cu ameliorarea peritonitei acute. Extractul conținea molecule modulatorie ale mecanismelor celulare oxidante/antioxidante implicate în inflamația acută provocată de zimosan. Veninul brut are potențialul de a reduce nocicepția și IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, ce sugerează suprimarea formării

mediatorilor inflamatori prin COX-2. Toxinele derivate din furnicile *Brachyponera sennaarensis* modulează nu numai durerea, ci și răspunsul imunitar prin reglarea expresiei MHC-II, CD80 și CD-86, precum și interferonului- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) și interleukinei-17 (IL-17), mediatori care sunt implicați în diferite patologii cronice și cancer, așa cum au fost demonstrat studiile *in vivo*. Peptidele din toxine pot stimula factorul nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), kinaza I $\kappa$ B și suprima factorul de transcripție nuclear- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) și receptorul de moarte la suprafața celulei (Fas) [49].

Administrarea LPS la animale s-a dovedit a fi un model experimental adecvat și reproductibil pentru studierea proceselor inflamatoare. LPS la pătrunderea în sânge pot provoca reacții inflamatorii cu creșterea nivelului mediatorilor proinflamatori celulari (PGE2, NO, leucotriene) și citokinelor proinflamatorii (IL-1 $\beta$ , IL-6 și TNF- $\alpha$  etc.) prin calea de semnalizare NF- $\kappa$ B. În acest caz, LPS s-ar putea atașa de proteinele de legare a LPS (LBP) din plasmă, iar acest complex LBP-LPS posedă afinitate pentru MD2 și CD14 care se conectează împreună la TLR4. Cuplarea LPS la TLR4 duce la activarea NF- $\kappa$ B prin recrutarea și activarea MyD88, IRAK, TRAF-6, precum și NOX, și în cele din urmă, declanșează eliberarea de mediatori proinflamatori și citokine. LPS au crescut nivelul de expresie a ARNm al NF- $\kappa$ B, au stimulat fosforilarea și degradarea rapidă a inhibitorului kappa B (I $\kappa$ B), permițând NF- $\kappa$ B să se transloce în nucleu, unde se leagă de promotori și activează transcrierea genelor de răspuns inflamator. Activarea NF- $\kappa$ B, prin expresia citokinelor proinflamatorii și mediatorilor, declanșează dilatarea vaselor, creșterea fluxului sanguin, infiltrarea leucocitelor, eliberarea de proteaze și formarea de SRO și SRA. Astfel, semnalizarea NF- $\kappa$ B acționează ca o verigă cheie a răspunsului inflamator și joacă un rol esențial în reglarea căilor de semnalizare inflamatorie, iar elucidarea unui preparat cu diverse funcții fiziologice și farmacologice sau a unei formulări sinergice cu activitate policomponentă asupra țintelor patogenetice ale inflamației ar fi binevenită [75].

Lipopolizaharidele cresc expresia ARNm a iNOS și COX-2 cu producerea de NO și PGE2. Leziunile induse de LPS au determinat o creștere a nivelului de NO, care poate reacționa cu anionul superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) pentru a forma peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>) un puternic anion citotoxic, care poate stimula producția de IL-1 $\beta$ , IL-6 și TNF- $\alpha$  prin activarea NF- $\kappa$ B sensibil la oxidant. Expresia COX-2, indusă de LPS are ca rezultat o eliberare a PGE2, care provoacă durere, febră, edem și sensibilitate. Prin urmare, inhibarea iNOS și NO împreună cu COX-2 și PGE2 ar putea avea efecte terapeutice potențiale pentru prevenirea inflamației și a durerii asociate [75].



**Figura 1.5. Mecanismele patogenice de acțiune ale LPS [Ijnu T.P.,2022].**

Inflamația sistemică declanșată de LPS se caracterizează prin perturbarea echilibrului redox intracelular și acumularea excesivă de SRO. Dezechilibrul pro-oxidant/antioxidant, precum și căile celulare implicate în activarea NF-κB, se consideră mecanismele cheie ale stresului oxidativ. Producția crescută de SRO activează NF-κB, care controlează producerea de citokine proinflamatorii (IL-1, IL-6 și TNF-α) și cauzează epuizarea antioxidanților celulari, cât și creșterea conținutului DAM. Expunerea la LPS a crescut semnificativ nivelul DAM, ce indică leziuni tisulare cu reacții în lanț, și scăderea activității sistemului antioxidant celular. LPS au produs stres oxidativ cu diminuarea nivelului enzimelor antioxidante (SOD, CAT etc.) și a antioxidanților neenzimatici (GSH), epuizați pentru neutralizarea anionului superoxid ( $O_2^-$ ), radicalilor hidroxil ( $\cdot OH$ ) și peroxidului de hidrogen ( $H_2O_2$ ) [75].

Activitatea antiinflamatoare a fost demonstrată pentru insectele *Polyrhachis dives*, *Licorma delicatula*, *G.sigilatus*, *T.molitor* și *S.gregaria*. La extragerea cu etanol au fost separați 13 compuși nepeptidici cu acțiune antiinflamatoare. Unii compuși au inhibat proliferarea limfocitelor T stimulate, precum și au redus producția de TNF-alfa în macrofagele stimulate de LPS, au inhibat COX-1 și JAK 3 kinaza, responsabile de răspunsul inflamator. Extractul apos de *L.delicatula* a prezentat acțiune antiinflamatoare în macrofagele stimulate de LPS prin inhibarea dozo-dependentă a secreției de citokine proinflamatorii, IL-13 și reducerea activității metaloproteinazelor, responsabile de inducerea mediatorilor inflamatori (citokine, factori de creștere, molecule de adeziune). Zielinska etc. au raportat, că hidrolizatele de *G.sigilatus*, *T.molitor* și *S.gregaria* au determinat inhibarea lipooxygenazei (LOX) și COX-2 și, respectiv, reducerea producției de leucotriene și prostaglandine [4, 86].

La pretratarea macrofagelor din SNC timp de 2 ore cu extract hidro-alcoolic din *T.molitor* în doze de 10, 25 și 50 pg/ml la suplimentarea LPS (200 pg/ml) și incubarea timp de 16 ore a demonstrat reducerea nivelului NOS inductibile (NOSi). Studiile cu extractele proteice de

*T.molitor* au demonstrat, că acestea inhibau semnificativ producerea de NO fără citotoxicitate în macrofagele stimulate cu LPS și reduceau nivelul de expresie a COX-2 și proteinei NOSi prin reglarea protein kinazelor activate de mitogeni (MAPK) și a factorului nuclear kappa B (NF-kB). Extractul hidric de *T.molitor* a redus producerea de NO într-o manieră dozodependentă, la fel și expresia NOSi cu o diminuare a nivelului proteinelor PGE2, NOSi, COX-2, MAPK [103].

S-a stabilit că insectele sunt surse de agenți activi pentru medicina modernă. Multe insecte, cum ar fi albinele, muștele, furnicile, gândacii și insectele hematofage sunt utilizate pentru a obține preparate cu acțiune antibacteriană, antitumorală sau antitrombotică. Studiile chimice au indicat că Tubiechong a generat mulți compuși activi, inclusiv proteine, aminoacizi, peptide, acizi grași, alcaloizi, nucleozide, polizaharide, vitamine liposolubile și elemente minerale, iar unii componenți au fost purificați și identificați. Tubiechong, produs entomologic obținut din *Eupolyphaga sinensis* Walker sau *Polyphaga plancyi* Bolivar, familia *Corydiidae* (Blattodea), este utilizat pe larg în medicina tradițională chineză pentru tratamentul multor maladii și afecțiuni patologice datorită proprietăților anticoagulante, antitrombotice, antitumorale, antioxidante, imunomodulatoare, hepatoprotectoare și hipolipemiente [166].

Studiul acțiunii antiinflamatoare a nectarului de albine a demonstrat că extractul etanolic, în comparație cu cel hidric, a manifestat o acțiune mai marcată relevată prin diminuarea edemului, indus de carrageenan, inhibarea COX-2, fără a o influența pe cea a COX-1, și a diminuat nivelul NO prin inhibarea NOS inductibile în concentrații dozo-dependente. Analiza componentelor extractului etanolic a demonstrat un conținut de flavonoide și glicozide flavonoide: quercetină-7-rannoizidă, kaempferol-3-glucozidă, izorhamnetin, kaempferol și cvercetină sub formă de aglicone. S-a raportat că acțiunea antiinflamatoare poate fi determinată de flavonoizi, inclusiv cvercetina, care inhibă activitatea enzimelor implicate în metabolizarea acidului arahidonic (fosfolipază A2, ciclooxigenază și lipooxigenază) și în modularea expresiei genice a COX-2, NOS inductibile și a mai multor citokine [96].

**Acțiunea hepatoprotectoare.** Produsele de apicultură se cunosc și se utilizează ca remedii curative și profilactice în diferite maladii. La studierea componenței homogenatului și liofilizatului din larvele de albine s-a constatat o asemănare a componenței, care conține 20 aminoacizi (inclusiv 10 esențiali), 30 acizi grași superiori (inclusiv 3 nesaturați), acizi dicarbonici și mono-, di- și trioxiacizi, eteri compuși ai acizilor grași, gliceride, fosfogliceride, sterine, vitamine hidro- și liposolubile, microelemente [184].

Homogenatul din larvele de albine (50 și 200 mg/kg), la șobolanii cu afecțiune hepatică, indusă prin CCl<sub>4</sub> și izoniazidă, a normalizat parametrii rezistenței imune nespecifice (lizocim, betalizine, activitatea bactericidă a plasmei, activitatea fagocitozei) și biochimici ai funcției

ficatului (AlAT, AsAT, glicogen, colesterol, trigliceride, proteine totale și acizi nucleici în ficat. Liofilizatul din larvele de albine, la șobolanii cu leziunea hepatică indusă prin CCl<sub>4</sub>, a normalizat parametrii fagocitozei și nivelul lizocimului și bilirubinei totale, a micșorat activitatea ALAT și FAL, iar în ficat a diminuat conținutul colesterolului și trigliceridelor, dar a majorat cantitatea glicogenului. Aceste efecte a homogenatului s-au dovedit a fi superioare celor obținute la utilizarea apilacul-ui și Liv 52 [185].

Proteina purificată din *Bombyx mori* a manifestat efect hepatoprotector față de afecțiunea hepatică indusă de CCl<sub>4</sub> prin micșorarea activității transaminazelor datorită efectului antioxidant, demonstrat *in vitro* prin capacitatea de captare a radicalilor liberi și anionului superoxid [127].

Larvele de *Musca domestica* sunt folosite în mod tradițional ca agenți terapeutici iar recent au fost raportate efectele antioxidante, antibacteriene, antitumorale și imunomodulatoare. Concomitent, s-a raportat că extractele îmbogățite cu proteine ale larvelor de muscă de casă posedă un potențial efect hepatoprotector și activitate antivirală. O gamă de preparate tradiționale chinezești au fost folosite pentru tratamentul hepatitei B în baza strategiilor terapeutice: reducerea încărcăturii virale; îmbunătățirea funcției hepatice; reducerea inflamației; ameliorarea funcției imune; reglarea metabolismul lipidelor; diminuarea fibrozei hepatice. În cadrul studiului s-a demonstrat, că extractele îmbogățite cu proteine ale larvelor de muscă de casă inhibă replicarea virusului hepatitic B *in vitro* prin scăderea producerii de HBsAg și HBeAg. În concordanță cu efectele inhibitoare asupra producerii de HBsAg și HBeAg, a fost observată o diminuare semnificativă a nivelului intracelular și extracelular de ADN viral și a scăzut nivelul proteinei citoplasmatică a virusului hepatic B. Aceste rezultate au sugerat, că extractele îmbogățite cu proteine ale larvelor de muscă de casă au inhibat replicarea VHB, producerea și secreția de proteine virale [92].

Lăptișorul de matcă a demonstrat un efect hepatoprotector în leziunile hepatice toxice induse de paracetamol, CCl<sub>4</sub>, cisplatină, azatioprină etc. S-a constatat, că acțiunea hepatoprotectoare a lăptișorului de matcă a fost determinată de activitatea antioxidantă (inhibarea peroxidării lipidelor, creșterea capacității antioxidante totale, neutralizarea și eliminarea radicalilor liberi, micșorarea nivelului dialdehidei malonice), antiinflamatoare (diminuarea nivelului TNF- $\alpha$ ) și antiapoptotică [3].

Acțiunea hepatoprotectoare a preparatelor de origine entomologică a fost cercetată experimental, pe modele de inducere a afecțiunilor hepatice toxice cu paracetamol, tetraclorură de carbon și ischemice cu fenilefrină, și în studiile clinice la pacienții cu hepatite de origine toxică și virală. Pretratamentul cu preparatele entomologice a diminuat eficient hepatotoxicitatea paracetamolului și tetraclorurii de carbon prin preîntâmpinarea dezvoltării dereglărilor

morfologice în ficat, micșorarea sindromului de citoliză, colestază și de intoxicație endogenă, corecția stresului oxidativ, menținerea adecvată a proceselor energetice și sintetice. Administrarea preparatelor de origine entomologică, în hepatică toxică indusă prin paracetamol, a contribuit la ameliorarea sindromului de citoliză și colestază, dar cu o diferită intensitate: imuheptinul a influențat mai eficient sindromul de citoliză și moderat cel de colestază, entoheptinul a diminuat mai marcat sindromul de colestază și moderat cel de citoliză, iar imupurinul a manifestat eficacitate moderată față de ambele sindroame, care devenea mai intensă odată cu creșterea duratei tratamentului. Preparatele entomologice exercitau acțiuni modulatorie asupra proceselor metabolice (corectarea hiper- sau hipoglicemiei, hipercolesterolemiei și hiperproteinemiei relative) în ficat, în funcție de evoluția și de durata afecțiunii toxice induse de paracetamol. Tratamentul cu preparatele de origine entomologică a determinat o anihilare a afecțiunii ischemice a ficatului, relevantă prin reducerea activității în ser și restabilirea nivelului în ficat a enzimelor citolitice, micșorarea moderată a sindromului de colestază și de insuficiență hepato-celulară [10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 65, 68, 123, 182, 188, 190].

Studiile clinice au demonstrat că includerea preparatelor de origine entomologică în tratamentul complex al hepatitelor virale cronice a contribuit la o ameliorare mai rapidă și mai marcată a tabloului clinic, o anihilare semnificativă a activității transaminazelor, fosfatazei alcaline, gama-glutamyltranspeptidazei, o normalizare a sindromului de colestază, o micșorare a proceselor de peroxidare a lipidelor, o amplificare a funcției sintetice a ficatului, o modulare a parametrilor sistemului imun. Tratamentul complex cu preparatele entomologice al pacienților cu hepatite cronice de diferită genă a contribuit la o ameliorare mai rapidă a sindromului asteno-vegetativ, algic și dispeptic, o diminuare semnificativă a sindromului moderat de citoliză și de colestază, a proceselor de peroxidare a lipidelor, modularea parametrilor sistemului imun cu restabilirea imunității celulare [18, 19, 20, 21, 65, 67, 119, 125].

Sistemele enzimice ale insectelor ce participă la detoxicarea diferitor xenobiotice sunt monooxigenazele, esterazele și glutathion-S-transferaza (GST). Esterazele nespecifice exercită funcții importante la insecte: catabolismul eterilor acizilor grași superiori; mobilizarea lipidelor, inclusiv din corpul adipos; degradarea eterilor inerti metabolici, inclusiv xenobioticilor. Specificitatea largă a esterazelor reflectă rolul indispensabil în inactivarea toxinelor de diferită genă. GST participă la degradarea insecticidelor, eliminarea produselor metabolismului și protecția țesuturilor de radicali liberi. S-a constatat că GST și esterazele nespecifice participă în procesele metabolice ale insectelor și scindarea compușilor organofosforici, piretroizilor, carbamatelor, invenoizilor. S-a demonstrat expresia genelor enzimelor detoxicante, responsabile de mecanismele rezistenței la diferite xenobiotice la insectele din *Lepidoptera*, *Hemiptera*,



*Himenoptere* etc. Datele literaturii arată că în procesul infecțios (bacterian, fungic) la larvele *Galleria mellanella* L. și *Bombyx mori* are loc inducția unor noi izoforme de esteraze nespecifice și modificarea activității esterazelor în diferite organe [194].

**Acțiunea imunomodulatoare.** Sistemul imun al insectelor, deși încă pe deplin neelucidat, prin anumite mecanisme celulare și umorale, prezente pe toată scara evolutivă, asigură supraviețuirea și combaterea efectivă a agenților infecțioși. Prezența complexelor lipoproteice variate la diferite etape de dezvoltare ale insectelor (ou, larvă, pupă, imago) susțin ipoteza că acestea pot manifesta importante proprietăți imunotrope. Astfel, extrasele din insecte și/sau derivații sintetici, în funcție de peptide, polipeptide și substanțe biologice active, pot manifesta variate efecte asupra proceselor imunologice [36, 37, 38].

Insectele se deosebesc prin prezența unui sistem de apărare înăscut destul de dezvoltat. Una din particularitățile sistemului celular și umoral al insectelor este participarea activă a componentelor lor la modificările morfogenetice. Larvele se hrănesc permanent și cresc, adultul duce un mod activ de viață, se înmulțește și se răspândește, iar pupa combină faza de repaus fizic cu perturbări morfofuncționale interne compuse. Strategia formării răspunsului de apărare în cazul stadiilor scurte de ontogeneză se poate deosebi de cele de durată. În afară de aceasta, particularitățile funcționale ale reacțiilor de apărare ale insectelor se pot forma atât în rezultatul adaptării la condițiile de viață, cât și în funcție de stadiile ontogenetice de dezvoltare [198].

La insecte s-a descoperit peptida ce blochează creșterea, membră a familiei citokinelor, cu diverse funcții, inclusiv și controlul multiplicării și imunității. Această peptidă a fost raportată la 15 specii de *Lepidoptera*, iar recent și la *Diptera* (*Lucilia cuprina* și *Drosophilla melanogaster*), ce indică că aceasta nu este specifică numai la *Lepidoptere*. Peptida ce blochează creșterea constă din 19-30 reziduuri de aminoacizi, ancorată la lanțul C-terminal a unui precursor de 73-152 aminoacizi și se detectă la 5 ordine de insecte [97].

Peptidele antimicrobiene ale insectelor (PAM) pot manifesta activitate imunomodulatoare prin următoarele mecanisme: activarea celulelor imune; majorarea activității celulelor NK și limfocitelor T citotoxice; inducerea producției de citokine; inhibarea activității citokinelor inflamatorii și mediatorilor inflamatori; modularea căilor Toll receptorilor, căii de semnalizare a NF-kB și MAPK. În acest context, efectele imunomodulatoare ale unor clase de PAM de insecte (lepidoptere, diptere, coleoptere, himenoptere) și mecanismele determinate de calea lor de semnalizare pot oferi dovezi pentru domeniile de utilizare în medicină [168].

Analiza rezultatelor obținute referitoare la proprietățile imunotrope, ne relevă că preparatele de origine entomologică studiate, au majorat rezistența nespecifică a organismului și intensificat fagocitoza neutrofilelor și macrofagelor într-o manieră independentă de doză, fapt ce

ne vorbește că efectul imunotrop este determinat nu atât de cantitatea substanțelor active, cât de calitatea lor, prezența peptidelor, complexelor lipoproteice, polizaharidelor și altor lizate proteice, care sunt responsabile de stimularea sistemului imun și inactivarea agenților microbieni. Studiile *in vitro* cu anticorpi monoclonali au demonstrat că imupurininul și imuheptininul cresc nesemnificativ nivelul limfocitelor T (CD3+) și îl micșorează neesențial pe cel al limfocitelor B (CD20+) cu majorarea procentului T-helperilor (CD4+). Analiza indicelui de imunomodulare a demonstrat că imuheptininul și imupurininul posedă acțiune imunomodulatoare în cazul activității funcționale majorate a neutrofilelor și de stimulare în cazul celei cu grad redus. Entoheptininul a determinat proprietăți stimulative asupra activității funcționale a neutrofilelor indiferent de gradul inițial al acestuia. Imupurininul și imuheptininul exercită o acțiune imunomodulatoare asupra imunității celulare relevată prin majorarea limfocitelor T-helperi (CD4), o creștere nesemnificativă a limfocitelor citotoxice (CD8) și a indicelui de imunomodulare [13, 68, 70, 122].

Includerea imupurininului în tratamentul complex al pacienților cu infecția cu virusul imunodeficienței umane a contribuit la o dinamică pozitivă a numărului limfocitelor T-helperi și a încărcăturii virale, precum și la normalizarea activității ALAT și reducerea indicilor probei cu timol. Preparatul entomologic a influențat benefic asupra imunității celulare, posibil, prin restabilirea echilibrului Th1/Th2, cu manifestarea unui efect antiviral indirect prin normalizarea profilului citokinelor eliberate de limfocitele T [18, 19, 66, 69, 126].

**Acțiunea antitumorală.** Studiile experimentale au demonstrat că analogul peptidic al N-peptidei myristoilate (produs natural obținute din hemolimfa *Heliothis virescens*) a manifestat activitate față de 34 din cele 56 linii de celulele tumorale cu o inhibare a creșterii a peste 50% din celulele tumorale [114].

Peptida Polybia-MPI, izolată din *Polybia paulista*, a fost sintetizată și studiată acțiunea ei antitumorală. Rezultatele au relevat că peptida inhiba selectiv proliferarea celulelor canceroase ale prostatei și vezicii urinare cu o citotoxicitate inferioară față de fibroblastele normale. S-a constatat că efectul citotoxic și antiproliferativ este determinat de formarea porilor. Ulterior s-a studiat corelația dintre structură și activitatea antitumorală a 3 analogi prin substituirea Leu7, Ala8 și Asp9 cu L-prolină. Astfel, substituirea cu L-Pro a Leu7 sau Asp9 a redus conformația alfa-helix, iar cu L-Pro a Ala8 – a rupt conformația alfa-helix urmată de diminuarea semnificativă a activității antitumorale. Datele obținute au permis autorilor să confirme importanța structurii alfa-helix în realizarea acțiunii antitumorale ce deschid noi perspective terapeutice în tratamentul cancerului prostatei și vezicii urinare [161].

Studiul activității antitumorale a remarcat proprietatea alloferonului de a potența capacitatea limfocitelor din sângele periferic a persoanelor sănătoase de a liza celulele tumorale, similar interferonului alfa. Concomitent, preparatul a stimulat liza celulelor tumorale de către limfocitele citotoxice al bolnavilor oncologici. Efectul a fost mai manifest asupra NK-celulelor și mai marcat la bolnavii cu leucoză acută și cronică, dar mai mic la cei cu limfoame. Alloferon 1 și analogii lui 3 și 4, similar cu interferonul alfa, au stimulat activitatea citotoxică a limfocitelor persoanelor sănătoase și pacienților cu maladii oncologice [36]. Studiului preclinic al alloferonilor, inclusiv alloferon-1, față de celulele leucemiei în cadrul monoterapiei și tratamentului combinat cu ciclofosamidă, doxorubicină și vincristină a demonstrat un efect citostatic comparabil cu dozele mici de chimioterapice, iar la asocierea lor la puls terapie a obținut un efect antitumoral mai superior în comparație cu utilizarea separată a acestora [38].

Un șir de studii au raportat activitate antitumorală a diverselor componente ale insectelor. Extractul etanolic de *B.mori* a demonstrat activitate de inhibare a creșterii carcinomului hepatocelular. Cernysh S. etc au demonstrat capacitatea peptidei aloferon 1 de a inhiba cancerogeneza prin stimularea activității celulelor NK și a limfocitelor, iar în studiile experimentale au indus sinteza interferonului [38]. Chitosanul, izolat din larvele de *M.domestica*, a manifestat, la fel activitate antitumorală [4, 86].

Ațiunea antitumorală a produselor din insecte a fost documentată față de cancerul de sân, de col uterin, ovarian, cancerul hepatic, colorectal, pulmonar, pancreatic, esofagian, al limbii, vezicii urinare, leucemie, melanom etc. Substanțele biologice active derivate din insecte pot inhiba aderența celulelor tumorale, pot limita migrarea și invazia celulelor, pot inhiba proliferarea celulară și induce apoptoza prin reglarea diferitelor căi, precum Akt, Mapk și PKC. Concomitent, proprietățile antioxidante, antiinflamatorii și imunomodulatoare ale componentelor din insecte contribuie la efectele antitumorale. Au fost descrise efectele antitumorale la cantaridină și noncantaridină din gândacii blister (Meloidae), cordicepina și cecropina din viermi de mătase (Bombycidae), polizaharida și proteina din *Eupolyphaga sinensis* (Walker) (Blattodea: Corydiidae), derivații de chitosan din gândacii scarab (Scarabaeidae) și muște (Calliphoridae) [141].

**Activitatea antimicrobiană.** Datele studiilor *in vitro* și *in vivo* au demonstrat rezultate contradictorii referitor la influența peptidelor antimicrobiene (PAM) din diverse insecte asupra florei gram-pozitive (Gr+) și gram-negative (Gr-) și ciupercilor. S-a constatat, că activitatea antimicrobiană, îndeosebi la asocierea PAM, a fost determinată de deteriorarea învelișului bacterian cu creșterea accesului altor peptide la ținta intracelulară. Concomitent, s-a determinat și

o acțiune benefică asupra microbiomului intestinal cu creșterea producerii de acizi organici, acizi grași cu lanț scurt, reducerea efectelor secundare ale antibioticelor [4, 86].

Studiul proprietăților antimicrobiene *in vitro* a demonstrat, că substanțele cercetate (entoheptin, imuheptin și imupurin) nu au manifestat activitate antibacteriană față de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* și *Proteus vulgaris* și antivirală pe tulpinile de virusuri ARN-dependente (poliomielitic vaccinal tip 1, tip 2, tip 3, virusul stomatitei veziculare) și ADN-dependente (virusul herpes simplex tip 1). Testarea activității antifungice *in vitro* a demonstrat o activitate slabă la o concentrație de peste 600 μg/ml față de tulpinile de *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* și *Penicillium* [18].

Peptidele antimicrobiene, constituie o componentă esențială a imunității înnăscute la nevertebrate, vertebrate și plante. Aceste peptide sunt, de obicei, molecule mici, cationice și amfipatice capabile să interacționeze cu membranele lipidice. Caracterul cationic, format dintr-un număr mare de aminoacizi cationici (arginina, histidina, lizina) și reziduuri hidrofobe, se consideră un factor important responsabil pentru atracția electrostatică a peptidei de suprafața celulară încărcată negativ, tipică pentru microorganisme. Peptidele antimicrobiene cationice se leagă de reziduurile anionice ale învelișului bacterian extern, care includ lipopolizaharidele bacteriilor gram-negative și acizii lipoteichoici din formele gram-pozitive. Atașarea de membrana celulelor bacteriene externe, spre deosebire de antibiotice, nu implică receptori specifici pentru PAM, astfel încât este mai dificil pentru bacterii să dezvolte mutații și rezistență. Această legare are ca rezultat dereglarea integrității și permeabilității membranei celulare bacteriene externe și moartea microbiană. Partea amfipatică, cu regiuni hidrofile și hidrofobe, care mediază infiltrarea lor în membranele celulare fosfolipide, este o caracteristică cheie care determină legarea peptidelor de membrana celulară țintă. Interacțiunea electrostatică între componentele de suprafață încărcate negativ și moleculele de peptide încărcate pozitiv este o etapă inițială esențială de legare peptidică. Sarcina negativă a celulelor bacteriene este determinată de prezența LPS și acizilor lipoteichoici, în timp ce suprafața celulelor fungice este adesea acoperită de fosfomanoproteine anionice. Mai mult decât atât, diferențele în compoziția fosfolipidelor membranelor celulare procariote și eucariote, cu predominarea sarcinilor anionice, față de cele fără sarcină sunt importante pentru toxicitatea selectivă a PAM pentru celulele microbiene. Interacțiunile PAM cu membranele celulare țintă pot duce la o serie de efecte, precum depolarizarea membranei, creșterea permeabilității membranei, liza și pierderea componentelor intracelulare, provocând în cele din urmă moartea celulelor. Unele PAM

cationice pot traversa membrana celulară și interacționa cu constituenții anionici intracelulari, precum ADN și ARN [131, 145].

Majoritatea (65%) cercetărilor produselor din insecte s-au axat pe acțiunea antimicrobiană. S-a determinat, că produsele de origine entomologică inhibă circa 30 de specii de bacterii asociate cu infecțiile plăgilor (*Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. și *Proteus* sp.), infecțiile sistemului digestiv (*Helicobacter pylori*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*), infecțiile tractului urinar (*Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*) și alte infecții (*Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae*). Concomitent, s-a demonstrat capacitate de a inhiba fungi (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Candida* sp.etc.), virusuri (virusul febrei Rift Valley, virusul Coxsackie B4, virusul hepatitic B, virusul herptic etc.) și paraziți (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp., *Plasmodium* sp., *Haemonchus contortus* etc.). Mecanismele acțiunii antimicrobiene includ reducerea aderenței bacteriene la keratinocitele umane, diminuarea formării biofilmului, alterarea și perturbarea permeabilității membranei, deformarea peptidelor, producția de SRO, inhibarea și deteriorarea formării ADN. Responsabile de acțiune antimicrobiană sunt în principal peptidele antimicrobiene: coprisină, lebecină, drosocină, pronectina, cecropină etc., precum și anumiți acizi grași nesaturați, proteine (lectina, lizozima, cantaridina [Siddiqui SA et al., 2023].

### 1.3 Concluzii

1. Insectele reprezintă o sursă valoroasă de nutrienți, capabili să rezolve deficitul de alimente, și substanțe biologic active cu variate proprietăți farmacologice (antioxidante, antimicrobiene, imunomodulatoare, antiinflamatoare, antitumorale etc.) cu beneficii sigure pentru sănătate și posibilități de utilizare în tratamentul maladiilor și stărilor patologice.
2. Produsele și peptidele de origine entomologică prin componentele sale biologic active (proteine, aminoacizi, lipide, acizi polinesaturați, antioxidanți, compuși fenolici etc.) manifestă proprietăți antioxidante prin: creșterea capacității antioxidante; captarea și neutralizarea speciilor reactive de oxigen și azot; chelarea ionilor metalelor; reducerea nivelului produselor de peroxidare a lipidelor; modularea activității enzimelor antioxidante endogene (superoxiddismutaza, catalaza, glutatation peroxidaza, glutatation-S-transferaza).
3. Polifenolii din compușii fenolici (acidul clorogenic, acidul cumarinic, acidul galic, epicatechina, kaempferolul etc.), flavonoide (cvercetina, luteolina etc.) prin prezența în structură a grupelor funcționale manifestă acțiune antioxidantă prin: captarea radicalilor și capacitatea de chelare a ionilor metalelor; diminuarea disponibilității oxidanților și protecția

lipidelor și proteinelor membranare de oxidare; inhibarea activității enzimelor (xantinoxidazei, peroxidazei etc.) responsabile de producerea speciilor reactive de oxigen și azot.

4. Produsele de origine entomologică au manifestat acțiuni antiinflamatoare prin: inhibarea ciclooxigenazei și lipooxigenazei cu reducerea producerii de prostaglandine și leucotriene; diminuarea activității nitric oxid sintetazei inductibile și a nivelului monoxidului de azot, mediator al inflamației; reglarea căii MAPK și NF-κB.
5. S-a constatat o corelație între procesul inflamator și stresul oxidativ determinată de producerea speciilor reactive de oxigen cu alterarea metabolismului acidului arahidonic cu formarea eicosanoidelor prin creșterea activității ciclooxigenazei și lipooxigenazei și a mediatorilor inflamației (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6).
6. Acțiunea imunomodulatoare a produselor de origine entomologică se realizează prin următoarele mecanisme: activarea celulelor imune; majorarea activității celulelor NK și limfocitelor T citotoxice; inducerea producției de citokine; inhibarea activității citokinelor inflamatorii și mediatorilor inflamatori; modularea căilor Toll receptorilor, căii de semnalizare a factorului nuclear κB (NF-κB) și a protein kinazei activate de mitogen (MAPK).
7. Peptidele antimicrobiene, datorită caracterului cationic și amfipatic, prin interacțiunea cu membranele celulare manifestă acțiune antibacteriană prin: depolarizarea membranei; creșterea permeabilității membranare; liza și pierderea componentelor intracelulare; penetrarea în celulă și interacțiunea cu constituenții anionici intracelulari (AND, ARN).

## 2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

### 2.1. Caracteristica generală a studiului

Obiectele de studiu în cercetare au servit preparatele de origine entomologică IMUHEPTIN și IMUPURIN, preparatele obținute din insecte din ordinul *Lepidoptera*, genul *Lymantria* în stadiul de pupă (imupurin) și în stadiul de ou și pupă (imuheptin) produse de Arena Group SA, România. Prezența complexelor lipoproteice variate, în funcție de setul de peptide, polipeptide și preparate biologic active, la diferite etape de dezvoltare ale insectelor (ou, larvă, pupă, imago) susțin ipoteza că acestea pot manifesta importante proprietăți farmacologice (imunotrope, antiinflamatoare, antimicrobiene, antioxidante etc.).

S-au analizat rezultatele studiilor anterioare cu elaborarea metodologiei de cercetare a proprietăților antiinflamatoare ale preparatelor entomologice. S-a studiat literatura de specialitate referitor la acțiunea antiinflamatoare și mecanismele posibile de realizare a acesteia la preparatele de origine entomologică. În baza analizei literaturii de specialitate pentru studiul acțiunii antiinflamatoare a preparatelor de origine entomologică s-au selectat metodele *in vitro* și *in vivo* de cercetare, care permit de a evalua intensitatea efectului antiinflamator și a înainta ipotezele mecanismelor de realizare a acestuia (fig.2.1).

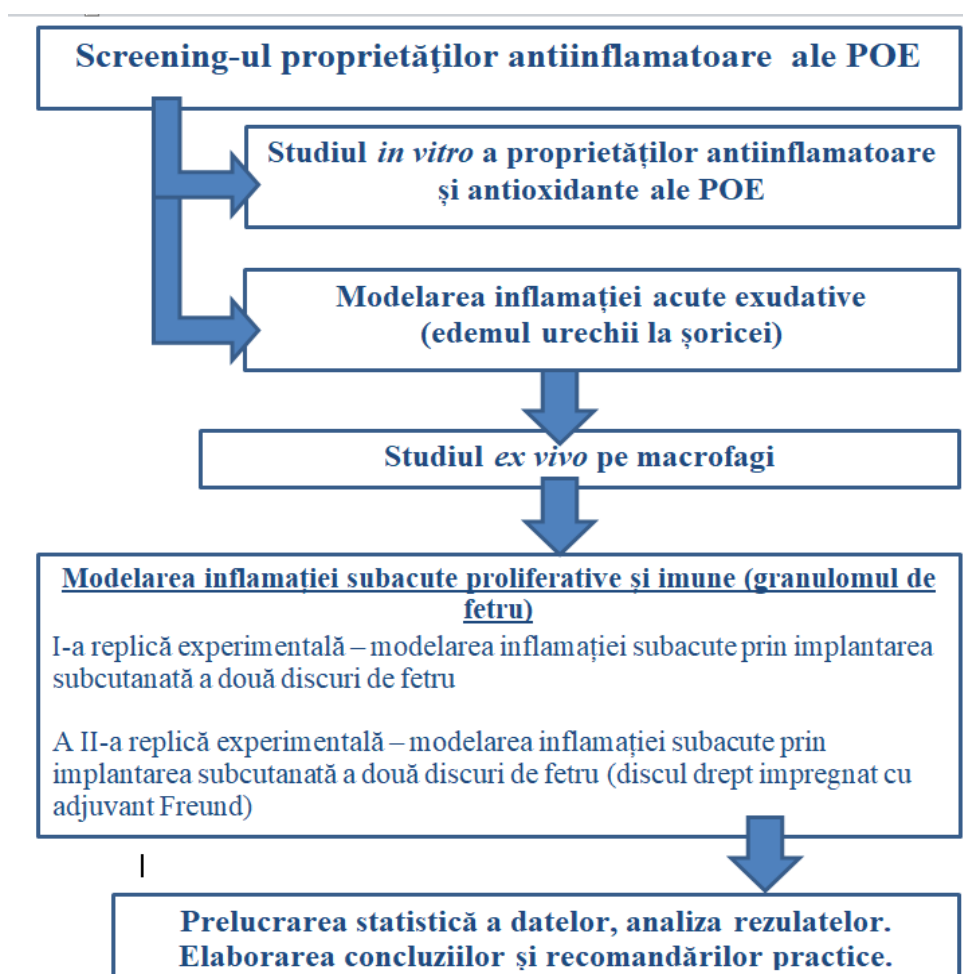
Cercetarea este un studiu analitic experimental preclinic, efectuat pe animale de laborator, respectând rigorile științifice și principiile etice de cercetare instituționale, naționale și internaționale. Totodată au fost realizate metode *ex vivo* (pe macrofagi) și *in vitro* de cercetare.

Studiul a fost realizat în cadrul Catedrei de farmacologie și farmacologie clinică și în Laboratorul de biochimie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” Protocolul experimental a fost aprobat prin avizul favorabil al Comitetului de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” nr. 78 din data de 22.06.2015.

Studiile experimentale *in vivo* s-au axat pe screening-ul proprietăților antiinflamatoare prin modelarea edemului urechei la șoricei prin aplicarea de xilen, precum și realizarea unui studiu aprofundat prin modelarea inflamației subacute și cronice cu elucidarea influenței asupra proceselor de exudație și proliferare prin utilizarea metodelor în baza recomandărilor contemporane [62, 87, 127, 134, 140, 179, 196, 197].

Respectând condițiile eticii științifice și conform “conceptului celor trei R” (introdus în 1959 de Russel și Burch), experiențele au fost realizate utilizând un număr minim de animale ce ar asigura veridicitatea rezultatelor.

Studiul a inclus 29 șoricea albi, femele și masculi, cu masa corporală de la 25 până la 49 grame; 96 de șobolani albi de laborator (*Rattus albicans*) femele și masculi, cu masa corporală de la 180 până la 310 grame. Animalele au fost preluate de la vivariul USMF „Nicolae Testemițanu” și divizate aleator în loturi în corespundere cu protocolul cercetării. Animalele au fost ținute în condiții standard de vivariu, cu acces liber la hrană și apă. Manipulările dureroase pe animalele de laborator (recoltările de probe, sacrificare) s-au efectuat în mod obligatoriu sub anestezie cu tiopental în scopul diminuării suferințelor inevitabile din cadrul studiului.



**Figura 2.1. Design-ul cercetării**

## **2.2. Screening-ul proprietăților antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului**

Pentru identificarea potențialului antiinflamator a imuheptinului și imupurinului s-a inițiat un studiu screening care a inclus metode *in vitro* de testare și un model de inflamație acută – edemul urechii la șoareci indus de xilen.



### **2.2.1. Studiul *in vitro* a proprietăților antiinflamatorii și antioxidante ale preparatelor de origine entomologică.**

Pentru studiul *in vitro* al proprietăților antiinflamatoare a preparatelor cercetate sunt recomandate un șir de metode: inhibarea denaturării albuminei; determinarea activității antiproteazice; aprecierea acțiunii membranostabilizatoare (hemoliza termică și hemoliza oxidativă); determinarea activității de inhibare a COX și LOX; determinarea nivelului prostaglandinelor, factorului de necroză tumorală; de producere a oxidului nitric; a capacității de captare a radicalilor liberi și de chelare; de inhibare a inflamației induse prin lipopolizaharide etc. [62, 87, 128, 134, 140, 179, 196].

**Acțiunea membranostabilizatoare. Testul de inhibare a hemolizei oxidative (OxHLIA).** Activitatea de stabilizare a membranelor eritrocitelor reprezintă o metodă *in vitro* de cercetare a acțiunii antiinflamatoare, deoarece membrana eritocitară este similară celei lizozomale. Stabilizarea lizozomală este importantă în delimitarea răspunsului inflamator prin prevenirea eliberării din lizozomii neutrofilelor activate a mai multor enzime, care cauzează leziuni ulterioare și întrețin procesul inflamator. Activitatea extracelulară a acestor enzime este în corelație directă cu procesul inflamator acut și cronic. Antiinflamatoarele nesteroidiene acționează fie prin inhibiția acestor enzime, fie prin stabilizarea membranelor lizozomale [87].

La fel, testul de inhibare a hemolizei oxidative (OxHLIA) este utilizat pentru studierea acțiunii antioxidante a substanțelor biologic active. Metoda se bazează pe inhibarea deteriorării membranei induse de radicalii liberi în eritrocite de către antioxidanți. Avantajul acestei metode este că folosește radicalii peroxil ca pro-oxidanți și eritrocitele ca ținte oxidabile, astfel încât rezultatele obținute să reflecte activitatea de captare a radicalilor relevante din punct de vedere biologic și microlocalizarea antioxidanților [153]. Metoda OxHLIA originală a fost realizată pentru spectrofotometru cu cuve, unde gradul de hemoliză era determinat de absorbanta supernatantului după centrifugare. Însă, acest lucru face dificilă evaluarea unui număr mare de mostre în același timp. Conform metodei propuse de Takebayashi, 2012 gradul de hemoliză poate fi determinat de turbiditatea suspensiei de eritrocite fără centrifugare, cu dezvoltarea ulterioară a metodei OxHLIA într-un format de placă cu 96 de godeuri prin adaptarea metodei turbidității. Această metodă în format de placă permite evaluarea unui număr mare de probe, utilizând cantități mici de reagenți, în același timp, cu precizie și reproductibilitate satisfăcătoare [153].

Din sângele prelevat de la șobolani, s-a pregătit suspensie de eritrocite de 3%. În microplăcile fotometrice cu 96 de godeuri s-a pipetat consecutiv 20 μl substanțe biologic active cercetate (imupurin, imuheptin) sau substanțe de referință (vitamina C și trolox în calitate de

antioxidanți de referință, diclofenac – antiinflamator nesteroidian); 50 μl suspensie de eritrocite 3%; 80 μl PBS (tampon fosfat salin). Probele de control s-au montat cu 50 μl suspensie de eritrocite 3% și 100 μl PBS (tampon fosfat salin). Hemoliza completă a fost obținută prin adăugarea de apă distilată 100 μl la suspensia eritrocitară (50 μl).

Microplăcile au fost preincubate la 37°C timp de 3 minute într-un incubator-termostat cu agitare (850-900 tur/min). S-a adăugat în fiecare godeu cu ajutorul dispenserului câte 50 μl sol. AAPH (2,2'-azobis-(amidinopropan) diclorhidrat) în PBS pentru a iniția reacția. AAPH este un produs hidrosolubil ce generează radicali liberi. Zou, C. G. et al a investigat consecințele insultei oxidative asupra eritrocitelor umane indusă de AAPH și a determinat câteva mecanisme posibile de deteriorare a membranei eritrocitare. În procesul de oxidare inițiat de radicalul peroxil, în primele 60 de minute a avut loc o pierdere rapidă a glutatationului redus. Formarea de substanțe reactive la acid tiobarbituric care indică peroxidarea lipidelor a crescut ulterior și aproape a atins niveluri maxime la 180 de minute înainte de a fi detectată degradarea aparentă semnificativă a proteinelor membranare. În acest moment, a avut loc o hemoliză semnificativă. Această secvență de evenimente este în concordanță cu ideea că hemoliza este o consecință a peroxidării lipidelor și a degradării proteinelor membranei [181].

Placa a fost sigilată rapid cu folie de etanșare și incubată la 37°C în incubator-termostat cu agitare la 1200 rpm. Densitatea optică la 660 nm a fost măsurată la fiecare 15 minute, timpul total de monitorizare fiind 180 minute.

Procentul de eritrocite care au rămas intacte a fost calculat după formula [153]:

$$P(\%) = [(Abs_t - Abs_{max}) / (Abs_0 - Abs_{max})] * 100,$$

unde:  $Abs_0$  – absorbanta inițială a probei (la inițierea reacției);

$Abs_{max}$  – absorbanta maximală la hemoliza totală;

$Abs_t$  – absorbanta la momentul de timp cercetat

Procentul de eritrocite care au rămas intacte a fost calculat pentru fiecare probă în parte, la fiecare moment de timp cercetat (la fiecare 15 minute, total 180 minute). Rezultatele sunt prezentate ca Medie, DS, Mediană, IIQ (25 și 75), n = 6.

Pentru a evalua ponderea diferitor componente ale preparatelor entomologice în realizarea efectelor farmacologice s-au pregătit două tipuri de extracte (hidro-alcoolic și hidric). Pentru pregătirea extractului hidro-alcoolic la 1g de produs entomologic s-a adăugat 10 ml de alcool etilic cu concentrația 50%, iar pentru pregătirea extractului hidric s-a adăugat 10 ml de apă rece distilată la 1g de produs entomologic. Homogenatele sus-numite au fost ținute la frigider timp de 24 h, apoi s-au centrifugat la 3000 rpm timp de 10 minute. Supernatantul obținut, inițial filtrat, a fost utilizat pentru cercetările ulterioare *in vitro* și *ex vivo* pe macrofagi. Pentru determinarea

corelației dintre concentrația extractului și intensitatea efectului farmacologic s-au cercetat diferite diluții ale extractelor sus-numite.

În testul OxHLIA au fost evaluate următoarele extracte și concentrații:

1. Extract hidro-alcoolic imuheptin (333,3 μg/ml, 111,1 μg/ml, 37 μg/ml, 12,3 μg/ml);
2. Extract hidric imuheptin (333,3 μg/ml, 111,1 μg/ml, 37 μg/ml, 12,3 μg/ml);
3. Extract hidro-alcoolic imupurin (333,3 μg/ml, 111,1 μg/ml, 37 μg/ml, 12,3 μg/ml);
4. Extract hidric imupurin (333,3 μg/ml, 111,1 μg/ml, 37 μg/ml, 12,3 μg/ml);

Substanțele de referință și concentrațiile evaluate:

Vitamina C (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml, 1,23 μg/ml);

Trolox (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml, 1,23 μg/ml);

Diclofenac (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml, 1,23 μg/ml).

**Determinarea activității PON1/arilesterazei.** Paraoxonaza 1 (PON1) este o enzimă hidrolitică cu o gamă largă de substraturi și capacitatea de a proteja împotriva oxidării lipidelor. În ciuda numărului mare de compuși care pot fi hidrolizați de paraoxonază, substraturile relevante din punct de vedere biologic nu sunt încă determinate clar. Există date obținute din teste *in vitro* și *in vivo* ce demonstrează efectele benefice ale PON1 în procesele aterosclerotice. Enzima este exprimată în primul rând în ficat; dar e localizată și în alte tesuturi. PON1 a atras un interes semnificativ ca proteină responsabilă pentru proprietățile antioxidante ale lipoproteinei de înaltă densitate (HDL). Se știe că mai multe molecule bioactive, cum ar fi polifenolii dietetici, acidul acetilsalicilic și produsul său de hidroliză salicilat, stimulează activarea transcripției PON1 în ficatul de șoarece și linia celulară HepG2 [Litvinov, D., 2012]. S-a demonstrat că PON1 manifestă efecte benefice în numeroase maladii ca, cum ar fi ateroscleroza, BCV, diabetul zaharat și bolile neurodegenerative prin modularea căilor de semnalizare relevante, implicate în inflamație și stresul oxidativ. Aceste căi includ receptorul gamma activat de proliferatorul peroxizomului (PPAR-γ) și căile de semnalizare dependente de protein kinaza B/factor nuclear kappa-amplificator al lanțurilor ușoare a celulelor B activate (AKT/NF-kB). Creșterea PON1 ar putea avea efecte de protecție și ar putea reduce incidența diferitelor boli prin modularea acestor căi de semnalizare [9].

Activitatea PON1/arilesterazei a fost determinată după metodologia propusă de Șveț I., Pantea V, 2019 “Metodă de apreciere a activității ateroprotective a substanțelor biologic active” [149].

Substanțele biologic active în diferite concentrații se amestecă cu o soluție ce conține 20,8...41,6 UI/l de PON1/arilesterază în 0,05 M soluție tampon fosfat, apoi se incubează la temperatura de 37°C, timp de 10 min, după care se adaugă un mediu de reacție ce conține p-

nitrofenil acetat (concentrația finală 1,37...2,28 mM/l), CaCl<sub>2</sub> (concentrația finală 0,91...1,82 mM/l) și cloramină T (concentrația finală 9,1...18,3 μM/l) în 0,05 M soluție tampon fosfat cu pH-ul 7,4. Proba de control se pregătește identic ca proba de cercetat, dar substanța de testat se înlocuiește cu o cantitate echivalentă de soluție de 0,05 M tampon fosfat cu pH-ul 7,4, iar proba blank se pregătește identic ca proba de control, dar mediul de reacție nu conține enzima PON1/arilesterază. În calitate de substanță de referință s-au folosit vitamina C, trolox în calitate de antioxidanți de referință și diclofenac – antiinflamator nesteroidian de referință. Se determină absorbanta inițială A<sub>1</sub> la 405 nm după care probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min și se măsoară repetat absorbanta A<sub>2</sub> la 405 nm, apoi se calculează procentul de activare a PON1/arilesterazei substanțelor cercetate. Cu cât este mai mare procentul de activare a concentrației corespunzătoare a substanțelor cercetate, cu atât activitatea ateroprotectivă este mai mare .

Procentul de activare (%) PON1/arilesterazei =  $100 - [1 - (A_{ex} - A_b) / (A_k - A_b)] * 100$ , unde

A<sub>ex</sub> – absorbanta probei de cercetat;

A<sub>k</sub> – absorbanta probei control

A<sub>b</sub> – absorbanta probei blank

Procentul de activare a PON1/arilesterazei a fost calculat pentru fiecare probă în parte.

Rezultatele sunt prezentate ca Medie, DS, Mediană, IIQ (25 și 75), n = 4.

Au fost evaluate următoarele extracte și concentrații:

1. Extract hidro-alcoolic imuheptin (1000 μg/ml, 500 μg/ml, 250 μg/ml, 125 μg/ml, 62,5 μg/ml, 31,25 μg/ml, 15,62 μg/ml);
2. Extract hidric imuheptin (1000 μg/ml, 500 μg/ml, 250 μg/ml, 125 μg/ml, 62,5 μg/ml, 31,25 μg/ml, 15,62 μg/ml);
3. Extract hidro-alcoolic imupurin (1000 μg/ml, 500 μg/ml, 250 μg/ml, 125 μg/ml, 62,5 μg/ml, 31,25 μg/ml, 15,62 μg/ml);
4. Extract hidric imupurin (1000 μg/ml, 500 μg/ml, 250 μg/ml, 125 μg/ml, 62,5 μg/ml, 31,25 μg/ml, 15,62 μg/ml);

Substanțele de referință și concentrațiile evaluate:

Vitamina C (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml);

Trolox (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml);

Diclofenac (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml).

**Determinarea activității antioxidante totale (AAT) prin metoda ABTS.** Metoda respectivă de screening a activității antioxidante este aplicabilă atât antioxidanților lipofili, cât și hidrofilii, monocationul radical preformat al acidului 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-

sulfonic) (ABTS\*+) este generat prin oxidarea ABTS cu persulfat de potasiu și este redus în prezența antioxidantilor donatori de hidrogen. Se vor lua în considerație influențele concentrației de antioxidant, cât și ale duratei de reacție la determinarea activității antioxidante [132]. Activitatea antioxidantă totală (AAT) a fost determinată după metoda descrise de Re R. și coaut., modificată de Gudumac V. și coaut. Principiul metodei constă în degradarea radicalului 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-acid sulfonic (ABTS) la interacțiunea cu substanțele antioxidante [73, 132]. Soluția de lucru s-a obținut din soluția stoc (obținută la dizolvarea ABTS în apă distilată, cu adăugarea ulterioară a persulfatului de potasiu 2,45 mM în raport de 1:1, amestecul fiind plasat la întuneric, la temperatura camerei timp de 16 ore pentru formarea radicalului ABTS) prin dizolvarea în etanol până la echilibrarea valorii absorbantei la  $0,700 \pm 0,020$  unități la lungimea de undă de 734 nm. Reacția de reducere a decurs la temperatura camerei timp de 30 min. Procentul de inhibiție a radicalului ABTS s-a calculat după formula:

$$\% \text{ inhibiție} = (\text{Abs control}_{0 \text{ min}} - \text{Abs test}_{30 \text{ min}}) / \text{Abs control}_{0 \text{ min}} * 100,$$

unde:

Abs control<sub>0 min</sub> – absorbanta probelor control până la incubare

Abs test<sub>30 min</sub> – absorbanta probei testate după incubare (la 30 minute)

Analizele au fost efectuate în 6 repetări. Rezultatele sunt prezentate ca Medie, DS, Mediană, IIQ (25 și 75), n = 6.

În testul ABTS au fost evaluate următoarele extracte și concentrații:

1. Extract hidro-alcoolic imuheptin (333,3 μg/ml, 111,1 μg/ml, 37 μg/ml, 12,3 μg/ml);
2. Extract hidric imuheptin (333,3 μg/ml, 111,1 μg/ml, 37 μg/ml, 12,3 μg/ml);
3. Extract hidro-alcoolic imupurin (333,3 μg/ml, 111,1 μg/ml, 37 μg/ml, 12,3 μg/ml);
4. Extract hidric imupurin (333,3 μg/ml, 111,1 μg/ml, 37 μg/ml, 12,3 μg/ml);

Substanțele de referință și concentrațiile evaluate:

Vitamina C (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml, 1,23 μg/ml);

Trolox (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml, 1,23 μg/ml);

Diclofenac (33,3 μg/ml, 11,1 μg/ml, 3,7 μg/ml, 1,23 μg/ml).

### **2.2.2. Modelarea inflamației acute exudative**

**Edemul urechii indus de xilen** este un model de inflamație acută indusă prin aplicarea de xilen pe suprafața anterioară a urechii drepte. Expunerea la xilen crește expresia COX-2 și activitatea mieloperoxidazei, crește nivelurile de NF-κB p65, TNF-α, IL-1β și MDA. În plus, xilenul induce stresul oxidativ, relevat prin scăderea nivelurilor de GSH în țesutul urechii și capacității antioxidante totale a plasmiei [142].

29 șoricei albi, femele și masculi, cu masa corporală de la 25 până la 49 grame au fost repartizați în 3 loturi:

Lotul 1 (n=10) – lotul control, s-a administrat soluție fiziologică 1 ml/100 g, i/peritoneal, 5 zile;

Lotul 2 (n=9) - imupurin (500 mg/kg, intern timp de 5 zile);

Lotul 3 (n=10) - imuheptin (500 mg/kg, intern timp de 5 zile).

Preparatele entomologice au fost administrate pe cale orală șoarecilor o dată în zi timp de 5 zile consecutive. În a 5-a zi la 1 oră de la ultima administrare, s-a modelat inflamația acută prin administrarea a 20 μl xilen pe suprafața anterioară a urechii drepte. Urechea stângă a fost folosită ca control. Toate animalele au fost sacrificate la 3 ore după aplicarea agentului flogogen, urechea dreaptă și stângă fiind secționată de-a lungul auriculului.

Expresivitatea reacției inflamatoare a fost evaluată comparând diferența între greutatea piesei auriculare cu diametru de 8 mm secționată din urechea dreaptă și respectiv urechea stângă ce a servit în calitate de control, peste 3 ore de la aplicarea agentului flogogen. Procentul de inhibiție a fost calculat după formula [78]:

% de inhibiție =  $(Dc - Dt)/Dc * 100$ , unde

Dc - diferența greutății discurilor în lotul control,

Dt - diferența greutății discurilor în lotul testat

### **2.3. Studiul acțiunii antiinflamatoare a preparatelor de origine entomologică în inflamația indusă prin lipopolizaharide**

Cavitatea peritoneală oferă un loc ușor accesibil pentru recoltarea unui număr moderat de macrofage rezidente. În general, macrofagele izolate din cavitatea peritoneală a șoarecelui/șobolanului vor fi macrofage mature în repaus. Cu toate acestea, randamentul este de obicei de numai  $\sim 0,5-1 \times 10^6$  macrofage per șoarece. Randamentul de macrofage poate fi crescut prin injectarea de bulion de tioglicolat intraperitoneal cu câteva zile înainte de recoltarea celulelor, acesta recrutează numeroase macrofage, dar nu le activează [171].

Macrofagele reprezintă o populație larg distribuită și diversă din punct de vedere funcțional, fiind implicate în răspunsul inflamator la diferiți agenți patogeni, în homeostazia țesuturilor și repararea acestora. Macrofagele pot fi grupate în două subpopulații cu activități opuse: macrofage M1 sau pro-inflamatorii, care promovează celulelor T-helper de tip 1 (Th1) cu deteriorarea țesuturilor și M2 sau macrofagele activate alternativ cu funcții antiinflamatorii, ce influențează limfocitele Th2 și rezoluția inflamației [27].

În studiu au fost folosiți 6 șobolani cu masa de 160-250 g, achiziționați de la Vivariul Universității de Stat de Medicina și Farmacie Nicolae Testemițanu. Animalelor li s-a permis

accesul standard la hrană și apă. Șobolani au fost adăpostiți la temperatura camerei în condițiile ciclului natural de 24 de ore lumină-întuneric.

Macrofagele peritoneale au fost recoltate folosind protocolul descris de Zhang, X. et al. 2008 cu unele modificări [116]. Macrofagele au fost recoltate de la șobolani la care s-a administrat intraperitoneal 10 ml de tioglicolat steril 3% cu 72 de ore înainte de colectare. După 72 de ore, șobolani injectați cu tioglicolat au fost anesteziați cu tiopental sodiu 50 mg/kg. Exudatul peritoneal a fost izolat aseptice prin lavaj peritoneal cu mediu de cultură rece Eagle modificat după Dulbecco (DMEM), care conținea suplimentar 10% ser fetal bovin, 8 mcg/ml gentamicină și 2,5 mcg/ml fluconazol. Exudatul peritoneal s-a centrifugat la 450-500 rot./min, timp de 7 min. După centrifugare, celulele au fost resuspendate și numărate, concentrația lor fiind adusă la  $10 \times 10^5$  macrofage/ml suspensie, apoi cultura celulară de macrofage s-a transferat pe o placă cu 24 godeuri cu concentrația finală de  $(5,0-10,0) \times 10^4$  macrofage/per godeu și s-a incubat în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 2-4 ore, după care celulele non-aderente s-au înlăturat prin spălări repetate cu soluție de tampon fosfat salin cu pH-ul 7,2-7,4, ulterior în fiecare godeu al probelor de cercetat s-a adăugat câte 900 μl de mediu pentru culturi celulare ce conținea suplimentar 10% ser fetal bovin, 8 μg/ml gentamicină, 2,5 μg/ml fluconazol, 10-15 μg/ml lipopolizaharidă (probele LPS) și diluțiile compușilor cercetați. Probele de control și de referință s-au montat la fel, având în loc de compușii testați o cantitate echivalentă de un diluant sau respectiv, compus de referință. Plăcile s-au agitat și s-au incubat în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C. După 24 ore, mediul condiționat de macrofage s-a recoltat cu evaluarea ulterioară a indicilor biochimici și profilului de citokine din mediu [116, 171]. Valorile indicilor biochimici și citokinelor obținute la evaluarea probele cu LPS au fost comparate cu probele nestimulate (fără LPS). Experimentele au fost efectuate în triplicate, iar rezultatele sunt prezentate ca Medie, DS, Mediană, AIQ, n = 3.

Pentru a evalua ponderea diferitor componente ale preparatelor entomologice în realizarea efectelor farmacologice s-au pregătit două tipuri de extracte (hidro-alcoolic și hidric). Pentru pregătirea extractului hidro-alcoolic la 1g de produs entomologic s-a adăugat 10 ml de alcool etilic cu concentrația 50%, iar pentru pregătirea extractului hidric s-a adăugat 10 ml de apă rece distilată la 1g de produs entomologic. Homogenatele sus-numite au fost ținute la frigider timp de 24 h, apoi s-au centrifugat la 3000 rpm timp de 10 minute. Supernatantul obținut, inițial filtrat, a fost utilizat pentru cercetările ulterioare *ex vivo* pe macrofagi. Pentru determinarea corelației dintre concentrația extractului și intensitatea efectului farmacologic s-au cercetat diferite diluții ale extractelor sus-numite.

Macrofașii au fost incubatți cu următoarele diluții ale substanțelor cercetate:

1. Extract hidro-alcoolic imuheptin (diluțiile 1:10; 1:100; 1:200);
2. Extract hidric imuheptin (diluțiile 1:10; 1:100; 1:200);
3. Extract hidro-alcoolic imupurin (diluțiile 1:10; 1:100; 1:200);
4. Extract hidric imupurin (diluțiile 1:10; 1:100; 1:200);

Substanțele de referință și concentrații:

Dexametazonă (10 mcg/ml , 1 mcg/ml);

Diclofenac (500 mcg/ml; 250 mcg/ml);

#### **2.4. Determinarea acțiunii antiinflamatoare a imuheptinului și imupurinului în inflamația subacută**

**Modelarea inflamației cronice proliferative și imune (granulomul de fetru).** Pentru evaluarea influenței preparatelor entomologice asupra fazei proliferative a inflamației (formarea granulomului) a fost modelată inflamația cronică proliferativă și imună. Metoda a fost descrisă mai întâi de Meier și colab. (1950), care au modelat granuloamele cu corp străin la șobolani prin implantarea subcutanată de pelete de bumbac comprimat. După câteva zile, pe lângă infiltrarea fluidului, pot fi observate celule gigantice histologic și țesut conjunctiv nediferențiat. Cantitatea de țesut conjunctiv nou format poate fi măsurată prin cântărirea granuloamelor uscate după îndepărtare. [159, 196].

Inflamația cronică proliferativă a fost indusă prin implantarea discurilor de fetru (pâslă) sterilizate cu o greutate de aproximativ 26 mg sub pielea regiunii dorsale de pe corpul animalelor. Intervenția a fost efectuată sub anestezie usoară cu tiopental de sodiu (50 mg/kg intraperitoneal) în condiții aseptice. În a 8-a zi după intervenție, discurile de fetru cu țesutul de granulație format în jurul lor sunt îndepărtate, cântărite și uscate până la o greutate constantă la 60 °C. Răspunsul proliferativ este evaluat prin diferența dintre greutatea granulomului uscat și greutatea inițială a discului de fetru. Reacția exudativă se apreciază prin diferența dintre masa granulomului umed (extras inițial) și uscat. Substanțele testate se administrează zilnic timp de 7 zile. Acțiunea antiinflamatoare (efectul asupra componentelor proliferative și exudative ale inflamației cronice) este exprimată în procente față de control [196].

Pentru aprecierea procesului inflamator a fost evaluat gradul de manifestare a reacției exudative (diferența dintre masa granulomului umed și masa granulomului uscat, procentul de inhibiție a fazei exudative) și a celei proliferative (diferența dintre masa granulomului uscat format și masa inițială a discului, procentul de inhibiție a fazei proliferative).

Pentru calcularea procentului de inhibiție a fazelor exudativă și proliferativă s-a utilizat formula:

$$Pi = (1 - Mt/Mm) * 100,$$



unde:  $P_i$  – procentul de inhibiție;

$M_t$  – masa discului de fetru în lotul tratat;

$M_m$  – masa discului de fetru în lotul-martor [159, 196].

Au fost realizate 2 serii experimentale cu unele modificări:

- modelarea inflamației subacute (granulomul de fetru) - prin implantarea subcutanată a două discuri de fetru;
- modelarea inflamației subacute (granulomul de fetru) - prin implantarea subcutanată a unui disc de fetru impregnat cu adjuvant Freund, iar al 2-lea disc fiind aplicat ca atare.

#### **2.4.1. Modelarea inflamației subacute prin implantarea subcutanată a două discuri de fetru**

1. Lotul 1 (n=8) – intact, s-a administrat doar soluție fiziologică 1 ml/100 g, i/peritoneal și vehicolul utilizat pentru administrarea internă a substanțelor testate (aluat pentru biscuiți [44].)
2. Lotul 2 (n=6) - control negativ, s-a administrat soluție fiziologică 1 ml/100 g, i/peritoneal și vehicolul utilizat pentru administrarea internă a substanțelor testate (aluat pentru biscuiți).
3. Lotul 3 (n=9) - control-positiv, s-a administrat antiinflamatorul steroidian dexametazonă 2,5 mg/kg corp intraperitoneal [54] și vehicolul utilizat pentru administrarea internă a substanțelor testate (aluat pentru biscuiți).
4. Lotul 4 (n=7) - test imuheptin, s-a administrat imuheptin 500 mg/kg incorporat în aluat pentru biscuiți.
5. Lotul 5 (n=9) – test imupurin, s-a administrat imupurin 500 mg/kg incorporat în aluat pentru biscuiți.

La animalele din loturile 2-5 s-a modelat inflamația cronică prin implantarea subcutanată a două discuri de fetru cu greutatea  $26 \pm 1$  mg sub pielea regiunii dorsale de pe corpul animalelor pe partea dreaptă și stângă (I-a zi). Intervenția a fost efectuată în condiții aseptice, sub anestezie generală cu tiopental de sodiu (50 mg/kg intraperitoneal). Substanțele de origine entomologică (imuheptin, imupurin) se administrau intern zilnic timp de șapte zile, în doze de 500 mg/kg, și dexametazona (preparatul de referință) – în doză de 2,5 mg/kg intraperitoneal. Șobolanilor din lotul-martor li s-a injectat intraperitoneal soluție fiziologică. La a 8-a zi, sub anestezie generală, au fost extrase discurile împreună cu țesutul de granulare format, fiind cântărite în stare umedă, apoi au fost uscate la temperatura  $60^{\circ}\text{C}$  până la o masă constantă.

#### **2.4.2. Modelarea inflamației cronice proliferative și imune (granulomul de fetru) cu impregnarea suplimentară a discului stâng cu adjuvant Freund.**

S-a observat formarea mai intensă de țesut granulos dacă peletele de bumbac au fost impregnate cu carrageenan [159]. Carrageenan-ul injectat subcutanat la șobolani induce o tumefiere acută care devine maximă la 3-5 ore după injectare și dispare în 24 de ore, pe când injectarea subcutanată adjuvantul Freund induce o tumefiere prelungită care devine maximă la 24 de ore și persistă cel puțin 7 zile [58]. Administrarea adjuvantul Freund provoacă o serie de reacții inflamatorii care debutează la 2 ore după administrare, manifestate prin eritem și edem, atinge vârfuri în 6 - 8 ore, durata manifestărilor acute este de 3-4 zile; pe măsură ce macrofagele eliberează citokine proinflamatorii (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), procesul inflamator se amplifică cu stimularea migrării celulare, producerea proteinelor de fază acută, enzime proteolitice și angiogenează [108].

În studiu au fost folosiți 49 de șobolani cu masa de 160-250 g care au fost repartizați în următoarele loturi:

1. Lotul 1 (n=11) – intact, s-a administrat doar soluție fiziologică 1 ml/100 g, i/peritoneal și vehicolul utilizat pentru administrarea internă a substanțelor testate (aluat pentru biscuiți).
2. Lotul 2 (n=9) - control negativ, s-a administrat soluție fiziologică 1 ml/100 g, i/peritoneal și vehicolul utilizat pentru administrarea internă a substanțelor testate (aluat pentru biscuiți).
3. Lotul 3 (n=9) - control-positiv, s-a administrat antiinflamatorul steroidian dexametazonă 2,5 mg/kg corp intraperitoneal [54] și vehicolul utilizat pentru administrarea internă a substanțelor testate (aluat pentru biscuiți).
4. Lotul 4 (n=10) - test imuheptin, s-a administrat imuheptin 500 mg/kg incorporat în aluat pentru biscuiți.
5. Lotul 5 (n=10) – test imupurin, s-a administrat imupurin 500 mg/kg incorporat în aluat pentru biscuiți.

La animalele din loturile 2-5 s-a modelat inflamația cronică prin implantarea subcutanată a două discuri de fetru cu greutatea  $26 \pm 1$  mg. Discul stâng a fost implantat ca atare, iar cel drept a fost infiltrat cu adjuvant Freund. Intervenția a fost efectuată în condiții aseptice, sub anestezie generală cu tiopental de sodiu (50 mg/kg intraperitoneal). Substanțele de origine entomologică (imuheptin, imupurin) se administrau intern zilnic timp de șapte zile, în doze de 500 mg/kg, și dexametazona (preparatul de referință) – în doză de 2,5 mg/kg intraperitoneal. Șobolanilor din lotul-martor li s-a injectat intraperitoneal soluție fiziologică. La a 8-a zi, sub anestezie generală,

au fost extrase discurile împreună cu țesutul de granulare format, fiind cântărite în stare umedă, apoi au fost uscate la 60°C până la o masă constantă.

### **Pregătirea materialului biologic și investigații hematologice, biochimice (sânge, ser)**

*Sângele periferic* pentru evaluarea indicilor hematologici a fost prelevat și colectat în eprubete ce conțineau anticoagulant. Indicii sanguini au fost determinați la analizatorul hematologic automat XT-2000i-5, producător SISMEM. S-a determinat numărul eritrocitelor, leucocitelor, trombocitelor, conținutul hemoglobinei, hematocritului și procentului neutrofilelor, limfocitelor, monocitelor, bazofilelor, eozinofilelor și granulocitelor imature.

*Serul sanguin* a fost obținut prin centrifugarea sângelui periferic prelevat fără adaos de anticoagulant la 3000 tur/min timp de 10 min. Serul colectat a fost transferat în eprubete Eppendorf și păstrat la temperatura de - 40°C până la momentul determinării indicilor imunologici și biochimici.

### **2.5. Metode de cercetare a indicilor imunologici și biochimici**

Aplicarea metodelor biochimice și imunoenzimatică a permis evaluarea în ser/supernatant a unor molecule de semnalizare celulară (*IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6, IL-10*); indicilor stresului oxidativ (*DAM, PPOA, AGEs, MROt*; statului antioxidant (*AAT prin metoda ABTS, Cuprac, SOD catalaza, ceruloplasmina, balanța pro-antioxidantă*); aprecierea sistemului tiol-disulfidic (*GR, GPO, GST, tiolilor serici total și nativ*).

*Citokinele pro- și antiinflamatoare* (*IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 și IL-10*) au fost determinate, utilizând kiturile ELISA sandwich, produse de firma Vector Best (Rusia) - respectând instrucțiunile producătorului (pentru serul prelevat în a 2-a replică experimentală - *Modelarea inflamației subacute cu adjuvant Freund*). Pentru determinarea *TNF  $\alpha$ , IL-6 și IL-10* în serul prelevat de la șobolanii din prima replică experimentală și în supernatantul prelevat din cultura de macrofagi s-au utilizat kiturile Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc, USA. La baza metodei stă utilizarea anticorpilor de captare (anti*TNF- $\alpha$* , anti*IL-6*, anti*IL-10*, anti- *IL-1 $\beta$* ) purificați, adsorbiți pe suprafața microplăcilor capabili să fixeze specific antigenul (*TNF- $\alpha$ , IL-6*) prezent în ser sau supernatant. După fixarea anticorpilor de detecție s-a adăugat substratul cromogenic. Intensitatea colorației obținute a fost direct proporțională cu concentrația citokinelor determinate, densitatea optică s-a determinat spectrofotometric la 450 nm utilizând spectrofotometrul PowerWave HT (BioTek, SUA). Rezultatele s-au calculat după *curba de calibrare* și au fost exprimate în *pg/mL* (ser/supernatant).

*Determinarea activității glutathion reductazei (GR)* în ser s-a efectuat conform metodei descrise de Vlasova S. și coaut. (Vlasova S., 1990) modificată de Gudumac V. și coaut. [73, 186], bazată pe determinarea vitezei de creștere a nivelului de glutathion redus (GSH) format în

urma reacției enzimaticе, folosindu-se 5,5'-ditiobis-2- nitrobenzoatul care reacționează cu GSH. Produsul reacției (2-nitro-5-benzoatul) s-a determinat fotometric la 405 nm. Cantitatea de glutatіon redus (GSH) s-a exprimat în  $\mu\text{mol/s/L}$  ser/supernatant. [71, 73]

*Dozarea activității glutatіon peroxidazei (GPO)* în ser s-a efectuat conform procedurii descris de Разыграев А.В. și Арутюнян А.В. modificat de Gudumac V. și coaut. [150], bazat pe determinarea vitezei de descreștere a nivelului de glutatіon redus (GSH) în mediul de reacție pentru ce se folosește 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoatul) care reacționează cu GSH. Produsul reacției (2-nitro-5-tiobenzoatul) se determină fotometric la 405 nm. Activitatea GPO se măsoară în nmol de glutatіon redus pe secundă la un g de proteină sau un litru lichid biologic – nmol GSH/s.g proteină sau  $\mu\text{mol GSH/s.l.}$  ser sanguin [71, 73].

*Determinarea activității glutatіon-S-transferazei (GST)* în ser s-a efectuat conform procedurii descris de Habig W. H. și coaut. modificat de Tagadiuc O. și coaut. [152], bazat pe capacitatea glutatіon-S-transferazei de a cataliza reacția de condensare a glutatіonului redus cu 1-Cl-2,4-dinitroclorbenzol (1-Cl-2,4-DNCB), cu formarea (1-S-glutatіonil-2,4-dinitroclorbenzolul), a cărui conținut este proporțional cu activitatea GST și se determină spectrototometric la 340 nm. Activitatea GST se exprimă în nmol de conjugat format pe s la 1 g proteină. [71, 73]

*Determinarea tiolilor serici totali și nativi* s-a efectuat conform metodei descrise de Ozcan E. și Neselioglu cu modificări [55, 71, 73]. Metoda se bazează pe măsurarea mai întâi a concentrațiilor de tioli nativi după adăugarea formalinei (blocantul legăturilor disulfidice). Pentru dozarea tiolilor totali, legăturile disulfidice au fost reduse cu  $\text{NaBH}_4$  la grupe tiolice libere, iar resturile de reductant liber au fost neutralizate cu formaldehidă. Soluțiile de mercaptoetanol au fost utilizate ca calibratoare. Rezultatul este exprimat în  $\mu\text{M/L}$  ser/supernatant. Valoarea la jumătate a diferenței dintre tiolii totali și tiolii nativi revine cantității de legături disulfidice.

*Determinarea conținutului dialdehidei malonice (DAM)* s-a efectuat în conformitate cu procedeul descris de Galactionova L. și coaut. [187] cu modificări [71, 72, 73], bazat pe determinarea spectrofotometrică a complexului trimetinic format în urma interacțiunii DAM cu acidul tiobarbituric. Conținutul de DAM s-a calculat în baza coeficientului molar de absorbție  $\Sigma=1,56 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-1}$  și s-a exprimat în  $\mu\text{mol/g}$  țesut.

*Determinarea produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA)* s-a efectuat în conformitate cu procedeul descris de Capeillere-Blandin C., și coaut. modificat de Gudumac V.și coaut. [71, 73], bazat pe proprietatea PPOA de a manifesta o absorbantă specifică, care poate fi înregistrată spectrofotometric la 340 nm. Calculul s-a efectuat după curba de calibrare construită în baza

diluțiilor succesive a sol. standard de cloramină-T (0-100  $\mu\text{mol/l}$ ). Conținutul de PPOA s-a exprimat în  $\mu\text{mol}$  echivalente de cloramină-T/g țesut.

*Determinarea produselor finale de glicare avansată (AGE)* s-a apreciat în conformitate cu procedeul descris de Makita Z. et al. modificat de Gudumac V. și coaut., bazat pe măsurarea intensității fluorescenței la excitația 370/emisia 440 nm. Intensitatea fluorescenței a fost exprimată în  $\mu\text{M/L}$  [71].

*Determinarea activității antioxidante totale (AAT) prin metoda cu ABTS* s-a efectuat conform metodei descrise de Re R., et al. [132] cu modificări [71, 73]. Metoda se bazează pe degradarea radicalului 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolină 6 sulfonat) (ABTS) la interacțiunea acestuia cu compușii testați cu proprietăți antioxidante. Degradarea radicalului ABTS este monitorizată prin măsurarea descreșterii absorbantei la 734 nm și se exprimă în  $\mu\text{mol/l}$  ser sanguin sau supernatant.

*Activitatea superoxidismutazei (SOD)* a fost estimată conform metodei descrise de Galactionova, L. et al.[187] cu modificări [71, 73, 151]. Metoda se bazează pe inhibiția reducerii sării de tetrazoliu nitroblue (NBT) în sistemul ce conține fenazinmetosulfat și NADH sub acțiunea SOD. Gradul de inhibiție a acestui proces depinde de activitatea enzimei, care se exprimă în unități convenționale. În calitate de unitate a activității SOD se ia cantitatea de enzimă necesară pentru inhibiția cu 50% a reacției de reducere a NBT. Activitatea enzimei se raportează la 1L ser sanguin.

*Determinarea activității catalazei (CAT)* s-a efectuat conform procedeului descris de Coroliuc M. A. și coaut. cu modificări [71, 73], bazat pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de scindare a  $\text{H}_2\text{O}_2$  cu formarea  $\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{O}_2$ . Peroxidul de hidrogen formează cu molibdatul de amoniu un compus complex de culoare galbenă. În procesul reacției se micșorează cantitatea de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ce determină decolorarea soluției. Gradul de decolorare într-o unitate de timp corelează cu activitatea enzimei și se determină spectrofotometric, activitatea enzimatică a căreia se exprimă în  $\mu\text{M/s.L}$

*Determinarea ceruloplasminei* s-a efectuat după procedeului descris de Colb V.G., modificat de Gudumac V. și coaut. [71], bazat pe reacția de oxidare a unor poliamine, inclusiv a p-fenilendiaminei la un compus colorat în albastru-violet, cantitatea căruia corelează cu cantitatea ceruloplasminei și a cărei densitate optică a fost măsurată la 530 nm. Calculele se efectuează în baza curbei de calibrare și se exprimă în miligrame la un litru de ser (mg/L).

*Determinarea metaboliților reactivi ai oxigenului(MRO)* s-a efectuat conform testului d-ROM [76] cu modificări [71, 73]. Esența procedeului propus constă în aceea că la determinarea MROt, proba de cercetat se incubează într-o soluție tampon ce conține clorură de fier (III), apoi

se adaugă o soluție ce conține N,N-dimethyl-p-phenylene-diamine (DMPD). Radicalii liberi peroxizi, ce se conțin în proba de cercetat, oxidează moleculele de DMPD în radicali DMPD<sup>+</sup> cu formarea unui produs colorat într-un grad proporțional cu concentrațiile lor. Nivelul de MROt se exprimă în mM/L *tert-butyl hydroperoxide*, folosită ca substanță de referință.

*Determinarea balanței pro-oxidante-antioxidante (PAB)* a fost estimată conform metodei descrise de Alamdari DH. Et al., 2007, cu modificări [5, 71]. Esența metodei date constă în aceea, că la determinarea balanței pro-oxidante-antioxidante (BPA), proba de cercetat se incubează într-un mediu de lucru, ce conține o soluție de tetrametybenzidină (TMB) și cation TMB, iar radicalii liberi, peroxizii și antioxidanții, ce se conțin în proba de cercetat influențează asupra colorării mediului de lucru într-un grad proporțional cu concentrațiile lor. PAB se exprimă în unități arbitrare calculate în baza curbei standard și în unități Hamidi-Koliakos (un.HK) bazate pe procentul de peroxid de hidrogen evaluat în soluția standard.

## **2.6. Prelucrarea statistică a datelor**

Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a efectuat utilizând pachetul software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versiunea 25.0. Pentru crearea tabelor cu rezultatele cercetării, cu scopul procesării statistice ulterioare, s-a utilizat programul Microsoft Excel 2013. Datele obținute au fost procesate statistic cu ajutorul funcțiilor și modulelor programei computerizate SPSS și determinați indicatorii de bază ai statisticii descriptive – *media, abaterea standard, mediana și abaterea intercuartilă*. În urma analizei rezultatelor obținute la testele de mai sus, s-a decis ca diferențele între loturi, pentru diferite variabile cercetate, să fie studiate utilizând One-Way Anova (atunci când  $p > 0,05$  după aplicarea testelor de verificare a normalității și abaterii standard) și testul pentru datele non-parametrice Kruscall – Wallis în cazul distribuției neuniforme (în situația când  $p < 0,05$  după utilizarea testului lui Levene) sau numărului redus de probe. Pentru a releva diferența între loturi, s-au aplicat testele *post-hoc* pentru comparații multiple: corecția Bonferroni pentru One-Way Anova și testul Kruscall – Wallis. Pragul de semnificație stabilit a fost pentru intervalul de încredere (ÎÎ) de 95% [146].

## **2.7. Concluzii**

1. Design-ul cercetării este proiectat conform cerințelor metodologiei științifice aplicate în cercetările din domeniul sănătății și este alcătuit din trei tipuri de studii pentru asigurarea realizării cu succes a scopului și a obiectivelor propuse.
2. Cercetările au fost efectuate în mai multe etape, precedate de studierea situației la moment la subiectul tezei de doctorat în literatura științifică internațională, accesând bazele de date cu profil medical: HINARI, ARDI, OARE, cât și Google scholar.

3. Analiza bibliografică a fost urmată de cercetări screening pentru care au fost aplicate metode *in vitro*, *ex vivo* pe macrofagi, inițiind ulterior studiul de bază – modelarea inflamației cronice proliferative. Conform scopului și obiectivelor cercetării formulate, a fost efectuat un studiu preclinic experimental care a inclus 55 șoareci albi pentru testul screening inițial (edemul urechii cu xilen) și 96 sobolani repartizați aleatoriu în 5 loturi: intact; loturile experimentale (modelarea inflamației): control; loturile la care s-a administrat substanțele cercetate IMUPURIN sau IMUHEPTIN; lotul de referință (substanță de referință fiind dexametazonă).
4. Metodele, descrise în acest capitol, au permis determinarea și evaluarea influenței preparatelor entomologice asupra diferitor faze ale inflamației la un nivel științific aprofundat.
5. Rezultatele cercetării au fost supuse analizei statistice cu prezentarea rezultatelor ca medie, DS, mediană, AIQ, și aplicarea testelor statistice One-Way Anova și testului Kruscall –Wallis pentru date non-parametrice.

### 3. SCREENING-ul PROPRIETĂȚILOR ANTIINFLAMATORII ȘI ANTIOXIDANTE ALE PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ

#### 3.1. Cercetarea *in vitro* și *in vivo* a acțiunii antiinflamatoare a imuheptinului și imupurinului.

Pentru etapa de screening s-a recurs la metode de studiu *in vitro*: evaluarea acțiunii membranostabilizatoare în cadrul hemolizei oxidative; studiul activității antioxidante (testul ABTS); determinarea activității paraoxonazei/arilesterazei [62, 87, 128, 134, 140, 179].

În cercetările *in vitro* s-au studiat proprietățile antihemolitice și antioxidante față de deteriorarea oxidativă a proteinelor/lipidelor membranei eritrocitelor indusă prin reagentul 2,2'-azobis(2-amidinopropan) diclorhidrat (AAPH) timp de 3 ore. S-a raportat, că AAPH produce hemoliza prin creșterea excesivă a radicalilor liberi intracelulari (alchil, peroxil), care lezează lipidele și proteinele membranei eritrocitelor. Radicalii peroxil provoacă leziuni oxidative ale lipidelor membranei eritrocitare/acizilor grași polinesaturați cu pierderea integrității membranei, eliberarea hemoglobinei (hemoliză) și a ionilor intracelulari  $K^+$  [170].

Stabilitatea eritrocitelor în soluția tampon fosfat (lotul control) s-a menținut stabil pe parcursul a 60 minute cu o tendință ușoară de diminuare la 90 minute, dar cu creștere a hemolizei hematiilor la 120 minute (tab.3.1.1). Acidul ascorbic a manifestat o capacitate de a preîntâmpina hemoliza eritrocitelor pe parcursul a 90 minute cu o reducere a procentului de hematii nehemolizate, îndeosebi spre 150-180 minute, dar care era mai superioară față de lotul de control. Troloxul a manifestat o capacitate mai superioară de a preîntâmpina hemoliza eritrocitelor față de lotul de control și acidul ascorbic până la 150 minute. Diclofenacul în concentrația 33,3  $\mu\text{g/ml}$  deja la 60 minute a cedat soluției tampon fosfat, acidului ascorbic și troloxului referitor la protecția eritrocitelor de hemoliză, însă în concentrația de 11,1  $\mu\text{g/ml}$  a demonstrat o capacitate de a preveni hemoliza eritrocitelor relativ stabilă pe parcursul a 180 minute. Prin urmare, diclofenacul în concentrația de 11,1  $\mu\text{g/ml}$  a cedat antioxidanților standard, dar a fost superior față de concentrația sa de 33,3  $\mu\text{g/ml}$  și control (tab.3.1.1).

Extractul etanolic al imuheptinului în concentrația 333,3  $\mu\text{g/ml}$  a manifestat capacitatea cea mai mare de preîntâmpinare a hemolizei eritrocitelor pe parcursul a 180 minute. Concentrațiile 111,1  $\mu\text{g/ml}$ , 37  $\mu\text{g/ml}$  și 12,3  $\mu\text{g/ml}$  ale extractului etanolic al imuheptinului au demonstrat un efect marcat de stabilitate a eritrocitelor până la 120 minute, dar cu o diminuare a



**Tabelul 3.1.1 Influența imuheptinului (extract etanolic) asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor**

Loturile experimentale	Procentul de eritrocite nehemolizate (%)					
	X±DS (Mediana; AIQ)					
	15min	60min	90min	120min	150min	180min
1. control (soluție tampon fosfat)	99,1±3,5 (98,2, 2,6)	98,2±3,4 (97,5; 2,5)	91,3±2,3 (91,2; 3,1)	46,8±7,5 (47,2; 13,3)	9,9±2,7 (8,9; 4,6)	5,1±0,7 (5,2; 1,4)
2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	100,8±3,4 (99,8; 6,3) p <sub>2-1</sub> =1,000	101,9±4,3 (100,7; 8,0) P <sub>2-1</sub> =1,000	98,0±1,2 (97,7; 2,2) p <sub>2-1</sub> =0,490	82,2±3,2 (81,7; 5,2) p <sub>2-1</sub> =1,000	37,7±2,5 (36,9; 5,0) P <sub>2-1</sub> =1,000	11,1±0,8 (10,9; 1,01) p <sub>2-1</sub> =1,000
3. trolox 33,3 μg/ml	103,2±4,7 (102,03; 5,9) P <sub>3-1</sub> =0,316	99,9±2,3 (100,4; 4,6) P <sub>3-1</sub> =1,000	99,2±3,4 (100,8; 6,9) P <sub>3-1</sub> =0,049	98,5±4,2 (100,3; 8,4) P <sub>3-1</sub> =0,000	90,0±1,3 (89,7; 2,4) P <sub>3-1</sub> =0,000	48,6±3,0 (46,7; 5,8) P <sub>3-1</sub> =0,001
4. Diclofenac 33,3 μg/ml	100,4±3,1 (100,7; 4,7) P <sub>4-1</sub> =1,000	61,9±2,1 (61,8; 2,7) P <sub>4-1</sub> =0,275	11,9±1,3 (11,6; 2,6) P <sub>4-1</sub> =1,000	7,7±2,3 (7,4; 4,7) P <sub>4-1</sub> =1,000	7,0±0,7 (6,8; 1,3) P <sub>4-1</sub> =1,000	9,5±0,8 (9,6; 1,2) P <sub>4-1</sub> =1,000
5. Diclofenac 11,1 μg/ml	96,2±4,8 (98,9; 9,5) P <sub>5-1</sub> =1,000	93,3±2,4 (94,7; 4,8) P <sub>5-1</sub> =1,000	88,4±3,2 (88,3; 6,7) P <sub>5-1</sub> =1,000	77,1±2,8 (75,7; 5,6) P <sub>5-1</sub> =1,000	65,6±1,6 (64,8; 3,1) P <sub>5-1</sub> =0,146	57,7±7,0 (59,94; 14,9) P <sub>5-1</sub> =0,000
6. Extract etanolic imuheptin 333,3 μg/ml	99,7±0,2 (99,8; 0,5) P <sub>6-1,2,3,4,5</sub> =1,000	97,6±2,3 (97,9; 3,9) P <sub>6-1,2,3,5</sub> =1,000 p <sub>6-4</sub> =0,271	96,0±3,3 (95,8; 6,5) p <sub>6-1,2,3</sub> =1,000 p <sub>6-4</sub> =0,055 p <sub>6-5</sub> =0,826	94,9±4,0 (95,3; 7,9) p <sub>6-1</sub> =0,005 p <sub>6-2,3</sub> =1,000 p <sub>6-4</sub> =0,001 p <sub>6-5</sub> =0,370	92,0±4,5 (92,5; 8,8) p <sub>6-1,4</sub> =0,000 p <sub>6-2</sub> =0,003 p <sub>6-3,5</sub> =1,000	85,9±5,6 (86,9; 9,9) p <sub>6-1</sub> =0,000 p <sub>6-2</sub> =0,013 p <sub>6-4</sub> =0,001 p <sub>6-3,5</sub> =1,000
7. Extract etanolic imuheptin 111,1 μg/ml	100,3±0,7 (100,1; 0,7) p <sub>7-1</sub> =0,737 p <sub>7-2,3,4</sub> =1,000 p <sub>7-5</sub> =0,176	99,5±1,6 (99,7; 1,6) p <sub>7-1,2,3</sub> =1,000 p <sub>7-4</sub> =0,004 p <sub>7-5</sub> =0,1	98,5±2,8 (98,9; 2,8) p <sub>7-1,2,3</sub> =1,000 p <sub>7-4</sub> =0,001 p <sub>7-5</sub> =0,042	95,1±2,6 (94,9; 4,6) p <sub>7-1</sub> =0,003 p <sub>7-2,3</sub> =1,000 p <sub>7-4</sub> =0,000 p <sub>7-5</sub> =0,286	72,4±6,3 (71,0; 9,6) p <sub>7-1</sub> =0,017 p <sub>7-2</sub> =0,807 p <sub>7-3,5</sub> =1,000 p <sub>7-4</sub> =0,003	28,7±6,6 (26,3; 12,8) p <sub>7-1</sub> =0,017 p <sub>7-2,3,5</sub> =1,000 p <sub>7-4</sub> =0,770
8. Extract etanolic imuheptin 37 μg/ml	99,9±0,5 (99,8; 0,5) P <sub>8-1,2,3,5</sub> =1,000	96,8±2,9 (97,9; 6,0) P <sub>8-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,735	95,6±3,3 (96,8; 6,6) P <sub>8-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,196	90,8±3,6 (90,3; 4,6) P <sub>8-1</sub> =0,128 P <sub>8-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,019	56,5±6,9 (57,6; 4,6) P <sub>8-1</sub> =0,972 P <sub>8-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,225	18,3±3,9 (19,6; 5,8) P <sub>8-1</sub> =0,219 P <sub>8-2,3,4,5</sub> =1,000
9. Extract etanolic imuheptin 12,3 μg/ml	100,5±1,2 (100,0; 0,9) P <sub>9-1</sub> =0,585 P <sub>9-2,3,4</sub> =1,000 P <sub>9-5</sub> =0,137	99,7±1,3 (99,2; 1,5) P <sub>9-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,002 P <sub>9-5</sub> =0,089	98,3±1,5 (98,2; 2,3) P <sub>9-4</sub> =0,240 P <sub>9-2,3</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,003 P <sub>9-5</sub> =0,092	83,0±10,2 (87,6; 16,8) P <sub>9-1,2,5</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,770 P <sub>9-4</sub> =0,317	39,9±11,0 (43,8; 16,9) P <sub>9-1,2,4,5</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,100	11,1±3,3 (11,6; 4,8) P <sub>9-1,2,4</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,637 P <sub>9-3</sub> =0,149

p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

**Tabelul 3.1.2 Influența imuheptinului (extract hidric) asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor**

Loturile experimentale	Procentul de eritrocite nehemolizate (%)					
	X±DS (Mediana; AIQ)					
	15min	60min	90min	120min	150min	180min
1. control (soluție tampon fosfat)	99,1±3,5 (98,2, 2,6)	98,2±3,4 (97,5; 2,5)	91,3±2,3 (91,2; 3,1)	46,8±7,5 (47,2; 13,3)	9,9±2,7 (8,9; 4,6)	5,1±0,7 (5,2; 1,4)
2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	100,8±3,4 (99,8; 6,3) p <sub>2-1</sub> =1,000	101,9±4,3 (100,7; 8,0) P <sub>2-1</sub> =1,000	98,0±1,2 (97,7; 2,2) p <sub>2-1</sub> =0,122	82,2±3,2 (81,7; 5,2) p <sub>2-1</sub> =0,271	37,7±2,5 (36,9; 5,0) P <sub>2-1</sub> =1,000	11,1±0,8 (10,9; 1,01) p <sub>2-1</sub> =0,325
3. trolox 33,3 μg/ml	103,2±4,7 (102,03; 5,9) P <sub>3-1</sub> =0,316	99,9±2,3 (100,4; 4,6) P <sub>3-1</sub> =1,000	99,2±3,4 (100,8; 6,9) P <sub>3-1</sub> =0,084	98,5±4,2 (100,3; 8,4) P <sub>3-1</sub> =0,001	90,0±1,3 (89,7; 2,4) P <sub>3-1</sub> =0,000	48,6±3,0 (46,7; 5,8) P <sub>3-1</sub> =0,000
4. Diclofenac 33,3 μg/ml	100,4±3,1 (100,7; 4,7) P <sub>4-1</sub> =1,000	61,9±2,1 (61,8; 2,7) P <sub>4-1</sub> =0,746	11,9±1,3 (11,6; 2,6) P <sub>4-1</sub> =1,000	7,7±2,3 (7,4; 4,7) P <sub>4-1</sub> =1,000	7,0±0,7 (6,8; 1,3) P <sub>4-1</sub> =1,000	9,5±0,8 (9,6; 1,2) P <sub>4-1</sub> =1,000
5. Diclofenac 11,1 μg/ml	96,2±4,8 (98,9; 9,5) P <sub>5-1</sub> =1,000	93,3±2,4 (94,7; 4,8) P <sub>5-1</sub> =1,000	88,4±3,2 (88,3; 6,7) P <sub>5-1</sub> =1,000	77,1±2,8 (75,7; 5,6) P <sub>5-1</sub> =1,000	65,6±1,6 (64,8; 3,1) P <sub>5-1</sub> =0,007	57,7±7,0 (59,94; 14,9) P <sub>5-1</sub> =0,000
6. Extract hidric imuheptin 333,3 μg/ml	99,9±1,8 (99,3; 2,1) P <sub>6-1,2,3,4,5</sub> =1,000	99,3±1,9 (98,6; 2,1) P <sub>6-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,059 P <sub>6-5</sub> =0,430	98,1±3,0 (97,3; 3,6) P <sub>6-1</sub> =0,277 P <sub>6-2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,003 P <sub>6-5</sub> =0,086	92,9±2,4 (93,7; 2,7) P <sub>6-1</sub> =0,003 P <sub>6-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,000	66,9±5,5 (66,36; 8,8) P <sub>6-1</sub> =0,007 P <sub>6-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,01	21,9±8,3 (23,5; 16,0) P <sub>6-1</sub> =0,004 P <sub>6-2,3,4,5</sub> =1,000
7. Extract hidric imuheptin 111,1 μg/ml	100,0±1,7 (100,0; 2,1) P <sub>7-1,2,3,4,5</sub> =1,000	99,0±1,8 (98,5; 2,2) P <sub>7-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,126 P <sub>7-5</sub> =0,807	97,5±2,5 (97,5; 2,5) P <sub>7-1</sub> =0,365 P <sub>7-2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,004 P <sub>7-5</sub> =0,115	83,0±4,7 (82,5; 9,2) P <sub>7-1</sub> =0,216 P <sub>7-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,008	54,5±7,6 (53,5; 13,2) P <sub>7-1</sub> =0,131 P <sub>7-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,018	16,3±4,5 (16,2; 9,5) P <sub>7-1</sub> =0,017 P <sub>7-2,3,4,5</sub> =1,000
8. Extract hidric imuheptin 37 μg/ml	100,5±1,1 (100,1; 0,8) P <sub>8-1,2,3,4</sub> =1,000 P <sub>8-5</sub> =0,487	99,8±2,6 (99,0; 1,8) P <sub>8-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,014 P <sub>8-5</sub> =0,133	94,8±2, (95,4; 2,8) P <sub>8-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,476	59,2±9,7 (62,3; 17,3) P <sub>8-1,2,4,5</sub> =1,000 P <sub>8-3</sub> =0,036	21,9±4,8 (22,2; 8,4) P <sub>8-1,2,4</sub> =1,000 P <sub>8-3</sub> =0,038 P <sub>8-5</sub> =0,845	9,0±2,4 (8,3; 3,97) P <sub>8-1,2,4</sub> =1,000 P <sub>8-3</sub> =0,112 P <sub>8-5</sub> =0,02
9. Extract hidric imuheptin 12,3 μg/ml	101,5±2,6 (100,1; 5,1) P <sub>9-1</sub> =0,793 P <sub>9-2,3,4</sub> =1,000 P <sub>9-5</sub> =0,351	101,5±3,3 (99,8; 5,5) P <sub>9-1</sub> =0,746 P <sub>9-2,3</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,01 P <sub>9-5</sub> =0,008	95,6±3,0 (96,8; 5,3) P <sub>9-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,059 P <sub>9-5</sub> =0,905	48,2±5,5 (47,7; 11,2) P <sub>9-1,4,5</sub> =1,000 P <sub>9-2</sub> =0,579 P <sub>9-3</sub> =0,003	15,0±4,1 (16,8; 7,5) P <sub>9-1,2,4</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,004 P <sub>9-5</sub> =0,167	7,0±2,1 (6,0; 3,9) P <sub>9-1,2,4</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,005 P <sub>9-5</sub> =0,001

**p** – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

procentului de hematii nehemolizate către 180 minute, însă care rămânea superior controlului, diclofenacului și chiar acidului ascorbic (tab.3.1.1). Extractul hidric al imuheptinului în concentrațiile cercetate a determinat o stabilitate a hematiilor la hemoliză până la 90 minute cu o diminuare spre 180 minute. În aceste condiții un efect mai superior a demonstrat extractul hidric al imuheptinului în concentrația de 333,3  $\mu\text{g/ml}$  (tab 3.1.2). Analiza datelor obținute a relevat, că extractele alcoolice și hidrice în concentrațiile cercetate manifestau un efect stabil de protecție a hematiilor de hemoliză până la 90 minute, similar cu acidul ascorbic și troloxul, dar mai superior soluției tampon fosfat și, îndeosebi, diclofenacului în concentrația 33,3  $\mu\text{g/ml}$ . Concomitent extractul alcoolic al imuheptinului a demonstrat o capacitate mai mare de a preîntâmpina hemoliza eritrocitelor față de extractul hidric. În funcție de timp ambele tipuri de extracte ale imuheptinului au manifestat efect asemănător de a stabiliza membrana eritrocitelor până la 90 minute, iar spre 180 minute extractul alcoolic s-a dovedit mai efectiv. În același timp, în funcție de concentrație, nu s-a determinat o diferență semnificativă până la 90 minute, dar cu o diminuare proporțională a efectului protector al hematiilor spre 180 minute.

Extractul etanolic și hidric al imupurinului în concentrațiile studiate a manifestat o acțiune de stabilizare a membrane eritrocitelor până la 120 minute. În intervalul 150-180 minute extractul etanolic în concentrația 333,3  $\mu\text{g/ml}$  a menținut un procent mai mare de eritrocite nehemolizate în comparație cu soluția tampon fosfat, acidul ascorbic, diclofenac și trolox (tab.3.1.3). Analiza comparativă a relevat, că extractul etanolic și hidric al imupurinului în concentrația 333,3  $\mu\text{g/ml}$  și 111,1  $\mu\text{g/ml}$  a demonstrat un efect protector al hematiilor de hemoliză mai intens față de aceleași extracte ale imuheptinului.

Analiza influenței asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor a demonstrat, că antioxidanții acidul ascorbic și troloxul au manifestat un efect protector superior soluției tampon fosfat, îndeosebi între 120-180 minute. Troloxul a fost mai efectiv ca acidul ascorbic în intervalul 120-180 minute.

Diclofenacul a manifestat o capacitate mai mare de preîntâmpinare a hemolizei hematiilor în concentrația 11,1  $\mu\text{g/ml}$  față de 33,3  $\mu\text{g/ml}$ , dar a cedat troloxului. Extractul etanolic și hidric al imuheptinului și imupurinului în concentrația 333,3  $\mu\text{g/ml}$  a avut un efect superior troloxului și diclofenacului de a proteja eritrocitele de hemoliza oxidativă, îndeosebi în intervalul 120-180 minute. Extractul etanolic și hidric al imupurinului în concentrațiile 333,3  $\mu\text{g/ml}$  și 111,1  $\mu\text{g/ml}$  a demonstrat o capacitate mai mare de a stabiliza membranele hematiilor de hemoliza oxidativă (tab.3.1.3, tab 3.1.4).

**Tabelul 3.1.3 Influența imupurinelor (extract etanolic) asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor**

Loturile experimentale	Procentul de eritrocite nehemolizate (%)					
	X±DS (Mediana; AIQ)					
	15min	60min	90min	120min	150min	180min
1. control (soluție tampon fosfat)	99,1±3,5 (98,2; 2,6)	98,2±3,4 (97,5; 2,5)	91,3±2,3 (91,2; 3,1)	46,8±7,5 (47,2;13,3)	9,9±2,7 (8,9; 4,5)	5,1±0,7 (5,2; 1,4)
2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	100,8±3,4 (99,8; 6,3) p <sub>2-1</sub> =1,000	101,9±4,3 (100,7; 8,0) p <sub>2-1</sub> =1,000	98,0±1,2 (97,7; 2,2) p <sub>2-1</sub> =1,000	82,2±3,2 (81,7; 5,2) p <sub>2-1</sub> =1,000	37,7±2,5 (36,9; 4,9) p <sub>2-1</sub> =1,000	11,1±0,8 (10,9; 1,0) p <sub>2-1</sub> =1,000
3. trolox 33,3 μg/ml	103,2±4,7 (102,0; 5,9) P <sub>3-1</sub> =0,520	99,9±2,3 (100,4; 4,6) P <sub>3-1</sub> =1,000	99,2±3,4 (100,8; 6,9) P <sub>3-1</sub> =0,250	98,5±4,2 (100,3; 8,4) P <sub>3-1</sub> =0,001	90,0±1,3 (89,7; 2,4) P <sub>3-1</sub> =0,001	48,6±3,0 (46,7; 5,8) P <sub>3-1</sub> =0,012
4. Diclofenac 33,3 μg/ml	100,4±3,1 (100,7; 4,6) P <sub>4-1</sub> =1,000	61,9±2,1 (61,8; 2,7) P <sub>4-1</sub> =0,865	11,9±1,3 (11,6; 2,6) P <sub>4-1</sub> =1,000	7,7±2,3 (7,4; 4,7) P <sub>4-1</sub> =1,000	7,0±0,7 (6,8; 1,3) P <sub>4-1</sub> =1,000	9,5±0,8 (9,6; 1,2) P <sub>4-1</sub> =1,000
5. Diclofenac 11,1 μg/ml	96,2±4,8 (98,9; 4,7) P <sub>5-1</sub> =1,000	93,3±2,4 (94,7; 4,8) P <sub>5-1</sub> =1,000	88,4±3,2 (88,3; 6,7) P <sub>5-1</sub> =1,000	77,1±2,8 (75,6; 5,6) P <sub>5-1</sub> =1,000	65,6±1,6 (64,8; 3,1) P <sub>5-1</sub> =0,208	57,7±7,0 (59,9; 14,9) P <sub>5-1</sub> =0,000
6. Extract etanolic imupurin 333,3 μg/ml	99,1±1,2 (99,5; 1,1) P <sub>6-1,2,3,4,5</sub> =1,000	98,6±1,1 (99,2; 2,1) P <sub>6-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,334	97,7±1,1 (97,5; 1,8) P <sub>6-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,070 P <sub>6-4</sub> =0,947	95,8±3,3 (96,2; 3,6) P <sub>6-1</sub> =0,006 P <sub>6-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,001	94,6±4,5 (95,2; 4,9) P <sub>6-1</sub> =0,000 P <sub>6-2</sub> =0,084 P <sub>6-3,5</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,000	88,3±8,0 (89,7; 9,6) P <sub>6-1</sub> =0,000 P <sub>6-2</sub> =0,028 P <sub>6-3,5</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,001
7. Extract etanolic imupurin 111,1 μg/ml	100,6±1,0 (100,4; 1,3) P <sub>7-1,2,3,4,5</sub> =1,000	100,4±1,4 (99,8; 2,1) P <sub>7-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,007 P <sub>7-5</sub> =0,075	99,8±1,5 (99,5; 2,5) P <sub>7-1</sub> =0,097 P <sub>7-2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,001 P <sub>7-5</sub> =0,039	97,9±3,5 (98,4; 3,5) P <sub>7-1</sub> =0,001 P <sub>7-2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,000 P <sub>7-5</sub> =0,409	85,7±6,6 (83,1; 12,4) P <sub>7-1</sub> =0,005 P <sub>7-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,001	61,7±6,3 (61,2; 13,2) P <sub>7-1</sub> =0,001 P <sub>7-2</sub> =0,430 P <sub>7-3,5</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,034
8. Extract etanolic imupurin 37 μg/ml	103,5±5,0 (102,7; 9,7) P <sub>8-1</sub> =0,887 P <sub>8-2,3,4</sub> =1,000 P <sub>8-5</sub> =0,420	102,0±4,8 (102,1; 8,9) P <sub>8-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,014 P <sub>8-5</sub> =0,133	100,8±4,5 (100,9; 8,5) P <sub>8-5</sub> =0,188 P <sub>8-2,3</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,003 P <sub>8-5</sub> =0,077	93,8±0,5 (93,9; 1,1) P <sub>8-1</sub> =0,041 P <sub>8-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,005	60,3±5,4 (60,5; 7,9) P <sub>8-1</sub> =0,760 P <sub>8-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,171	26,3±3,8 (25,2; 3,5) P <sub>8-1</sub> =0,163 P <sub>8-2,3,4,5</sub> =1,000
9. Extract etanolic imupurin 12,3 μg/ml	105,2±7,0 (103,1; 8,8) P <sub>9-1</sub> =0,093 P <sub>9-2,3,4</sub> =1,000 P <sub>9-5</sub> =0,043	103,9±4,6 (103,7; 8,2) P <sub>9-1</sub> =0,348 P <sub>9-2,3</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,005 P <sub>9-5</sub> =0,122	99,0±5,1 (99,5; 5,7) P <sub>4-9</sub> <0,05 P <sub>9-1</sub> =0,296 P <sub>9-2,3</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,000 P <sub>9-5</sub> =0,004	70,6±5,6 (68,6; 10,0) P <sub>9-1,2,4,5</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,060	28,6±3,4 (27,6; 6,4) P <sub>9-1,2,4,5</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,075	9,9±1,2 (9,5; 2,1) P <sub>9-1,2,3,4</sub> =1,000 P <sub>9-5</sub> =0,176

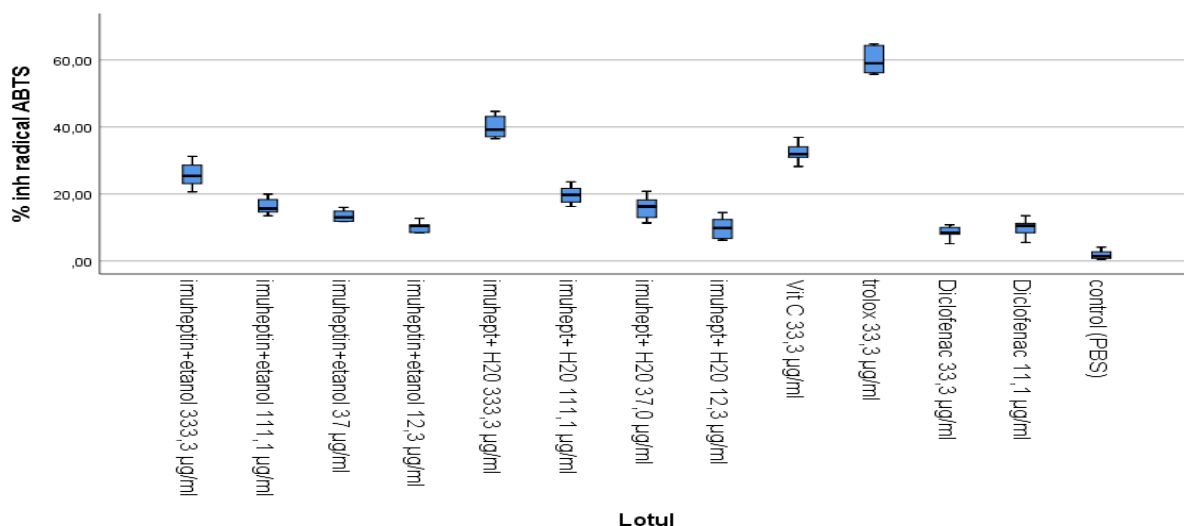
p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

**Tabelul 3.1.4 Influența imupurinelor (extract hidric) asupra hemolizei oxidative a eritrocitelor**

Loturile experimentale	Procentul de eritrocite nehemolizate (%)					
	X±DS (Mediana; AIQ)					
	15min	60min	90min	120min	150min	180min
1. control (soluție tampon fosfat)	99,1±3,5 (98,2; 2,6)	98,2±3,4 (97,5; 2,5)	91,3±2,3 (91,2; 3,1)	46,8±7,5 (47,2; 13,3)	9,9±2,7 (8,9; 4,5)	5,1±0,7 (5,2; 1,4)
2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	100,8±3,4 (99,8; 6,3) p <sub>2-1</sub> =1,000	101,9±4,3 (100,7; 8,0) p <sub>2-1</sub> =1,000	98,0±1,2 (97,7; 2,2) p <sub>2-1</sub> =1,000	82,2±3,2 (81,7; 5,2) p <sub>2-1</sub> =0,649	37,7±2,5 (36,9; 4,9) p <sub>2-1</sub> =1,000	11,1±0,8 (10,9; 1,0) p <sub>2-1</sub> =1,000
3. trolox 33,3 μg/ml	103,2±4,7 (102,0; 5,9) P <sub>3-1</sub> =0,520	99,9±2,3 (100,4; 4,6) P <sub>3-1</sub> =1,000	99,2±3,4 (100,8; 6,9) P <sub>3-1</sub> =0,091	98,5±4,2 (100,3; 8,4) P <sub>3-1</sub> =0,001	90,0±1,3 (89,7; 2,4) P <sub>3-1</sub> =0,001	48,6±3,0 (46,7; 5,8) P <sub>3-1</sub> =0,018
4. Diclofenac 33,3 μg/ml	100,4±3,1 (100,7; 4,6) P <sub>4-1</sub> =1,000	61,9±2,1 (61,8; 2,7) P <sub>4-1</sub> =0,485	11,9±1,3 (11,6; 2,6) P <sub>4-1</sub> =1,000	7,7±2,3 (7,4; 4,7) P <sub>4-1</sub> =1,000	7,0±0,7 (6,8; 1,3) P <sub>4-1</sub> =1,000	9,5±0,8 (9,6; 1,2) P <sub>4-1</sub> =1,000
5. Diclofenac 11,1 μg/ml	96,2±4,8 (98,9; 4,7) P <sub>5-1</sub> =1,000	93,3±2,4 (94,7; 4,8) P <sub>5-1</sub> =1,000	88,4±3,2 (88,3; 6,7) P <sub>5-1</sub> =1,000	77,1±2,8 (75,6; 5,6) P <sub>5-1</sub> =1,000	65,6±1,6 (64,8; 3,1) P <sub>5-1</sub> =0,155	57,7±7,0 (59,9; 14,9) P <sub>5-1</sub> =0,000
6. Extract hidric imupurin 333,3 μg/ml	100,0±0,2 (100,1; 0,4) P <sub>6-1,2,3,4,5</sub> =1,000	100,0±0,2 (99,9; 0,3) P <sub>6-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,002 P <sub>6-5</sub> =0,046	99,7±0,5 (99,7; 0,9) P <sub>6-1</sub> =0,000 P <sub>6-2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,000 P <sub>6-5</sub> =0,015	99,7±0,7 (99,6; 1,3) P <sub>6-1</sub> =0,043 P <sub>6-2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,000 P <sub>6-5</sub> =0,257	98,1±0,8 (97,9; 1,3) P <sub>6-1</sub> =0,000 P <sub>6-2</sub> =0,052 P <sub>6-3,5</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,000	87,1±3,5 (87,8; 7,5) P <sub>6-1</sub> =0,000 P <sub>6-2</sub> =0,046 P <sub>6-3,5</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,004
7. Extract hidric imupurin 111,1 μg/ml	100,1±0,6 (99,8; 0,8) P <sub>7-1,2,3,4,5</sub> =1,000	100,0±1,1 (99,9; 1,5) P <sub>7-1,2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,005 P <sub>7-5</sub> =0,088	100,6±1,7 (99,9; 2,6) P <sub>7-1</sub> =0,014 P <sub>7-2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,000 P <sub>7-5</sub> =0,005	96,9±2,0 (97,5; 6,0) P <sub>7-1</sub> =0,008 P <sub>7-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,001	85,1±3,2 (84,1; 6,8) P <sub>7-1</sub> =0,010 P <sub>7-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,002	57,2±3,9 (55,1; 7,8) P <sub>7-1</sub> =0,000 P <sub>7-2</sub> =0,926 P <sub>7-3,5</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,133
8. Extract hidric imupurin 37 μg/ml	98,7±1,7 (99,8; 3,4) P <sub>8-1,2,3,4,5</sub> =1,000	98,9±1,4 (99,7; 2,9) P <sub>8-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,136	96,9±1,8 (97,9; 3,4) P <sub>8-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,176	81,5±2,9 (82,6; 6,0) P <sub>8-1</sub> =0,616 P <sub>8-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,089	63,5±0,5 (63,3; 1,01) P <sub>8-1</sub> =0,972 P <sub>8-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,225	29,6±3,7 (28,4; 7,8) P <sub>8-1</sub> =0,237 P <sub>8-2,3,4,5</sub> =1,000
9. Extract hidric imupurin 12,3 μg/ml	98,9±5,7 (99,4; 9,5) P <sub>9-1,2,3,4,5</sub> =1,000	97,9±4,8 (98,1; 8,8) P <sub>9-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,299	95,0±4,0 (96,9; 8,3) P <sub>9-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,525	58,1±2,5 (59,4; 5,1) P <sub>9-1,2,4,5</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,023	18,1±1,8 (17,5; 3,7) P <sub>9-1,2,4,5</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,066	7,6±2,0 (8,37; 3,9) P <sub>9-1,2,4</sub> =1,000 P <sub>9-3</sub> =0,278 P <sub>9-5</sub> =0,016

p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

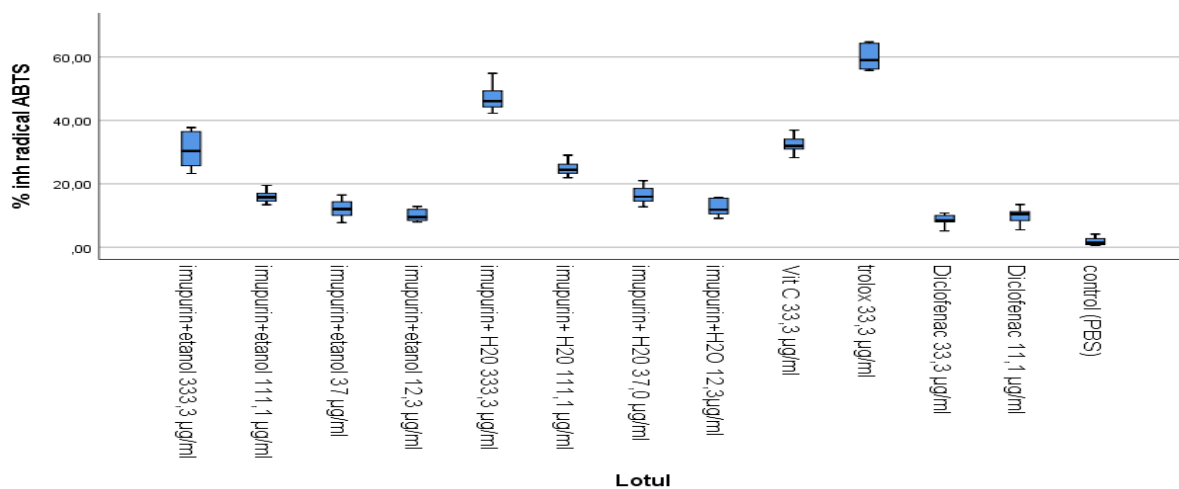
**Studiul activității antioxidante prin metoda de reducere a radicalului ABTS** a demonstrat, că acidul ascorbic și troloxul au manifestat o capacitate net mai mare decât soluția tampon fosfat (anexa 1). Diclofenacul în concentrația 33,3  $\mu\text{g/ml}$  și 11,1  $\mu\text{g/ml}$  a cedat semnificativ antioxidanților, dar a fost mai superior față de substanța de control. Extractul alcoolic al imuheptinului după capacitatea de reducere a radicalului ABTS a cedat acidului ascorbic și troloxului, dar a fost mai marcată ca la diclofenac, îndeosebi în concentrația 333,3  $\mu\text{g/ml}$ . Extractul hidric al imuheptinului în concentrația 333,3  $\mu\text{g/ml}$  a demonstrat o capacitate de reducere a radicalului ABTS superioară diclofenacului și chiar acidului ascorbic (fig.3.1.1). Concomitent, extractul hidric în concentrațiile 333,3  $\mu\text{g/ml}$ , 111,1  $\mu\text{g/ml}$  și 37  $\mu\text{g/ml}$  a manifestat o activitate antioxidantă de reducere a radicalului ABTS mai mare față de cel etanolic.



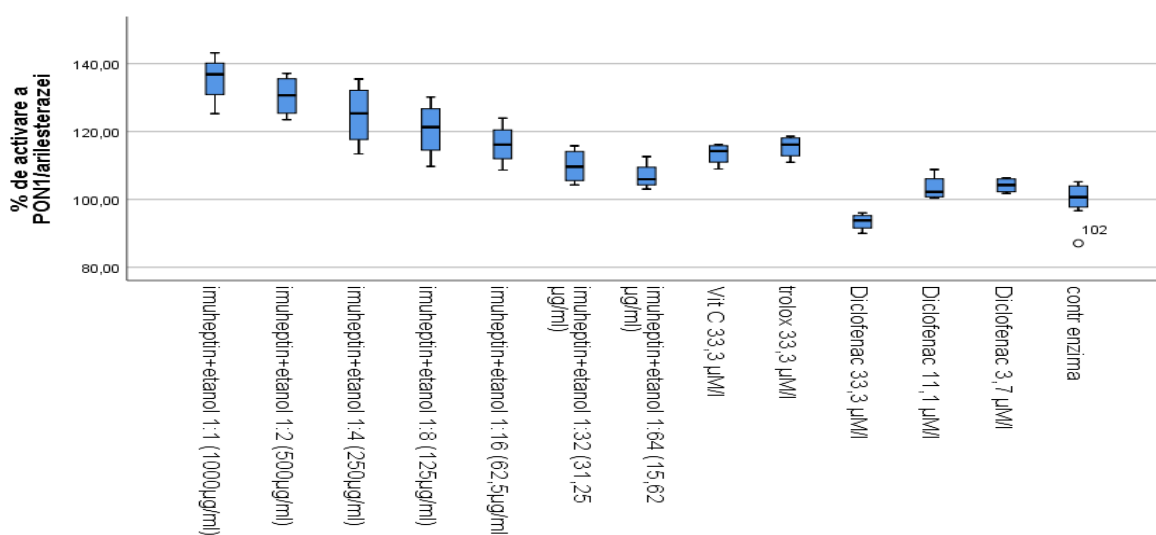
**Figura 3.1.1. Influența imuheptinului asupra reducerii radicalului ABTS**

Extractul alcoolic al imupurinului a manifestat activitate antioxidantă prin reducerea radicalului ABTS practic similar acidului ascorbic, a cedat troloxului, dar a fost mai marcată ca la diclofenac, îndeosebi în concentrația 333,3  $\mu\text{g/ml}$ . Extractul hidric al imupurinului în concentrația 333,3  $\mu\text{g/ml}$  a demonstrat o capacitate de reducere a radicalului ABTS superioară diclofenacului și acidului ascorbic (anexa 1). Concomitent, extractul hidric în concentrațiile 333,3  $\mu\text{g/ml}$ , 111,1  $\mu\text{g/ml}$  și 37  $\mu\text{g/ml}$  a redus radicalul ABTS mai pronunțat comparativ cu cel etanolic (fig.3.1.2). Analiza rezultatelor obținute au permis de a estima, că extractele imupurinului au manifestat un efect antioxidant prin captarea radicalului ABTS ceva mai mare față de extractele imuheptinului. Astfel, se poate concluziona, că preparatele de origine entomologică au determinat o capacitate mai mare de reducere a radicalului ABTS în comparație cu antiinflamatorul nesteroidian, iar în concentrațiile 333,3  $\mu\text{g/ml}$  chiar ceva mai superioară față

de acidul ascorbic. Acest efect s-ar putea datora conținutului de antioxidanți hidrosolubili din extractele imupurinului și imuheptinului.



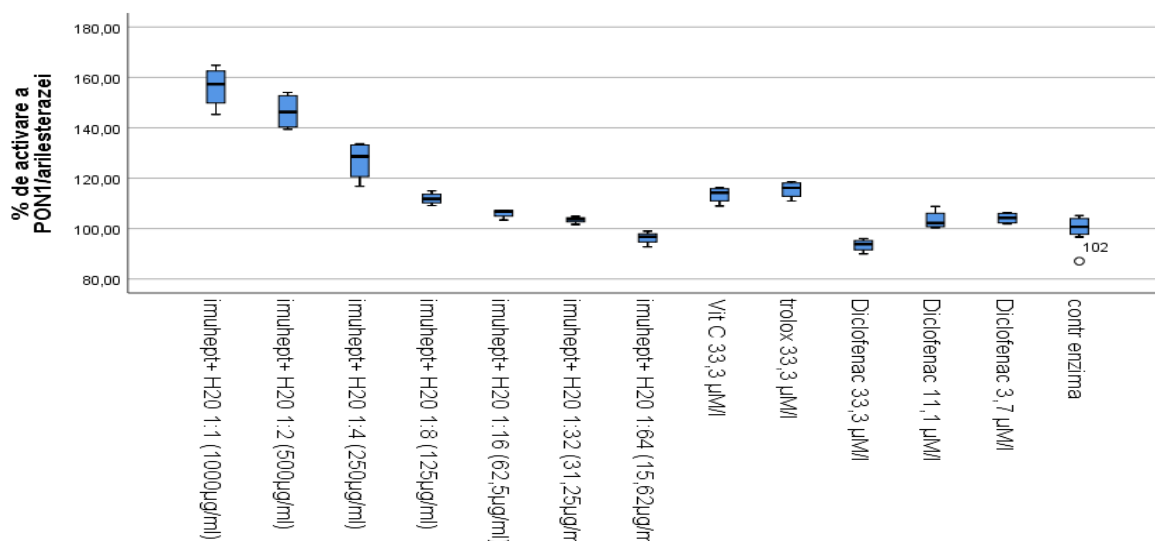
**Figura 3.1.2. Influența imupurinului asupra reducerii radicalului ABTS**



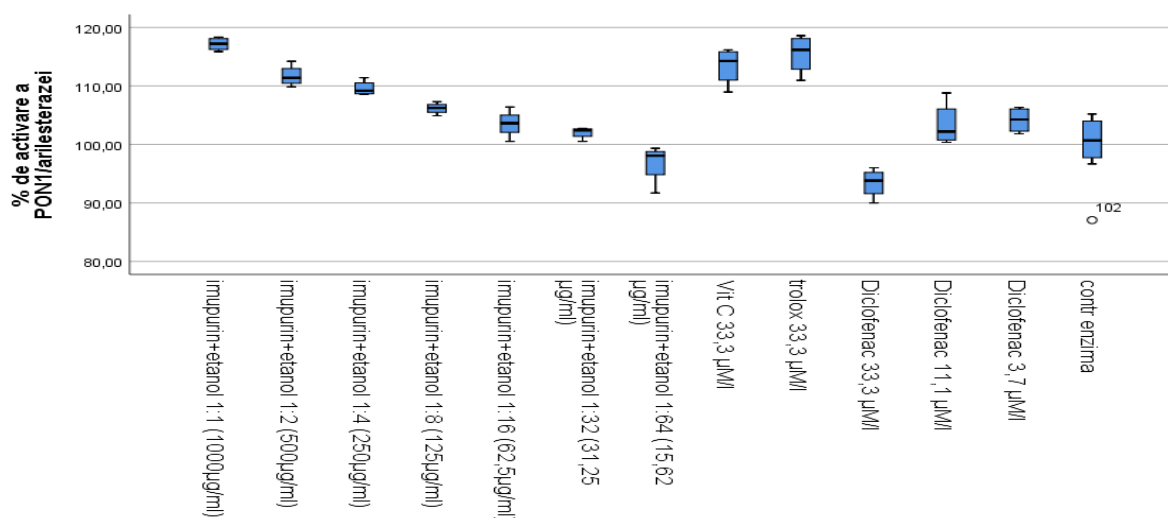
**Figura 3.1.3. Influența extractului etanolic al imuheptinului asupra activității paraoxonazei/ariesterazei**

Studiul influenței asupra activității paraoxonazei/ariesterazei a demonstrat o creștere a acesteia sub acțiunea acidului ascorbic și troloxului. Diclofenacul în concentrația 33,3 µg/ml a determinat o micșorare nesemnificativă a activității paraoxonazei/ariesterazei, iar în concentrația 11,1 µg/ml o majorare neesențială a acesteia, dar care ceda antioxidanților. Extractul etanolic al imuheptinului în concentrațiile de la 1000 µg/ml până la 15,62 µg/ml a manifestat o capacitate de majorare a paraoxonazei/ariesterazei într-o manieră proporțională concentrației (anexa 2. fig.3.1.3). Această capacitate a fost superioară diclofenacului și antioxidanților. Extractul hidric al imuheptinului a determinat o creștere semnificativă față de lotul de control și

diclofenac a activității paraoxonazei/arilesterazei într-o manieră dependentă de concentrație (anexa 2, fig.3.1.4).



**Figura 3.1.4. Influența extractului hidric al imuheptinului asupra activității paraoxonazei/arilesterazei**

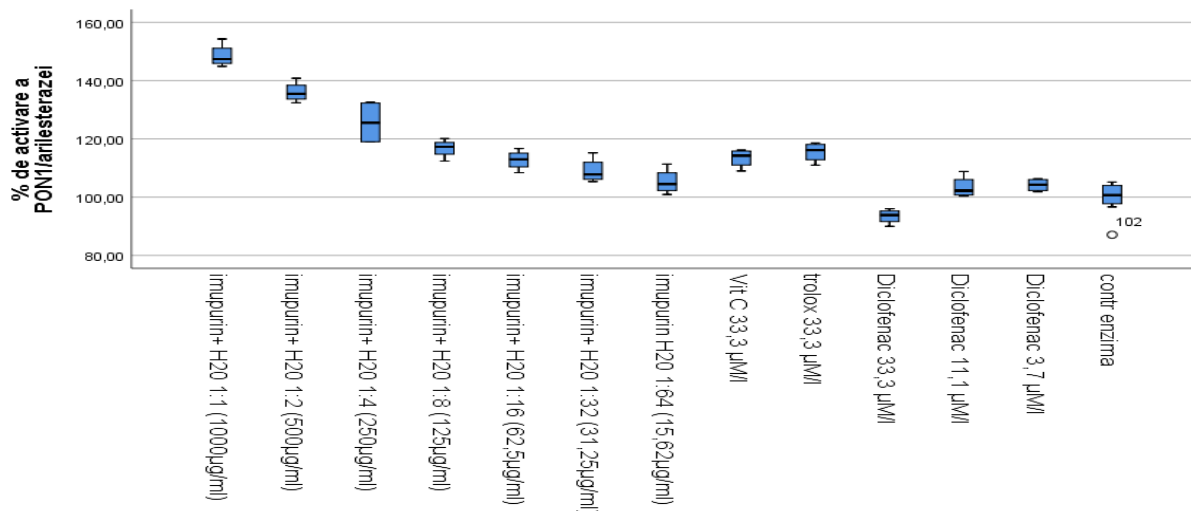


**Figura 3.1.5. Influența extractului alcoolic al imupurinului asupra activității paraoxonazei/arilesterazei**

Extractul alcoolic al imupurinului a demonstrat un efect similar antioxidanților de majorare a activității paraoxonazei/arilesterazei în funcție de concentrație (anexa 3, fig.3.1.5). Extractul hidric al imupurinului a manifestat o acțiune de creștere a activității paraoxonazei/arilesterazei într-o manieră invers proporțională cu concentrația (anexa 3, fig.3.1.6). Această acțiune a fost mai intensă în comparație cu acidul ascorbic, troloxul și



diclofenacul. Analiza comparativă a extractelor preparatelor entomologice a demonstrat, că, atât extractul alcoolic, cât și cel hidric al imuheptinului a contribuit la o majorare mai accentuată a activității paraoxonazei/arilesterazei față de extractele similare ale imupurinului.



**Figura 3.1.6. Influența extractului hidric al imupurinului asupra activității paraoxonazei/arilesterazei**

**Influența preparatelor de origine entomologică asupra inflamației acute.** Edemul urechii indus de xilen a fost adoptat ca model inflamator acut, folosit frecvent pentru a evalua efectele antiinflamatorii ale substanțelor cercetate și are o bună valoare predictivă în screening-ul agenților antiinflamatori. Edemul urechii indus de xilen a determinat acumularea de lichid și edem, caracteristic răspunsului inflamator acut. Inflamația indusă de xilen a provocat eliberarea de mediatori proinflamatori, care acționează asupra celulelor țintă periferice, precum mastocite și alte celule imunitare, producând inflamație acută caracterizată prin tumor, rubor, calor și dolor. Suprimarea acestui răspuns este un indiciu probabil al efectului antiflogistic (antiexudativ) al preparatelor cercetate [29].

La modelarea edemului urechii prin xilen peste 3 ore s-a constatat o majorare a greutateii piesei auriculare drepte cu manifestări caracteristice procesului inflamator (hiperemie, edem). Aplicarea locală de xilen a provocat un edem al urechii manifestat prin majorarea diferenței dintre masa piesei auriculare drepte și stângi (tab. 3.1.5). Administrarea preventivă, timp de 5 zile, internă a preparatelor de origine entomologică a determinat o reducere mai vădită a edemului cu un procent de inhibiție a inflamației de 45,85% pentru imupurin și 49,78% pentru imuheptin (tab.3.1.5). Astfel, screening-ul ne-a demonstrat, că preparatele cercetate manifestă proprietăți antiinflamatoare și necesită un studiu detaliat al acestora.

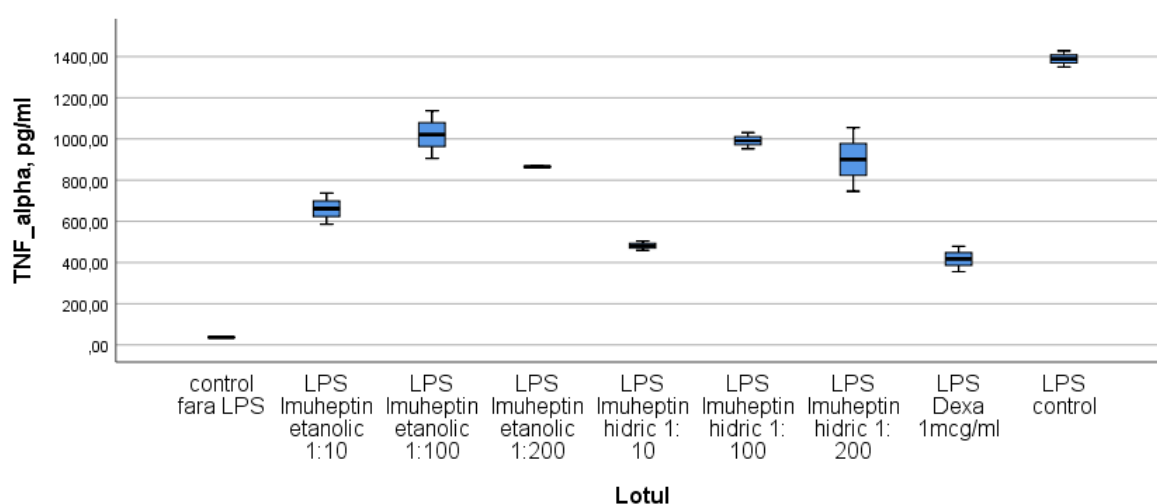
**Tabelul 3.1.5. Influența imupurinelor și imuheptinelor asupra edemului urechii la șoricelul indus prin xilen (3 ore)**

Loturile de animale	Greutate piesa auriculară ST, mg	Greutate piesa auriculară DR, mg	Diferența DR ST, mg (gradul edemului)	% inhibiției
	X±DS (Mediana; AIQ)			
1. Control sol. fiziologică, intraperitoneal (n=10)	17,2±2,5 (16,9; 3,4)	23,1±4,3 (22,6; 7,6)	5,8±3,3 (7,4; 6,8)	
2.Imupurin 500 mg/kg, per os, timp de 5 zile înainte de xilen (n=9)	16,0±1,4 (15,9; 2,5) P <sub>1-2</sub> = 0,557	19,1±2,6 (18,7; 4,6) P <sub>1-2</sub> = 0,038	3,2±2,1 (3,1; 3,9) P <sub>1-2</sub> = 0,115	<b>45,85%</b>
3.Imuheptin 500 mg/kg, per os, timp de 5 zile înainte de xilen (n=10)	16,0±1,9 (15,2; 3,5) P <sub>1-3</sub> = 0,666	19,0±1,7 (19,5; 2,4) P <sub>1-3</sub> = 0,035	2,9±2,2 (2,4; 4,3) P <sub>1-3</sub> = 0,090	<b>49,78%</b>

p – semnificația ajustată din testul Anova pentru comparații multiple cu corecția Bonferroni (ÎÎ=95%)

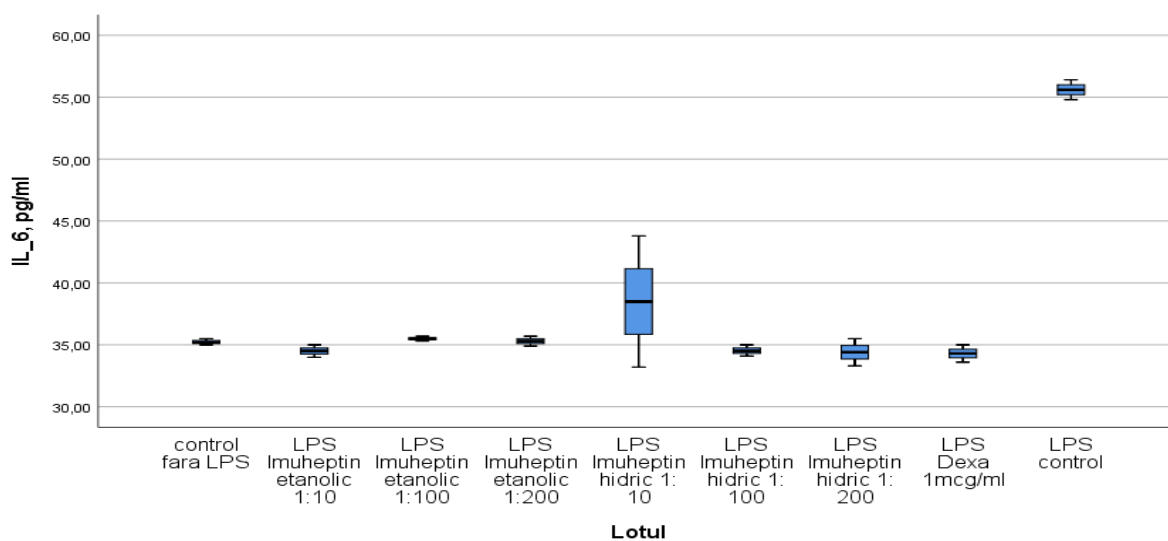
### 3.2 Influența imupurinelor și imuheptinelor asupra inflamației induse prin lipopolizaharide

În macrofagele stimulate de LPS (lot control LPS) s-a constatat o creștere bruscă a conținutului de citokine proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) și a citokinei antiinflamatorii (IL-10) (fig. 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, anexa 5). Dexametazona la o concentrație de 1 µg/ml a relevat o scădere semnificativă a citokinelor proinflamatorii TNF-alfa (fig.3.2.1, fig.3.2.4, anexa 5) și IL-6 (fig.3.2.2, fig.3.2.5, anexa 5) cu o creștere și mai pronunțată a nivelului de IL-10 (fig.3.2.3, fig.3.2.6, anexa 5). Extractul etanolic de imuheptin a scăzut semnificativ nivelurile de TNF-alfa (fig.3.2.1) și IL-6 (3.2.2) la macrofagele stimulate de LPS (anexa 5).

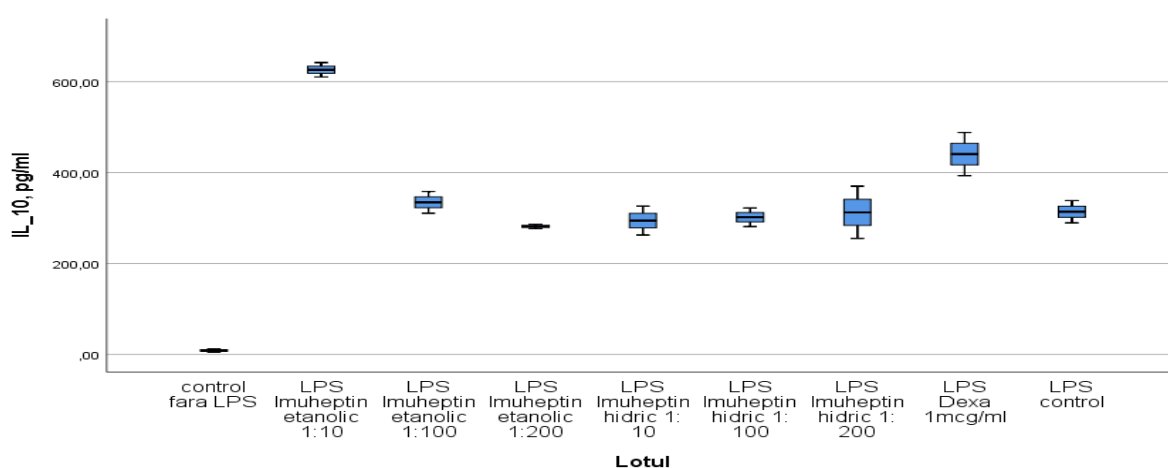


**Figura 3.2.1 Influența imuheptinelor asupra nivelului de TNF-alfa în macrofagele stimulate prin LPS**

Nivelul de IL-10 a crescut la diluția de 1:10 și practic a rămas la nivelul de control pozitiv la o diluție de 1:100 și 1:200 (fig.3.2.3, anexa 5). Extractul hidric de imuheptin la o diluție de 1:10 a redus nivelul de TNF-alfa (fig.3.2.1, anexa 5) similar dexametazonei și a menținut nivelul IL-6 proinflamatoare asemănător lotului macrofagelor nestimulate (fig.3.2.2, anexa 5). Extractul etanolic de imuheptin în diluția 1:10 a influențat considerabil conținutul IL-10 în comparație cu dexametazonă și lotul control (macrofagele stimulate de LPS). Pentru imuheptin conținutul IL-10 a constituit  $626,2 \pm 15,8$  pg/ml, pe când pentru dexametazonă a prezentat  $440,7 \pm 47,5$  pg/ml. Însă această superioritate nu a fost caracteristică altor concentrații a extractelor etanolice și hidrice ale imuheptinului (fig.3.2.3, anexa 5).

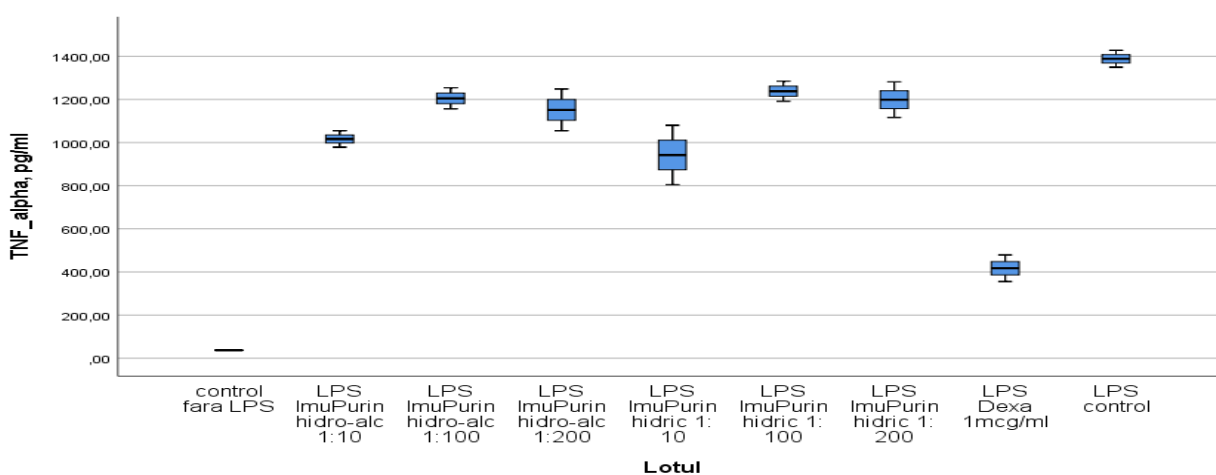


**Figura 3.2.2 Influența imuheptinului asupra nivelului de IL-6 în macrofagele stimulate prin LPS**

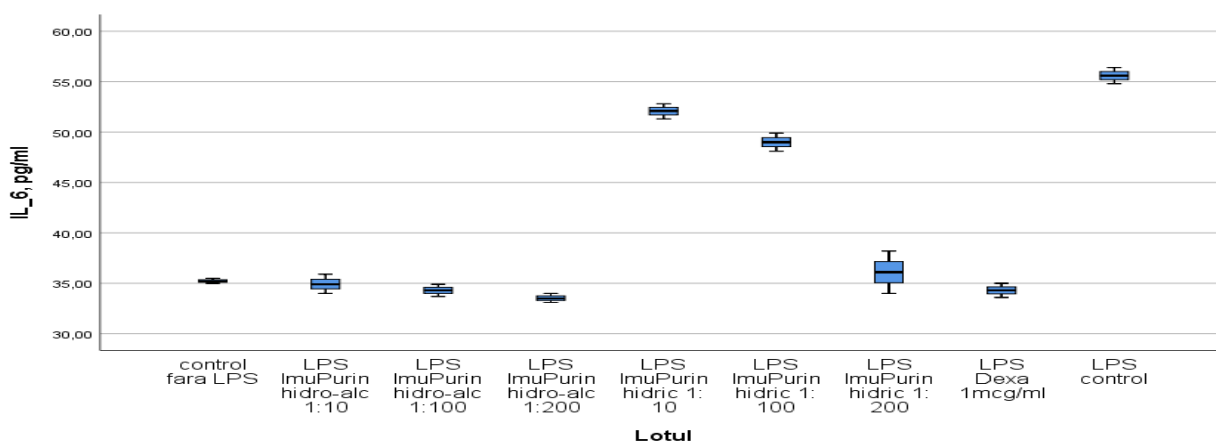


**Figura 3.2.3 Influența imuheptinului asupra nivelului de IL-10 în macrofagele stimulate prin LPS**

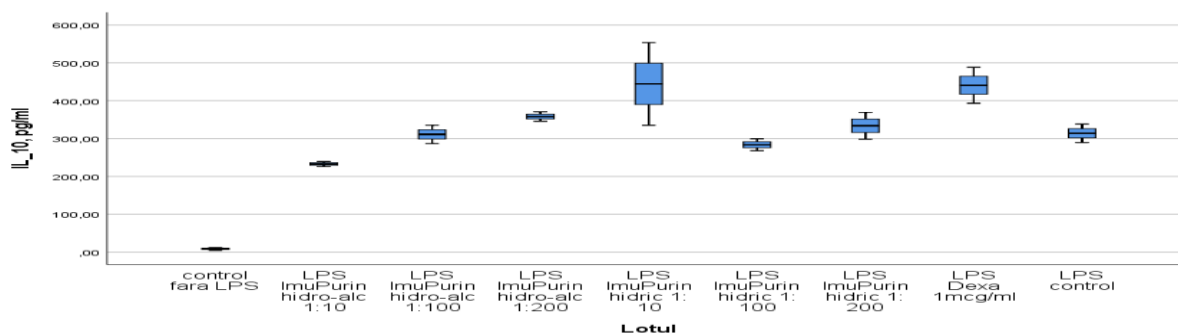
La tratarea macrofagelor cu extract etanolic de imupurin, s-a observat o diminuare neesențială a TNF-alfa (fig.3.2.4 anexa 6) și IL-10 (fig.3.2.6, anexa 6) și o scădere a nivelului IL-6 (fig.3.2.5, anexa 6) (tab. 3.2.2, anexa 6). Extractul hidric de imupurin în diluție 1:10 a crescut semnificativ nivelul de IL-10, față de lotul control, dar similar dexametazonei (fig.3.2.6, anexa 6) și l-a scăzut pe cel al TNF-alfa (fig.3.2.4, anexa 6) în comparație cu macrofagele stimulate de LPS. Preparatul entomologic în diluția 1:10 nu a influențat semnificativ nivelul IL-6 (fig.3.2.5, anexa 6). Extractul hidric de imupurin în diluțiile 1:100 și 1:200 a redus nivelul IL-6 respectiv până la  $49,0 \pm 0,9$  și  $36,1 \pm 2,1$  pg /ml ( $P < 0,05$ ) în comparație cu indicii corespunzători la macrofagele stimulate cu LPS.



**Figura 3.2.4 Influența imupurinului asupra nivelului de TNF-alfa în macrofagele stimulate prin LPS**

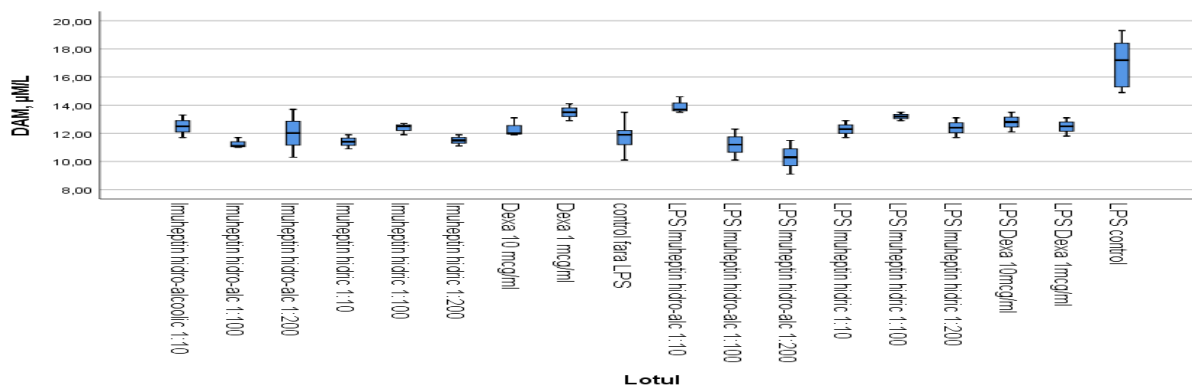


**Figura 3.2.5 Influența imupurinului asupra nivelului de IL-6 în macrofagele stimulate prin LPS**

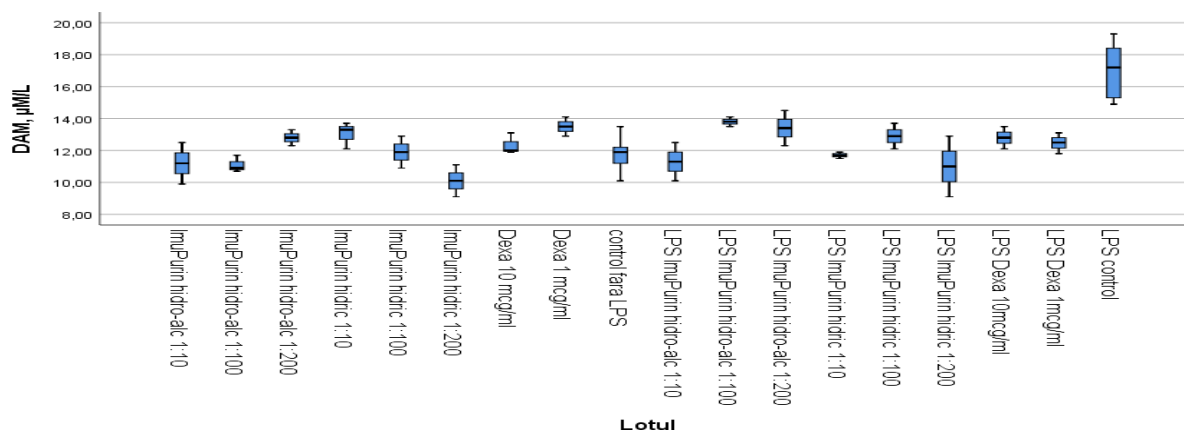


**Figura 3.2.6 Influența imupurinelor asupra nivelului de IL-10 în macrofagele stimulate prin LPS**

Influența preparatelor studiate asupra sistemului prooxidant s-a efectuat prin studierea nivelului DAM în macrofagele peritoneale. Dexametazona a determinat o majorare nesemnificativă a nivelului DAM în macrofagele peritoneale. Preparatele de origine entomologică în diluțiile cercetate nu au modificat esențial conținutul DAM în macrofagele peritoneale. La stimularea macrofagelor peritoneale prin LPS s-a constatat o creștere a nivelului DAM de la  $11,8 \pm 1,0 \mu\text{M/L}$  până la  $17,0 \pm 1,7 \mu\text{M/L}$  ( $P < 0,05$ ). Antiinflamatorul steroidian în concentrațiile  $1 \mu\text{g/ml}$  și  $10 \mu\text{g/ml}$  a determinat o reducere a conținutului DAM în macrofagele stimulate prin LPS de la  $17,0 \pm 1,7 \mu\text{M/L}$  până la  $12,5 \pm 0,6$  și  $12,8 \pm 0,7 \mu\text{M/L}$  ( $P > 0,05$ ) respectiv. La incubarea macrofagelor peritoneale stimulate prin LPS cu extractul hidro-alcoolic de imuheptin s-a constatat o micșorarea a nivelului DAM, îndeosebi în diluțiile 1:100 și 1:200 (anexa 6, fig.3.2.7). Extractul hidric de imuheptin a manifestat un efect de reducere a conținutului DAM similar dexametazonei (anexă 6). Extractul hidro-alcoolic și, îndeosebi cel hidric, de imupurin a determinat o reducere a nivelului DAM în macrofagele stimulate prin LPS, efectul fiind mai pronunțat pentru diluția 1:10 (anexă 6, fig.3.2.8).



**Figura 3.2.7. Influența imuheptinului asupra nivelului DAM în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**



**Figura 3.2.8. Influența imupurinelor asupra nivelului DAM în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Incubarea macrofagelor peritoneale cu dexametazonă în concentrațiile 1 µg/ml a determinat o majorare neesențială a activității catalazei, iar cea de 10 µg/ml nu a modificat acest parametru. Extractul hidro-alcoolic al imuheptinului a cauzat în macrofagele peritoneale o creștere neesențială a activității catalazei invers proporțională diluției, iar extractul hidric a manifestat acțiune similară în diluțiile 1:10 și 1:100 (tab.3.2.1.).

Stimularea macrofagelor peritoneale prin LPS a determinat o majorare neesențială a activității catalazei. Dexametazona în concentrația de 1 µg/ml a micșorat activitatea catalazei, iar în cea de 10 µg/ml a majorat activitatea enzimei în comparație cu macrofagele stimulate prin LPS. Extractul hidro-alcoolic de imuheptin, îndeosebi în diluția 1:100 la incubarea cu macrofagele stimulate prin LPS a crescut neesențial activitatea catalazei. În condiții similare extractul hidric de imuheptin a diminuat activitatea catalazei în diluțiile 1:100 și 1:200 (tab.3.2.1.).

Incubarea macrofagelor stimulate prin LPS cu extractul hidro-alcoolic de imupurin în diluțiile 1:10 și 1:100 a determinat micșorarea activității catalazei, în timp ce, extractul hidric de imupurin nu a modificat esențial activitatea enzimei (tab.3.2.2).

Dexametazona în concentrațiile 1 µg/ml și 10 µg/ml a determinat o creștere neesențială a activității SOD la incubarea cu macrofagele peritoneale. Activitatea SOD a fost neesențial stimulată în macrofagele peritoneale la incubarea cu extractul hidro-alcoolic de imuheptin în diluțiile 1:10 și 1:200 și cel hidric în diluția 1:10 (tab.3.2.1). La incubarea macrofagelor peritoneale cu extractul hidro-alcoolic de imupurin s-a constatat o majorare neesențială a activității SOD, proporțional concentrației. Extractul hidric de imupurin a manifestat o tendință de majorare a activității SOD doar în diluția de 1:10 (tab.3.2.2).

**Tabelul 3.2.1. Influența imuheptinului asupra activității superoxidismutazei (SOD) și catalazei în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS**

Parametri	Catalaza, μM/s.L	Catalaza, μM/s.L	SOD, u/c	SOD, u/c
	X±DS			
Grupele testate	- LPS	+LPS	-LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	16,4±1,5	17,1±1,5 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	854,4±48,5	1237,1±121,5 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,001
2. Dexametazonă 1μg/ml	19,7±1,2 P <sub>1-2</sub> =1,000	15,9±0,4 P <sub>1-2</sub> =1,000	910,1±18,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	1124,6±63,8 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10μg/ml	16,6±0,7 P <sub>1-3</sub> =1,000	21,4±1,1 P <sub>1-3</sub> =1,000	913,0±43,4 P <sub>1-3</sub> =1,000	1165,2±11,6 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imuheptin hidro-alcoolic 1:10	22,8±1,0 P <sub>1-4</sub> =0,023 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,198	19,6±0,8 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,996 P <sub>3-4</sub> =1,000	953,6±43,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	1150,7±2,9 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imuheptin hidro-alcoolic 1:100	20,9±1,1 P <sub>1-5</sub> =0,242 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	26,3±0,9 P <sub>1-5</sub> =0,402 P <sub>2-5</sub> =0,107 P <sub>3-5</sub> =1,000	829,0±5,8 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	1055,07±5,8 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imuheptin hidro-alcoolic 1:200	19,8±0,9 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	18,8±1,8 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	965,2±26,1 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	1043,5±5,8 P <sub>1-6</sub> =0,427 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imuheptin hidric 1:10	21,6±0,7 P <sub>1-7</sub> =0,087 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =0,508	17,5±0,9 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	947,8±31,9 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	1229,0±34,8 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imuheptin hidric 1:100	18,9±1,7 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	16,8±0,6 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	860,9±37,7 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	1153,6±11,6 P <sub>1-8</sub> =1,0005 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imuheptin hidric 1:200	16,3±0,5 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	11,4±0,6 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,021	817,4±17,4 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	1084,1±17,4 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

Stimularea macrofagelor peritoneale cu LPS a determinat o majorare a activității SOD de la 854,4±48,5 u/c până la 1237,1±121,5 u/c (P<0,05). Dexametazona în concentrația de 1 μg/ml și 10 μg/ml a micșorat nesemnificativ activitatea SOD în macrofagele stimulate prin LPS. Extractul hidro-alcoolic de imuheptin la incubarea cu macrofagele stimulate prin LPS a diminuat nesemnificativ activitatea SOD în comparație cu lotul de control. În condiții similare extractul hidric de imuheptin a diminuat neesențial activitatea SOD în diluțiile 1:100 și 1:200 (tab.3.2.1). Incubarea macrofagelor peritoneale, stimulate prin LPS, cu extractul hidro-alcoolic și hidric de imupurin în diluțiile cercetate a determinat o tendință de micșorare a activității SOD (anexă, tab.3.2.2.).

**Tabelul 3.2.2. Influența imupurinelor asupra activității superoxid-dismutazei (SOD) și catalazei în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS**

Parametri	Catalaza, μM/s.L	Catalaza, μM/s.L	SOD, u/c	SOD, u/c
	X±DS			
Grupele testate	- LPS	+LPS	-LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	16,4±1,5	17,1±1,5 P <sub>LPS- /LPS+</sub> =1,000	854,4±48,5	1237,1±121,5 P <sub>LPS- /LPS+</sub> =0,001
2. Dexametazonă 1 μg/ml	19,7±1,2 P <sub>1-2</sub> =1,000	15,9±0,4 P <sub>1-2</sub> =1,000	910,1±18,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	1124,6±63,8 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10 μg/ml	16,6±0,7 P <sub>1-3</sub> =1,000	21,4±1,1 P <sub>1-3</sub> =1,000	913,0±43,5 P <sub>1-3</sub> =1,000	1165,2±11,6 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imupurin hidro-alcoolic 1:10	15,6±0,5 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	13,7±0,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,026	1078,3±5,8 P <sub>1-4</sub> =0,296 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	1139,1±20,3 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imupurin hidro-alcoolic 1:100	14,7±1,2 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,274 P <sub>3-5</sub> =1,000	11,2±0,4 P <sub>1-5</sub> =0,430 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,008	959,4±55,1 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	1031,9±17,4 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imupurin hidro-alcoolic 1:200	11,3±0,6 P <sub>1-6</sub> =0,303 P <sub>2-6</sub> =0,006 P <sub>3-6</sub> =0,484	16,5±1,1 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	915,9±23,2 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	994,2±8,7 P <sub>1-6</sub> =0,326 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imupurin hidric 1:10	15,7±0,8 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	17,9±0,9 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	901,4±8,7 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	1191,3±37,7 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imupurin hidric 1:100	13,3±0,8 P <sub>1-8</sub> =0,995 P <sub>2-8</sub> =0,023 P <sub>3-8</sub> =1,000	16,6±0,3 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	863,7±40,6 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	1104,4±37,7 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imupurin hidric 1:200	14,9±0,5 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =0,305 P <sub>3-9</sub> =1,000	20,9±1,1 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =0,683 P <sub>3-9</sub> =1,000	669,6±20,3 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	1020,3±63,8 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

La incubarea macrofagelor peritoneale cu dexametazona în concentrația de 1 μg/ml s-a constatat o creștere nesemnificativă a activității GR, iar la concentrația de 10 μg/ml o reducere a activității enzimei. Extractul hidro-alcoolic de imuheptin în diluția 1:10 a determinat o majorare a activității GR în macrofagele peritoneale de la 34,2±2,6 nM/s.L până la 45,7±3,0 nM/s.L (P> 0,05), dar nu a influențat-o în diluțiile 1:100 și 1:200. Extractul hidric de imuheptin a manifestat o tendință de micșorare a activității GR în diluțiile 1:10 și 1:100 și de majorare în diluția 1:200 (tab.3.2.3). Activitatea GR în macrofagele peritoneale incubate cu extractul hidro-alcoolic de imupurin s-a majorat neesențial la diluția de 1:10 și s-a redus nesemnificativ la diluțiile de 1:100 și 1:200. Extractul hidric de imupurin a manifestat o tendință de creștere a activității GR în diluțiile 1:10 și 1:100 și de micșorare în cea de 1:200 (tab.3.2.4).



**Tabelul 3.2.3. Influența imuheptinului asupra nivelului glutathionreductazei (GR), glutathionperoxidazei (GPO) și glutathion transferazei (GST) în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS**

Parametri	GR, nM/s.L	GR, nM/s.L	GPO, nM/s.L	GPO, nM/s.L	GST, nM/s.L	GST, nM/s.L
	X±DS					
Grupele testate	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	-LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	34,2±2,6	21,9±3,1 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,026	448,6±27,9	206,0±21,6 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,002	8,5±1,1	12,2±1,1 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,168
2. Dexametazonă 1μg/ml	36,2±1,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	26,8±1,1 P <sub>1-2</sub> =1,000	341,0±12,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	182,6±17,2 P <sub>1-2</sub> =1,000	7,4±0,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	7,6±0,9 P <sub>1-2</sub> =0,394
3. Dexametazonă 10μg/ml	29,3±1,4 P <sub>1-3</sub> =0,003	44,2±4,5 P <sub>1-3</sub> =1,000	453,7±6,5 P <sub>1-3</sub> =1,000	247,4±12,5 P <sub>1-3</sub> =1,000	5,7±0,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	10,2±1,1 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imuheptin hidro-alcoolic 1:10	45,7±3,0 P <sub>1-4</sub> =0,086 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,460	28,6±1,3 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	316,7±12,8 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	480,9±6,2 P <sub>1-4</sub> =0,009 P <sub>2-4</sub> =0,014 P <sub>3-4</sub> =1,000	11,5±1,9 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,949	14,0±1,6 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,198 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imuheptin hidro-alcoolic 1:100	34,8±2,6 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	27,9±1,1 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	201,5±8,5 P <sub>1-5</sub> =0,042 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,275	424,6±2,4 P <sub>1-5</sub> =0,313 P <sub>2-5</sub> =0,260 P <sub>3-5</sub> =1,000	8,1±1,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	10,6±0,9 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imuheptin hidro-alcoolic 1:200	35,7±1,0 P <sub>1-6</sub> =0,005 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	42,7±2,8 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =0,715 P <sub>3-6</sub> =1,000	154,3±8,1 P <sub>1-6</sub> =0,001 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =0,025	294,3±8,3 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	8,8±1,0 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	9,1±0,8 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imuheptin hidric 1:10	30,1±4,9 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	37,7±1,0 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	374,0±13,0 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	313,6±11,3 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	63,5±3,6 P <sub>1-7</sub> =0,046 P <sub>2-7</sub> =0,041 P <sub>3-7</sub> =0,006	54,6±4,2 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,013 P <sub>3-7</sub> =0,825
8. Imuheptin hidric 1:100	28,2±2,4 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	26,8±1,1 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =0,589	365,4±8,1 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	229,2±1,9 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	20,0±2,3 P <sub>1-8</sub> =0,164 P <sub>2-8</sub> =0,119 P <sub>3-8</sub> =0,02	15,3±2,3 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =0,084 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imuheptin hidric 1:200	41,2±1,8 P <sub>1-9</sub> =0,002 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,906	44,7±2,9 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =0,483 P <sub>3-9</sub> =1,000	276,1±8,7 P <sub>1-9</sub> =0,736 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	209,9±17,5 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	14,8±1,3 P <sub>1-9</sub> =0,547 P <sub>2-9</sub> =0,338 P <sub>3-9</sub> =0,066	13,2±0,7 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =0,304 P <sub>3-9</sub> =1,000

La stimularea macrofagelor peritoneale prin LPS s-a constatat o micșorare a activității GR de la la 34,2±2,6 nM/s.L până la 21,9±3,1 nM/s.L (P< 0,05). Dexametazona a determinat o anihilare a efectului LPS cu majorarea activității GR mai semnificativă la concentrația de 10 μg/ml (tab.3.2.3). Efect similar antiinflamatorului nesteroidian s-a determinat la incubarea macrofagelor peritoneale cu extractul hidro-alcoolic și hidric de imuheptin, îndeosebi în diluția 1:200. Extractul hidro-alcoolic și hidric de imupurin a demonstrat cea mai mare capacitate de intensificare a activității GR la stimularea macrofagelor cu LPS (tab.3.2.4). Analiza rezultatelor relatate sugerează, că antiinflamatorul steroidian și preparatele de origine entomologică restabilesc activitatea GR în macrofagele stimulate prin LPS, acțiune întreprătată spre menținerea

nivelului adecvat de GSH. Acțiunea dexametazonei în acest caz se datorează cel mai probabil acțiunii antiinflamatoare cu reducerea formării SRO și epuizarea GSH. Imuheptinul și, îndeosebi, imupurinul posibil pot contribui atât la reducerea procesului inflamator, cât și sinteza GSH *de novo* prin aportul lor de aminoacizi.

**Tabelul 3.2.4. Influența imupurinului asupra nivelului glutathionreductazei (GR), glutathionperoxidazei (GPO) și glutathion transferazei (GST) în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS**

Parametri	GR, nM/s.L	GR, nM/s.L	GPO, nM/s.L	GPO, nM/s.L	GST, nM/s.L	GST, nM/s.L
	X±DS					
Grupele testate	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	-LPS	+LPS <sup>#</sup>	-LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	34,2±2,6	21,9±3,1 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,013	448,6±27,9	206,0±21,6 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,001	8,5±1,1	12,2±1,1 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,130
2. Dexametazonă 1μg/ml	36,2±1,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	26,8±1,1 P <sub>1-2</sub> =1,000	341,0±12,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	182,6±17,2 P <sub>1-2</sub> =1,000	7,4±0,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	7,6±0,9 P <sub>1-2</sub> =0,293
3. Dexametazonă 10μg/ml	29,3±1,4 P <sub>1-3</sub> =1,000	44,2±4,5 P <sub>1-3</sub> =0,389	453,7±6,5 P <sub>1-3</sub> =1,000	247,4±12,5 P <sub>1-3</sub> =1,000	5,7±0,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	10,2±1,1 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imupurin hidro- alcoolic 1:10	46,7±3,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,752	47,7±2,0 P <sub>1-4</sub> =0,059 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	609,0±9,3 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	302,2±8,7 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,951 P <sub>3-4</sub> =1,000	9,8±1,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,352	16,3±1,7 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,021 P <sub>3-4</sub> =0,993
5. Imupurin hidro- alcoolic 1:100	30,2±2,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	53,3±1,7 P <sub>1-5</sub> =0,003 P <sub>2-5</sub> =0,260 P <sub>3-5</sub> =1,000	358,1±32,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	222,5±4,3 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	8,2±1,3 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	14,0±1,2 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,126 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imupurin hidro- alcoolic 1:200	26,3±0,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	53,6±7,0 P <sub>1-6</sub> =0,004 P <sub>2-6</sub> =0,305 P <sub>3-6</sub> =1,000	270,7±25,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	196,8±9,2 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	8,3±0,8 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	10,5±0,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imupurin hidric 1:10	37,5±1,5 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	51,7±2,0 P <sub>1-7</sub> =0,006 P <sub>2-7</sub> =0,396 P <sub>3-7</sub> =1,000	419,5±16,8 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	312,3±20,0 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,651 P <sub>3-7</sub> =1,000	9,4±1,1 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =0,780	15,7±1,9 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,031 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imupurin hidric 1:100	36,7±1,0 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	43,8±1,0 P <sub>1-8</sub> =0,669 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	293,0±15,9 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	203,2±6,4 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	7,4±1,3 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	12,4±0,6 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =0,750 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imupurin hidric 1:200	29,3±0,4 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	43,6±2,1 P <sub>1-9</sub> =0,595 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	188,6±6,3 P <sub>1-9</sub> =0,023 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,143	161,1±5,9 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,867	7,8±0,3 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	10,2±1,1 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

Dexametazona în macrofagele peritoneale a determinat o tendință de micșorare a activității GPO în concentrația de 1μg/ml fără a o influența în cea de 10 μg/ml. Extractul hidroalcoolic de imuheptin a determinat un nivel scăzut a activității GPO în macrofagele peritoneale, comparativ cu lotul control fără stimulare (448,6±27,9 nM/s.L) cu valori de 316,7±12,8 nM/s.L (P>0,05), 201,5±8,5 nM/s.L (P<0,05) și 154,3±8,1 nM/s.L (P<0,05) pentru diluțiile

1:10 și respectiv 1:100 și 1:200. O tendință de reducere a activității GPO a manifestat și extractul hidric de imuheptin (tab.3.2.3). Extractul hidro-alcoolic de imupurin în diluția 1:10 a crescut ne semnificativ activitatea GPO în macrofagele peritoneale, iar în diluțiile 1:100 și 1:200 o tendință de micșorare a activității enzimei. La incubarea macrofagelor peritoneale cu extractul hidric de imupurin s-a determinat o diminuare a activității GPO, mai semnificativă în diluția 1:200 (tab.3.2.4).

Stimularea macrofagelor peritoneale prin LPS a determinat o reducere a activității GPO de la  $448,6 \pm 27,9$  nM/s.L până la  $206,0 \pm 21,6$  nM/s.L ( $P < 0,05$ ). Dexametazona în concentrația de  $1 \mu\text{g/ml}$  a accentuat diminuarea activității GPO indusă de LPS, iar în cea de  $10 \mu\text{g/ml}$  a anihilat ne semnificativ efectul LPS. Extractul hidro-alcoolic de imuheptin în diluțiile 1:10 și 1:100 a restabilit activitatea GPO la nivelul macrofagelor intacte, iar extractul hidric a manifestat o tendință de creștere a activității enzimei în diluția de 1:10 (tab.3.2.3). Extractul hidro-alcoolic și hidric de imupurin a anihilat efectul LPS de reducere a activității GPO în macrofagele peritoneale (tab.3.2.4).

Dexametazona a determinat o reducere ne semnificativă a activității GST în macrofagele peritoneale mai accentuată în concentrația de  $10 \mu\text{g/ml}$ . La incubarea macrofagelor peritoneale cu extractul hidro-alcoolic și hidric de imuheptin în diluția de 1:10 s-a constatat o tendință de majorare a activității GST. Extractul hidric de imuheptin în diluțiile 1:10 și 1:100 a determinat o majorare semnificativă a activității GST (tab.3.2.3). Efect similar s-a constatat și la incubarea macrofagelor peritoneale cu extractul hidro-alcoolic și hidric de imupurin în diluțiile 1:10 (tab.3.2.4).

La stimularea macrofagelor peritoneale cu LPS s-a determinat o majorare a activității GST de la  $8,5 \pm 1,1$  nM/s.L până la  $12,2 \pm 1,1$  nM/s.L ( $P > 0,05$ ). Dexametazona a manifestat o tendință de micșorare a activității GST indusă de LPS, îndeosebi în concentrația de  $1 \mu\text{g/ml}$  (tab.3.2.). La incubarea macrofagelor peritoneale stimulate prin LPS cu extractul hidro-alcoolic de imuheptin s-a constatat o tendință de majorare a activității GST în diluția de 1:10 și de micșorarea în diluțiile 1:100 și 1:200. Extractul hidric de imuheptin a determinat o creștere a activității GST mai accentuată în diluția de 1:10 (tab.3.2.3). La incubarea macrofagelor peritoneale stimulate prin LPS cu extractul hidro-alcoolic și hidric de imupurin o majorare ne semnificativă a activității GST s-a constatat la diluțiile de 1:10, iar în diluțiile de 1:200 o tendință de reducere a activității enzimei (tab.3.2.4).

Analiza activității enzimelor sistemului glutationic a demonstrat, că inflamația indusă prin LPS a micșorat activitatea GPO și GR cu o creștere ne semnificativă a GST, ce denotă despre diminuarea capacității de a menține nivelul de GSH și neutralizare a peroxizilor cu

intensificarea utilizării a GSH pentru procesele de detoxifiere. Antiinflamatorul steroidian, îndeosebi în concentrația de 10 $\mu$ g/ml, a restabilit capacitatea de a normaliza nivelul GSH prin creșterea activității GR, de a intensifica neutralizarea peroxizilor prin majorare moderată a activității GPO și cu o diminuare a proceselor de utilizare a GSH pentru conjugarea compușilor organici electrofili. Aceste efecte, cel mai probabil, sunt determinate de acțiunea antiinflamatoare a dexametazonei prin inhibarea cascadei acidului arahidonic cu reducerea formării mediatorilor inflamației și generarea SRO. Preparatele de origine entomologică au manifestat efecte similare dexametazonei sau chiar mai intense, posibil, datorită diminuării formării citokinelor proinflamatorii și grație aportului de substrat (aminoacizi, polipeptide etc.) ce contribuie la restabilirea activității enzimelor sistemului glutatonic.

La administrarea dexametazonei s-a constatat o tendință de micșorare a nivelului AGE pentosidine, îndeosebi la concentrația de 1 $\mu$ g/ml. La suplimentarea *in vitro* cu extract hidro-alcoolic și hidric de imuheptin s-a determinat o majorare ne semnificativă a nivelului AGE pentosidine în diluția 1:10 și o micșorare de 2-3 ori în diluțiile 1:100 și 1:200 (tab.3.2.5.) La incubarea macrofagelor peritoneale cu LPS s-a depistat o diminuare a AGE pentosidine de la 478,7 $\pm$ 80,0  $\mu$ M/s.L până la 449,5 $\pm$ 32,2  $\mu$ M/s.L ( $P_1 > 0,05$ ). Dexametazona în concentrația de 1 $\mu$ g/ml a determinat o reducere a AGE pentosidine de la 449,5 $\pm$ 32,2  $\mu$ M/s.L până la 352,3 $\pm$ 2,5  $\mu$ M/s.L ( $P_{1-2} > 0,05$ ), în timp ce în concentrația de 10  $\mu$ g/ml nivelul AGE a fost similar cu cel în lotul de control fără LPS. Extractul hidro-alcoolic și hidric de imuheptin în diluțiile cercetate a determinat o tendință de micșorare a nivelului AGE pentosidine direct proporțional diluției (tab.3.2.5).

La determinarea nivelului PPOA fără stimularea cu LPS s-a constatat, că dexametazona și extractele hidro-alcoolic și hidric de imuheptin manifestau o tendință de creștere a parametrului (tab.3.2.5.). La tratamentul macrofagelor peritoneale cu LPS s-a determinat o majorare a nivelului PPOA de la 7,8 $\pm$ 1,1  $\mu$ M/L până la 23,1 $\pm$ 2,4  $\mu$ M/L ( $P_1 < 0,05$ ). Suplimentarea dexametazonei în mediul macrofagelor stimulate cu LPS a determinat o micșorare neesențială a nivelului PPOA. Extractul hidro-alcoolic și hidric de imuheptin în diluțiile cercetate, suplimentat la macrofagele stimulate prin LPS, a contribuit la reducerea de circa 2 ori a nivelului PPOA (tab.3.2.5.).

**Tabelul 3.2.5 Influența imuheptinului asupra AGEs și PPOA în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS**

Parametri	AGE, $\mu\text{M/s.L}$ Pentosidine	AGE, $\mu\text{M/s.L}$ Pentosidine	PPOA, $\mu\text{M/L}$	PPOA, $\mu\text{M/L}$
	X $\pm$ DS			
Grupele testate	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	478,7 $\pm$ 80,0	449,5 $\pm$ 32,2 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	7,8 $\pm$ 1,1	23,1 $\pm$ 2,4 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,000
2. Dexameta-zonă 1 $\mu\text{g/ml}$	263,4 $\pm$ 2,1 P <sub>1-2</sub> =0,736	352,3 $\pm$ 2,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	8,5 $\pm$ 1,4 P <sub>1-2</sub> =1,000	19,9 $\pm$ 0,2 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10 $\mu\text{g/ml}$	434,7 $\pm$ 8,6 P <sub>1-3</sub> =1,000	481,6 $\pm$ 41,8 P <sub>1-3</sub> =1,000	9,7 $\pm$ 0,6 P <sub>1-3</sub> =1,000	20,8 $\pm$ 0,6 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imuheptin hidro-alcoolic 1:10	529,8 $\pm$ 27,6 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,322 P <sub>3-4</sub> =1,000	409,6 $\pm$ 14,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	12,0 $\pm$ 0,2 P <sub>1-4</sub> =0,220 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	13,0 $\pm$ 0,7 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imuheptin hidro-alcoolic 1:100	371,5 $\pm$ 32,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	304,0 $\pm$ 13,6 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,868	11,0 $\pm$ 0,1 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	12,8 $\pm$ 0,1 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imuheptin hidro-alcoolic 1:200	175,2 $\pm$ 29,5 P <sub>1-6</sub> =0,095 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	213,8 $\pm$ 0,5 P <sub>1-6</sub> =0,035 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =0,052	10,2 $\pm$ 1,0 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	12,3 $\pm$ 0,4 P <sub>1-6</sub> =0,631 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imuheptin hidric 1:10	748,3 $\pm$ 12,0 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,052 P <sub>3-7</sub> =1,000	375,1 $\pm$ 40,9 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	11,8 $\pm$ 0,5 P <sub>1-7</sub> =0,250 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	12,8 $\pm$ 0,6 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imuheptin hidric 1:100	394,4 $\pm$ 6,7 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	281,3 $\pm$ 14,9 P <sub>1-8</sub> =0,438 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =0,417	10,7 $\pm$ 1,5 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	10,7 $\pm$ 0,5 P <sub>1-8</sub> =0,073 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imuheptin hidric 1:200	195,3 $\pm$ 11,9 P <sub>1-9</sub> =0,188 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	247,6 $\pm$ 18,9 P <sub>1-9</sub> =0,137 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,160	8,4 $\pm$ 0,6 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	11,2 $\pm$ 1,2 P <sub>1-9</sub> =0,192 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

La incubarea macrofagelor peritoneale cu extractul hidro-alcoolic și hidric de imupurin în diluția 1:10 s-a constatat o tendință de majorare a nivelului AGE pentosidine, în timp ce diluțiile 1:100 și 1:200 o micșorare neesențială a acestuia (tab.3.2.6.). La incubarea macrofagelor stimulate prin LPS cu extractul hidro-alcoolic de imupurin s-a determinat o diminuare a nivelului AGE pentosidine, statistic veridic la diluția de 1:200. Extractul hidric de imupurin a manifestat aceeași tendință de micșorare a nivelului AGE pentosidine în diluțiile cercetate.

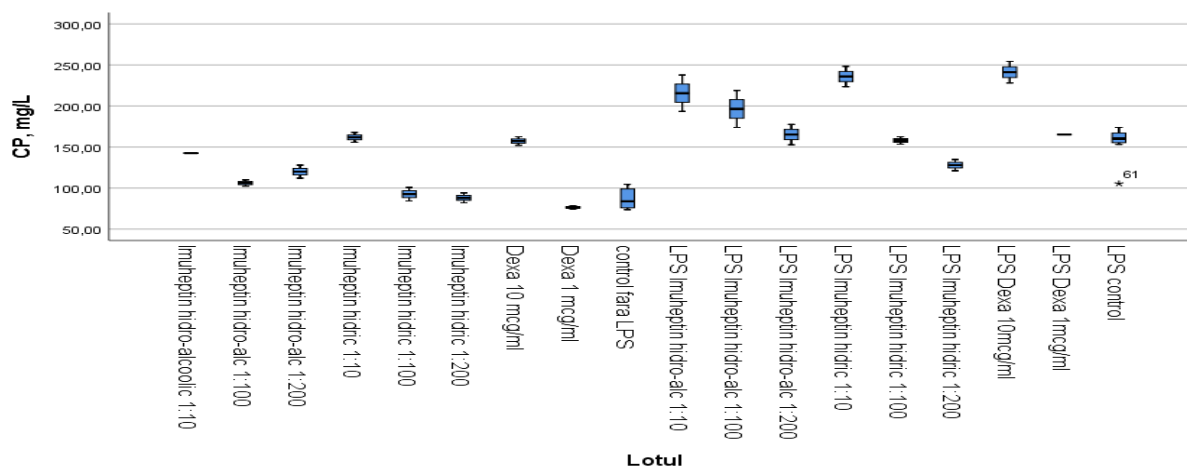
Extractul hidro-alcoolic și hidric de imupurin în diluțiile cercetate la incubarea cu macrofagele peritoneale a determinat o tendință de creștere a nivelului PPOA (tab.3.2.6.). Nivelul PPOA în macrofagele stimulate prin LPS nu a fost practic influențat de extractul hidro-

alcoolic de imupurin, în timp ce extractul hidric în diluția 1:10 a determinat o majorare neesențială a acestuia.

**Tabelul 3.2.6. Influența imupurinelor asupra nivelului AGEs și PPOA în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS**

Parametri	AGE, $\mu\text{M/s.L}$ Pentosidine	AGE, $\mu\text{M/s.L}$ Pentosidine	PPOA, $\mu\text{M/L}$	PPOA, $\mu\text{M/L}$
	$X \pm DS$			
Grupele testate	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS
1. Control	478,7 $\pm$ 80,0	449,5 $\pm$ 32,2 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	7,8 $\pm$ 1,1	23,1 $\pm$ 2,4 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,000
2. Dexametazonă 1 $\mu\text{g/ml}$	263,4 $\pm$ 2,1 P <sub>1-2</sub> =0,445	352,3 $\pm$ 2,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	8,5 $\pm$ 1,3 P <sub>1-2</sub> =1,000	19,9 $\pm$ 0,2 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10 $\mu\text{g/ml}$	434,7 $\pm$ 8,6 P <sub>1-3</sub> =1,000	481,6 $\pm$ 41,8 P <sub>1-3</sub> =1,000	9,7 $\pm$ 0,6 P <sub>1-3</sub> =1,000	20,8 $\pm$ 0,6 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imupurin hidro- alcoolic 1:10	836,6 $\pm$ 20,8 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,019 P <sub>3-4</sub> =1,000	310,8 $\pm$ 12,3 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	12,6 $\pm$ 0,3 P <sub>1-4</sub> =0,393 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	24,0 $\pm$ 1,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imupurin hidro- alcoolic 1:100	360,8 $\pm$ 82,9 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	174,1 $\pm$ 9,8 P <sub>1-5</sub> =0,134 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,169	11,6 $\pm$ 0,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	22,4 $\pm$ 0,3 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imupurin hidro- alcoolic 1:200	281,4 $\pm$ 33,4 P <sub>1-6</sub> =0,898 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	129,1 $\pm$ 1,7 P <sub>1-6</sub> =0,037 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =0,059	9,8 $\pm$ 0,7 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	19,5 $\pm$ 0,3 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imupurin hidric 1:10	758,2 $\pm$ 5,9 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,059 P <sub>3-7</sub> =1,000	413,5 $\pm$ 35,5 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	13,4 $\pm$ 1,4 P <sub>1-7</sub> =0,303 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	32,6 $\pm$ 3,4 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,536 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imupurin hidric 1:100	413,9 $\pm$ 2,1 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	319,7 $\pm$ 15,5 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	10,5 $\pm$ 0,9 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	26,9 $\pm$ 2,8 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imupurin hidric 1:200	222,0 $\pm$ 42,9 P <sub>1-9</sub> =0,182 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	282,1 $\pm$ 14,9 P <sub>1-9</sub> =0,432 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,439	6,0 $\pm$ 1,0 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	19,4 $\pm$ 2,4 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

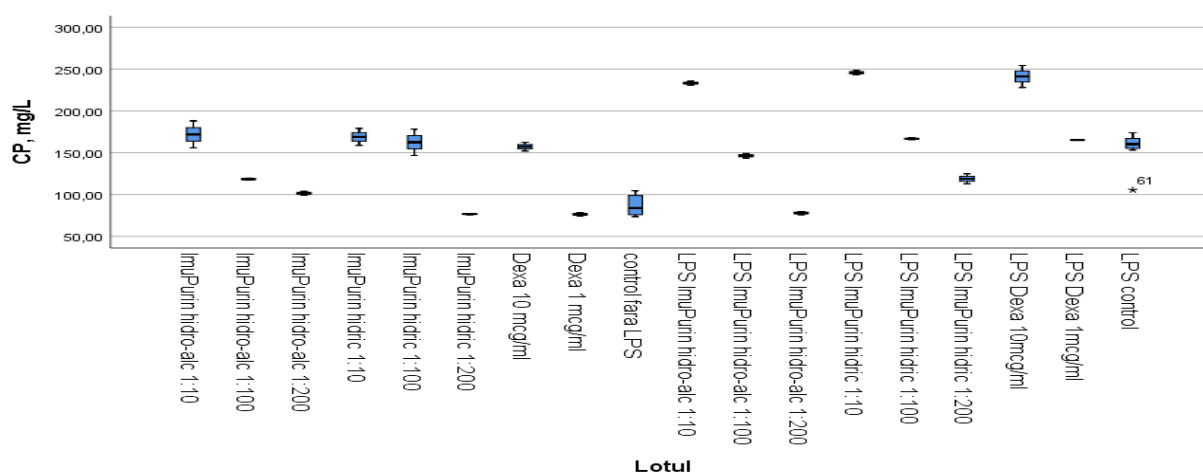
Dexametazona în concentrația de 1  $\mu\text{g/ml}$  a determinat o micșorare a conținutului ceruloplasminei de la de la 87,0 $\pm$ 12,5 mg/L până la 76,4 $\pm$ 1,9 mg/L ( $P > 0,05$ ), iar de 10  $\mu\text{g/ml}$  o majorare a nivelului ceruloplasminei de la 87,0 $\pm$ 12,5 mg/L până la 157,3 $\pm$ 5,3 mg/L ( $P > 0,05$ ). La incubarea macrofagelor peritoneale cu extractul hidro-alcoolic de imuheptin s-a constatat o majorare nesemnificativă a nivelului ceruloplasminei, iar extractul hidric de imuheptin a manifestat nivel crescut de CP în diluția 1:10 (anexa 7).



**Fig. 3.2.9. Influența imuheptinului asupra nivelului CP în macrofagele peritoneale în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Inducerea inflamației prin LPS în macrofagele peritoneale a determinat o majorare a nivelului ceruloplasminei de la  $87,0 \pm 12,5$  mg/L până la  $155,5 \pm 21,3$  mg/L ( $P > 0,05$ ). Dexametazona în concentrația de  $1 \mu\text{g/ml}$  practic nu a influențat creșterea ceruloplasminei, indusă de LPS, iar în concentrația de  $10 \mu\text{g/ml}$  a determinat o majorare de la  $155,5 \pm 21,3$  mg/L până la  $241,2 \pm 13,2$  mg/L ( $P > 0,05$ ). Extractul hidro-alcoolic de imuheptin a determinat o majorare neesențială a nivelului ceruloplasminei în macrofagele peritoneale proporțională diluției, iar extractul hidric a manifestat același efect în diluția de 1:10 (anexa 7, fig. 3.2.9.).

La incubarea macrofagelor peritoneale stimulate prin LPS cu extractul hidro-alcoolic de imupurin, diluția 1:10 a cauzat o majorare a ceruloplasminei de la  $155,5 \pm 21,3$  mg/L până la  $233,3 \pm 2,3$  mg/L ( $P > 0,05$ ), iar diluția 1:200 o micșorare a parametrului de la  $155,5 \pm 21,3$  mg/L până la  $77,9 \pm 1,9$  mg/L ( $P > 0,05$ ). Efect similar s-a constatat și la incubarea macrofagelor peritoneale cu extractul hidric de imupurin (anexa 7, tab.3.2.10).



**Fig. 3.2.10. Influența imupurinului asupra nivelului CP în macrofagele peritoneale în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Pentru aprecierea intensității stresului oxidativ, cât și pentru a determina influența preparatelor cercetate asupra homeostaziei tiol-disulfurice s-a determinat nivelul tiolului liber și total, raportul tiol liber/tiol total, nivelul disulfurilor și raportului disulfuri/tiol liber și disulfuri tiol/total.

**Tabelul 3.2.7. Influența imuheptinului asupra tiolilor și raportului SH-liber/SH-total în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Grupele de animale	SH-liber, $\mu\text{M/L}$	SH-liber, $\mu\text{M/L}$	SH-total, $\mu\text{M/L}$	SH-total, $\mu\text{M/L}$	SH-liber/SH-total, %	SH-liber/SH-total, %
	X $\pm$ DS					
	-LPS	+LPS <sup>#</sup>	-LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	50,7 $\pm$ 2,6	52,9 $\pm$ 8,8 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	58,4 $\pm$ 3,7	65,8 $\pm$ 4,8 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =0,321	87,0 $\pm$ 5,6	80,3 $\pm$ 11,8 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000
2. Dexametazonă 1 $\mu\text{g/ml}$	50,7 $\pm$ 0,8 P <sub>1-2</sub> =1,000	50,3 $\pm$ 1,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	61,6 $\pm$ 2,6 P <sub>1-2</sub> =1,000	59,7 $\pm$ 0,8 P <sub>1-2</sub> =1,000	82,4 $\pm$ 4,7 P <sub>1-2</sub> =1,000	84,2 $\pm$ 2,1 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10 $\mu\text{g/ml}$	52,6 $\pm$ 1,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	54,4 $\pm$ 1,6 P <sub>1-3</sub> =1,000	58,6 $\pm$ 0,4 P <sub>1-3</sub> =1,000	63,8 $\pm$ 3,4 P <sub>1-3</sub> =1,000	89,7 $\pm$ 3,8 P <sub>1-3</sub> =1,000	85,4 $\pm$ 2,2 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imuheptin hidro-alcoolic 1:10	67,2 $\pm$ 12,1 P <sub>1-4</sub> =0,562 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	52,2 $\pm$ 1,5 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	77,4 $\pm$ 7,9 P <sub>1-4</sub> =0,097 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,246	60,1 $\pm$ 1,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	86,4 $\pm$ 6,8 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	86,9 $\pm$ 4,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imuheptin hidro-alcoolic 1:100	72,1 $\pm$ 4,9 P <sub>1-5</sub> =0,147 P <sub>2-5</sub> =0,507 P <sub>3-5</sub> =1,000	48,1 $\pm$ 1,2 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	78,1 $\pm$ 2,7 P <sub>1-5</sub> =0,045 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,141	56,0 $\pm$ 6,1 P <sub>1-5</sub> =0,762 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	92,2 $\pm$ 3,2 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	86,4 $\pm$ 7,3 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imuheptin hidro-alcoolic 1:200	72,1 $\pm$ 2,7 P <sub>1-6</sub> =0,097 P <sub>2-6</sub> =0,374 P <sub>3-6</sub> =1,000	51,4 $\pm$ 2,3 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	74,4 $\pm$ 1,9 P <sub>1-6</sub> =0,243 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =0,508	59,3 $\pm$ 1,2 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	97,0 $\pm$ 1,1 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =0,322 P <sub>3-6</sub> =1,000	86,7 $\pm$ 2,2 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imuheptin hidric 1:10	68,1 $\pm$ 1,8 P <sub>1-7</sub> =0,469 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	53,3 $\pm$ 4,2 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	71,7 $\pm$ 3,8 P <sub>1-7</sub> =0,691 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	78,9 $\pm$ 5,7 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	95,0 $\pm$ 2,7 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	67,6 $\pm$ 0,5 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imuheptin hidric 1:100	54,9 $\pm$ 1,3 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	51,4 $\pm$ 1,5 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	58,6 $\pm$ 2,6 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	69,1 $\pm$ 4,9 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =0,533 P <sub>3-8</sub> =1,000	93,8 $\pm$ 3,8 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	74,8 $\pm$ 7,5 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imuheptin hidric 1:200	49,9 $\pm$ 3,8 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	53,2 $\pm$ 1,9 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	57,1 $\pm$ 4,9 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	62,5 $\pm$ 4,8 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	87,6 $\pm$ 0,9 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	85,6 $\pm$ 8,6 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

La expunerea macrofagelor peritoneale la dexametazonă în concentrația de 1 $\mu\text{g/ml}$  nu s-a modificat esențial nivelul SH-liber cu o tendință de majorare a SH-total. În aceste condiții raportul SH-liber/SH-total s-a redus de la 87,0 $\pm$ 5,6% la 82,4 $\pm$ 4,7% (P>0,05). La concentrația de



10 µg/ml dexametazona a majorat neesenificativ nivelul SH-liber fără a modifica cel al SH-total cu o creştere a raportului SH-liber/SH-total de la 87,0±5,6% la 89,7±3,8% (P>0,05). Astfel, dexametazona a majorat neesenţial potenţialul antioxidant al macrofagelor peritoneale.

Extractul hidro-alcoolic de imuheptin în diluţiile studiate a determinat o tendinţă de majorarea a nivelului SH-total şi SH-liber şi raportului SH-liber/SH-total, iar extractul hidric de imupurin a demonstrat acest efect în diluţia 1:10 (tab. 3.2.7). Extractul hidro-alcoolic de imupurin în diluţiile 1:10 şi 1:100 în macrofagele nestimulate prin LPS a manifestat o tendinţă de majorarea a conţinutul SH-total şi SH-liber şi raportului SH-liber/SH-total, iar cel hidric a manifestat o tendinţă de micşorare a nivelului tiolilor, iar în diluţia 1:10 şi a raportului SH-liber/SH-total (tab.3.2.8). În baza celor relatate putem presupune, că preparatele entomologice au crescut neesenţial potenţialul antioxidant prin conţinutul de proteine şi aminoacizi, inclusiv cisteină, metionină etc.

Stimularea macrofagelor peritoneale prin LPS a determinat o creştere neesenificativă a conţinutului SH-total şi SH-liber cu o diminuare a raportului SH-liber/SH-total de la 87,0±5,6% la 80,3±11,8% (P>0,05). Posibil, aceste date relevă despre dezvoltarea stresului oxidativ cu reducerea neesenificativă a utilizării tiolilor. Dexametazona în concentraţia 1µg/ml în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS a diminuat neesenţial nivelul SH-total şi SH-liber similar cu macrofagele fără stimulare prin LPS cu o majorarea a raportului SH-liber/SH-total de la 80,3±11,8% la 84,2±2,1% (P>0,05). Antiinflamatorul steroidian în concentraţia de 10 µg/ml nu a influenţat semnificativ conţinutul tiolului total şi liber în comparaţie cu lotul de control, dar a crescut raportul SH-liber/SH-total de la 80,3±11,8% la 85,4±2,2% (P>0,05). În aceste condiţii dexametazona, prin acţiunea antiinflamatoare a diminuat stresul oxidativ relevat prin intensificarea utilizării tiolilor. Diluţiile cercetate ale extractului hidro-alcoolic de imuheptin la stimularea macrofagelor prin LPS a redus conţinutul SH-total şi SH-liber practic la nivelul macrofagelor nestimulate prin LPS cu o majorare a raportului SH-liber/SH-total de la 80,3±11,8% la 86,9±4,0%, 86,4±7,3% şi 86,7±2,2% (P>0,05).

Extractul hidric de imuheptin în macrofagele stimulate prin LPS nu a modificat esenţial nivelul SH-liber şi l-a majorat neesenificativ pe cel al SH-total la diluţiile 1:10 şi 1:100 (tab.3.2.7). Diluţiile extractului hidro-alcoolic al preparatului entomologic au determinat o tendinţă de reducere a nivelului tiolilor în macrofagele stimulate prin LPS cu o creştere neesenificativă a raportului SH-liber/SH-total. Extractul hidric de imupurin nu a influenţat conţinutul SH-liber, cu excepţia diluţiei 1:200, şi a manifestat o tendinţă de al micşora pe cel al SH-total, ce a determinat o majorare cu circa 4,5-12,4 % a raportului SH-liber/SH-total

(tab.3.2.8). Astfel, putem conchide, că preparatele entomologice au activat utilizarea tiolilor în macrofagele stimulate prin LPS cu neutralizarea stresului oxidativ.

**Tabelul 3.2.8. Influența imupurinelor asupra tiolilor și raportului SH-liber/SH-total în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Grupele de animale	SH-liber, $\mu\text{M/L}$	SH-liber, $\mu\text{M/L}$	SH-total, $\mu\text{M/L}$	SH-total, $\mu\text{M/L}$	SH-liber/SH-total, %	SH-liber/SH-total, %
	X $\pm$ DS					
	-LPS	+LPS <sup>#</sup>	-LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	50,7 $\pm$ 2,6	52,9 $\pm$ 8,8 P <sub>1-2</sub> =1,000	58,4 $\pm$ 3,7	65,8 $\pm$ 4,8 P <sub>1-2</sub> =0,257	87,0 $\pm$ 5,6	80,3 $\pm$ 11,8 P <sub>1-2</sub> =1,000
2. Dexametazonă 1 $\mu\text{g/ml}$	50,7 $\pm$ 0,8 P <sub>1-2</sub> =1,000	50,3 $\pm$ 1,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	61,6 $\pm$ 2,6 P <sub>1-2</sub> =1,000	59,7 $\pm$ 0,8 P <sub>1-2</sub> =0,257	82,4 $\pm$ 4,7 P <sub>1-2</sub> =1,000	84,2 $\pm$ 2,1 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10 $\mu\text{g/ml}$	52,6 $\pm$ 1,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	54,4 $\pm$ 1,6 P <sub>1-3</sub> =1,000	58,6 $\pm$ 0,4 P <sub>1-3</sub> =1,000	63,8 $\pm$ 3,4 P <sub>1-3</sub> =1,000	89,7 $\pm$ 3,8 P <sub>1-3</sub> =1,000	85,4 $\pm$ 2,2 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imupurin hidro-alcoolic 1:10	53,2 $\pm$ 1,7 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	49,9 $\pm$ 0,8 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	60,4 $\pm$ 1,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	60,1 $\pm$ 0,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	88,2 $\pm$ 3,0 P <sub>1-4</sub> =0,576 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	83,1 $\pm$ 0,7 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imupurin hidro-alcoolic 1:100	52,6 $\pm$ 0,4 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	50,7 $\pm$ 1,0 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	59,7 $\pm$ 0,8 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	61,2 $\pm$ 1,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	88,0 $\pm$ 1,8 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	82,9 $\pm$ 0,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imupurin hidro-alcoolic 1:200	49,6 $\pm$ 4,2 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	51,8 $\pm$ 2,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	61,2 $\pm$ 1,5 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	63,5 $\pm$ 1,5 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	80,9 $\pm$ 4,8 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	81,6 $\pm$ 2,2 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imupurin hidric 1:10	49,2 $\pm$ 0,8 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	53,3 $\pm$ 0,4 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	60,1 $\pm$ 1,1 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	63,1 $\pm$ 0,4 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	81,9 $\pm$ 0,3 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	84,5 $\pm$ 1,1 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imupurin hidric 1:100	46,6 $\pm$ 6,4 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	52,1 $\pm$ 1,5 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	51,8 $\pm$ 7,2 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	62,0 $\pm$ 2,3 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	89,8 $\pm$ 0,1 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	84,2 $\pm$ 0,7 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imupurin hidric 1:200	49,2 $\pm$ 2,3 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	57,9 $\pm$ 1,7 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	55,6 $\pm$ 2,7 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	62,7 $\pm$ 1,5 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	88,5 $\pm$ 0,1 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	92,4 $\pm$ 4,9 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

Dexametazona în concentrația 1 $\mu\text{g/ml}$  a manifestat o tentință de a majora nivelul disulfurilor (SS) de la 3,9 $\pm$ 1,8  $\mu\text{M/L}$  până la 5,5 $\pm$ 1,7  $\mu\text{M/L}$  ( $P>0,05$ ) și raportului SS/SH-liber de la 7,7 $\pm$ 3,7% până la 10,8 $\pm$ 3,5% ( $P>0,05$ ) și SS/SH-total de la 6,5 $\pm$ 2,8% până la 8,8 $\pm$ 2,4% ( $P>0,05$ ). Antiinflamatorul steroidian în concentrația 10 $\mu\text{g/ml}$  a manifestat efect opus relevant prin tendința de a micșora indicii respectivi (tab.3.2.7). Aceste date ne sugerează, ca

dexametazona în concentrația de 1μg/ml a activat neesențial sistemul prooxidant, iar în cea de 10μg/ml a diminuat activitatea sistemului prooxidant. Extractul hidro-alcoolic de imuheptin în diluția 1:10 a determinat o creștere neesențială a nivelului disulfurilor și raportului SS/SH-liber și SS/SH-total, iar în diluțiile 1:100 și 1:200 o micșorare neesențială a indicilor cercetați. Extractul hidric de imuheptin, îndeosebi în diluțiile 1:10 și 1:100 a redus conținutul disulfurilor și raportul SS/SH-liber și SS/SH-total (tab.3.2.7). Extractul hidro-alcoolic de imupurin în diluția 1:10 și 1:100 a determinat o diminuare a nivelului disulfurilor și raportului SS/SH-liber și SS/SH-total, iar în diluția 1:200 o tendință de majorarea a indicilor respectivi. Extractul hidric de imupurin în diluția 1:10 a manifestat o tendință de majorare, iar în diluțiile 1:100 și 1:200 de micșorare a conținutului disulfurilor și raportului SS/SH-liber și SS/SH-total (tab.3.2.8). În baza datelor relatate putem conchide, că preparatele entomologice în diluțiile 1:100 și 1:200 au redus neesențial activitatea sistemului prooxidant.

Stimularea macrofagelor peritoneale prin LPS a determinat o creștere a nivelului disulfurilor de la  $3,9 \pm 1,8 \mu\text{M/L}$  până la  $6,5 \pm 3,8 \mu\text{M/L}$  ( $P > 0,05$ ), procentul raportului SS/SH-liber de la  $7,7 \pm 3,7\%$  până la  $13,5 \pm 9,6\%$  ( $P > 0,05$ ) și SS/SH-total de la  $6,5 \pm 2,8\%$  până la  $9,8 \pm 5,9\%$  ( $P > 0,05$ ). Aceste date denotă despre creșterea activității sistemului prooxidant. Dexametazona în concentrația 1μg/ml în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS a diminuat neesențial nivelul disulfurilor de la  $6,5 \pm 3,8 \mu\text{M/L}$  până la  $4,7 \pm 0,5 \mu\text{M/L}$  ( $P > 0,05$ ), procentul raportului SS/SH-liber de la  $13,5 \pm 9,6\%$  până la  $9,4 \pm 1,5\%$  ( $P > 0,05$ ) și SS/SH-total de la  $9,8 \pm 5,9\%$  până la  $7,9 \pm 1,1\%$  ( $P > 0,05$ ). Efect similar a fost constatat și la administrarea antiinflamatorului steroidian în concentrația de 10 μg/ml (tab.3.2.7). Aceste date ne sugerează, că dexametazona poate diminua activitatea sistemului prooxidant. Diluțiile cercetate ale extractului hidro-alcoolic de imuheptin la stimularea macrofagelor prin LPS a redus conținutul disulfurilor și procentul raportului SS/SH-liber și SS/SH-total practic la nivelul macrofagelor nestimulate prin LPS. Extractul hidric de imuheptin în diluțiile 1:10 și 1:100 în macrofagele stimulate prin LPS a crescut neesențial nivelul disulfurilor și procentul raportului SS/SH-liber și SS/SH-total, iar în diluția 1:200 a manifestat o tendință de reducere a indicilor studiați (tab.3.2.7). Extractul hidro-alcoolic și hidric în diluțiile cercetate a demonstrat o tendință de micșorare a conținutului disulfurilor și procentul raportului SS/SH-liber și SS/SH-total în macrofage stimulate prin LPS (tab.3.2.8). Datele relatate ne relevă, că imupurinul, extractele hidro-alcoolic și hidric, și imuheptinul, extractul hidro-alcoolic, au determinat reducerea activității sistemului prooxidant. Acest efect, posibil, poate fi determinat de componența proteică și aminoacidică a preparatelor, precum și de extragentul folosit.

**Tabelul 3.2.9. Influența imuheptinului asupra homeostaziei tiol-disulfurice în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Grupele de animale	Disulfuri, $\mu\text{M/L}$	Disulfuri, $\mu\text{M/L}$	Raport disulfuri/SH-liber, %	Raport disulfuri/SH-liber, %	Raport disulfuri/SH-total, %	Raport disulfuri/SH-total, %
	X $\pm$ DS					
	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	3,9 $\pm$ 1,8	6,5 $\pm$ 3,8 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	7,7 $\pm$ 3,7	13,5 $\pm$ 9,6 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	6,5 $\pm$ 2,8	9,8 $\pm$ 5,9 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000
2. Dexametazonă 1 $\mu\text{g/ml}$	5,5 $\pm$ 1,7 P <sub>1-2</sub> =1,000	4,7 $\pm$ 0,6 P <sub>1-2</sub> =1,000	10,8 $\pm$ 3,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	9,4 $\pm$ 1,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	8,8 $\pm$ 2,4 P <sub>1-2</sub> =1,000	7,9 $\pm$ 1,1 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10 $\mu\text{g/ml}$	3,0 $\pm$ 1,1 P <sub>1-3</sub> =1,000	4,7 $\pm$ 0,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	5,8 $\pm$ 2,4 P <sub>1-3</sub> =1,000	8,6 $\pm$ 1,5 P <sub>1-3</sub> =1,000	5,1 $\pm$ 1,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	7,3 $\pm$ 1,1 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imuheptin hidro-alcoolic 1:10	5,1 $\pm$ 2,1 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	3,9 $\pm$ 1,3 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	8,1 $\pm$ 4,6 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	7,6 $\pm$ 2,6 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	6,8 $\pm$ 3,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	6,5 $\pm$ 2,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imuheptin hidro-alcoolic 1:100	3,0 $\pm$ 1,1 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	3,9 $\pm$ 2,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	4,3 $\pm$ 1,9 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	8,1 $\pm$ 4,9 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	3,9 $\pm$ 1,6 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	6,8 $\pm$ 3,7 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imuheptin hidro-alcoolic 1:200	1,1 $\pm$ 0,4 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =0,474 P <sub>3-6</sub> =1,000	3,9 $\pm$ 0,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	1,6 $\pm$ 0,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =0,339 P <sub>3-6</sub> =1,000	7,7 $\pm$ 1,5 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	1,5 $\pm$ 0,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =0,322 P <sub>3-6</sub> =1,000	6,7 $\pm$ 1,1 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imuheptin hidric 1:10	1,8 $\pm$ 1,0 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	12,8 $\pm$ 0,8 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	2,7 $\pm$ 1,5 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,954 P <sub>3-7</sub> =1,000	24,0 $\pm$ 0,5 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	2,5 $\pm$ 1,3 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	16,2 $\pm$ 0,2 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imuheptin hidric 1:100	1,8 $\pm$ 1,3 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	8,8 $\pm$ 3,2 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	3,3 $\pm$ 2,2 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	17,3 $\pm$ 6,7 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	3,1 $\pm$ 1,9 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	12,6 $\pm$ 3,8 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imuheptin hidric 1:200	3,6 $\pm$ 0,6 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	4,6 $\pm$ 3,2 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	7,1 $\pm$ 0,6 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	8,9 $\pm$ 6,3 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	6,3 $\pm$ 0,5 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	7,2 $\pm$ 4,3 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

Analiza homeostaziei tiol-disulfurice a permis de a concluziona: dexametazona a manifestat tendința de a crește potențialul antioxidant și reducerea celui prooxidant; preparatele entomologice au crescut neesențial potențialul antioxidant prin conținutul lor de proteine și aminoacizi, inclusiv cisteină, metionină etc.; inflamația indusă prin LPS a determinat dezvoltarea stresului oxidativ cu reducerea ne semnificativă a utilizării tiolilor și creșterea activității sistemului prooxidant; dexametazona, prin acțiunea antiinflamatoare, a diminuat stresul oxidativ în macrofagele peritoneale, indus prin LPS, relevat prin intensificarea utilizării tiolilor și diminuarea activității sistemului prooxidant; preparatele entomologice în macrofagele stimulate

prin LPS au activat utilizarea tiolilor cu neutralizarea stresului oxidativ; extractele hidro-alcoolic și hidric, și imupentinul, extractul hidro-alcoolic, au determinat reducerea activității sistemului prooxidant.

**Tabelul 3.2.10. Influența imupurinelor asupra homeostaziei tiol-disulfurice în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Grupele de animale	Disulfuri, $\mu\text{M/L}$	Disulfuri, $\mu\text{M/L}$	Raport disulfuri/SH-liber, %	Raport disulfuri/SH-liber, %	Raport disulfuri/SH-total, %	Raport disulfuri/SH-total, %
	X $\pm$ DS					
	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	- LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	3,9 $\pm$ 1,8	6,5 $\pm$ 3,8 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	7,7 $\pm$ 3,7	13,5 $\pm$ 9,6 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	6,5 $\pm$ 2,8	9,8 $\pm$ 5,9 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000
2. Dexametazonă 1 $\mu\text{g/ml}$	5,5 $\pm$ 1,7 P <sub>1-2</sub> =1,000	4,7 $\pm$ 0,6 P <sub>1-2</sub> =1,000	10,8 $\pm$ 3,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	9,4 $\pm$ 1,5 P <sub>1-2</sub> =1,000	8,8 $\pm$ 2,4 P <sub>1-2</sub> =1,000	7,9 $\pm$ 1,1 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10 $\mu\text{g/ml}$	3,0 $\pm$ 1,1 P <sub>1-3</sub> =1,000	4,7 $\pm$ 0,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	5,8 $\pm$ 2,4 P <sub>1-3</sub> =1,000	8,6 $\pm$ 1,5 P <sub>1-3</sub> =1,000	5,1 $\pm$ 1,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	7,3 $\pm$ 1,1 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imupurin hidro-alcoolic 1:10	3,6 $\pm$ 1,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	5,1 $\pm$ 0,2 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	6,7 $\pm$ 2,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	10,2 $\pm$ 0,6 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	5,9 $\pm$ 1,5 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	8,4 $\pm$ 0,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imupurin hidro-alcoolic 1:100	3,6 $\pm$ 0,6 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	5,3 $\pm$ 0,3 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	6,8 $\pm$ 1,1 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	10,4 $\pm$ 0,4 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	6,0 $\pm$ 0,9 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	8,6 $\pm$ 0,3 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imupurin hidro-alcoolic 1:200	5,8 $\pm$ 1,3 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	5,8 $\pm$ 0,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	12,0 $\pm$ 3,7 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	11,3 $\pm$ 1,7 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	9,6 $\pm$ 2,4 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	9,2 $\pm$ 1,1 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imupurin hidric 1:10	5,5 $\pm$ 0,2 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	4,9 $\pm$ 0,4 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	11,1 $\pm$ 0,2 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	9,2 $\pm$ 0,8 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	9,1 $\pm$ 0,2 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	7,7 $\pm$ 0,6 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imupurin hidric 1:100	2,6 $\pm$ 0,4 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	4,9 $\pm$ 0,4 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	5,7 $\pm$ 0,1 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	9,4 $\pm$ 0,5 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	5,1 $\pm$ 0,0 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	7,9 $\pm$ 0,4 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imupurin hidric 1:200	3,2 $\pm$ 0,2 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	2,4 $\pm$ 1,6 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	6,5 $\pm$ 0,1 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	4,2 $\pm$ 2,9 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	5,8 $\pm$ 0,1 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	3,8 $\pm$ 2,4 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

Analiza rezultatelor respective au permis de a concluziona, că antiinflamatorul steroidian și, îndeosebi, preparatele entomologice pot majora capacitatea verigii neenzimatice a activității antioxidante și a rezistenței nespecifice.

Dexametazonă în concentrația de 1μg/ml a determinat o micșorarea neesențială a activității antioxidante totale (AAT) prin metoda ABTS în macrofagele peritoneale, iar în cea de 10μg/ml nu a influențat-o esențial (tab. 3.2.11.). Glucocorticoidul în ambele concentrații a redus neesențial AAT prin metoda CUPRAC. Extractul hidro-alcoolic de imuheptin în diluțiile examinate a micșorat neesențial AAT după ABTS și CUPRAC invers proporțional diluțiilor. Efect similar a fost constatat și în macrofagele peritoneale expuse acțiunii extractului hidric de imuheptin în diluțiile 1:100 și 1:200.

**Tabelul 3.2.11. Influența imuheptinului asupra activității antioxidante totale (după ABTS și CUPRAC) în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Parametri	AAT (după ABTS), μM/L	AAT (după ABTS), μM/L	AAT (după CUPRAC), mM/L	AAT (după CUPRAC), mM/L
	X±DS			
Grupele testate	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	-LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	628,7±30,6	633,8±21,9 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	0,5±0,09	0,64±0,2 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000
2. Dexametazonă 1μg/ml	587,5±1,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	569,9±0,4 P <sub>1-2</sub> =0,263	0,43±0,04 P <sub>1-2</sub> =1,000	0,7±0,07 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10μg/ml	630,4±0,8 P <sub>1-3</sub> =1,000	624,2±10,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	0,42±0,03 P <sub>1-3</sub> =1,000	0,9±0,02 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imuheptin hidro-alcoolic 1:10	578,0±18,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	648,7±5,1 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,306 P <sub>3-4</sub> =1,000	0,47±0,05 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	3,17±0,13 P <sub>1-4</sub> =0,460 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imuheptin hidro-alcoolic 1:100	508,6±33,5 P <sub>1-5</sub> =0,121 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,537	577,5±3,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	0,37±0,2 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	0,74±0,02 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imuheptin hidro-alcoolic 1:200	499,2±28,5 P <sub>1-6</sub> =0,079 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =0,397	572,6±1,6 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	0,36±0,03 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	0,45±0,08 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =0,394
7. Imuheptin hidric 1:10	635,1±7,8 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	671,1±16,5 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,025 P <sub>3-7</sub> =1,000	1,12±0,2 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,899 P <sub>3-7</sub> =0,710	2,38±0,6 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imuheptin hidric 1:100	609,5±7,0 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	572,2±1,2 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	0,4±0,07 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	0,8±0,1 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imuheptin hidric 1:200	545,5±1,9 P <sub>1-9</sub> =0,566 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	532,6±0,4 P <sub>1-9</sub> =0,077 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	0,36±0,03 P <sub>1-9</sub> =0,998 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	0,43±0,04 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,304

Expunerea macrofagelor peritoneale la acțiunea LPS s-a constatat o majorare a AAT de la  $628,7 \pm 30,6 \mu\text{M/L}$  până la  $633,8 \pm 21,9 \mu\text{M/L}$  ( $P_1 > 0,05$ ) prin metoda ABTS și de la  $0,5 \pm 0,09 \mu\text{M/L}$  până la  $0,64 \pm 0,2 \mu\text{M/L}$  ( $P_1 > 0,05$ ) prin metoda CUPRAC. Dexametazonă în concentrația de  $1 \mu\text{g/ml}$  a determinat o micșorare neesențială a AAT prin metoda ABTS în macrofagele peritoneale, iar în cea de  $10 \mu\text{g/ml}$  nu a influențat-o esențial (tab. 3.2.11.). Antiinflamatorul steroidian în ambele diluții a determinat o majorare neesențială, dar proporțională concentrației, a AAT după metoda CUPRAC (tab.3.2.11.). Extractul hidro-alcoolic și hidric de imuheptin în diluțiile 1:10 a contribuit la o majorare neesențială a AAT după metoda ABTS, iar în diluțiile de 1:100 și 1:200 o diminuare a AAT (tab.3.2.11.). La examinarea AAT după metoda CUPRAC s-a constatat o majorare de la  $0,64 \pm 0,2 \text{ mM/L}$  în lotul de control cu LPS până la  $3,17 \pm 0,13 \text{ mM/L}$  ( $P_{1-4} > 0,05$ ) în lotul cu extract hidro-alcoolic de imuheptin și  $2,38 \pm 0,6 \text{ mM/L}$  ( $P_{1-7} > 0,05$ ) în lotul cu extract hidric de imuheptin în diluția 1:10.

Extractul hidro-alcoolic de imupurin în diluția 1:10 a majorat neesențial AAT după ABTS, dar a micșorat-o neesențial invers proporțional diluțiilor 1:100 și 1:200. Efect similar a fost constatat și în macrofagele peritoneale expuse acțiunii extractului hidric de imupurin în diluțiile 1:100 și 1:200. Extractul hidro-alcoolic și hidric de imupurin în diluțiile 1:10 a contribuit la o majorare neesențială a AAT după metoda CUPRAC fără modificări esențiale în diluțiile de 1:100 și 1:200 (tab.3.2.12.).

La expunerea macrofagelor peritoneale la LPS extractul hidro-alcoolic de imupurin în diluția 1:10 nu a influențat AAT după metoda ABTS în comparație cu macrofagele expuse doar LPS, în timp ce în celelalte diluții preparatul entomologic a determinat o reducere a AAT. La examinarea AAT după metoda CUPRAC s-a constatat o majorare de la  $0,64 \pm 0,2 \text{ mM/L}$  în lotul de control cu LPS până la  $2,07 \pm 0,35 \text{ mM/L}$  ( $P_{1-4} > 0,05$ ) în lotul cu extract hidro-alcoolic de imupurin și  $1,12 \pm 0,13 \text{ mM/L}$  ( $P_{1-7} > 0,05$ ) în lotul cu extract hidric de imupurin în diluția 1:10. Extractul hidric de imupurin în diluțiile 1:100 și 1:200 a determinat o scădere a AAT după metoda CUPRAC comparativ cu extractul hidro-alcoolic de imupurin și față de lotul control LPS (tab.3.2.12.).

**Tabelul 3.2.12. Influența imupurinelor asupra capacității antioxidante totale (după ABTS și CUPRAC) în macrofagele peritoneale stimulate prin LPS**

Parametri	AAT (după ABTS), μM/L	AAT (după ABTS), μM/L	AAT (după CUPRAC), mM/L	AAT (după CUPRAC), mM/L
	X±DS			
Grupele testate	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	-LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	628,6±30,6	633,8±21,9 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000	0,5±0,09	0,64±0,2 P <sub>LPS-/LPS+</sub> =1,000
2. Dexametazonă 1μg/ml	587,5±1,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	569,9±0,4 P <sub>1-2</sub> =0,071	0,43±0,04 P <sub>1-2</sub> =1,000	0,7±0,07 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10μg/ml	630,4±0,8 P <sub>1-3</sub> =1,000	624,2±10,9 P <sub>1-3</sub> =1,000	0,42±0,03 P <sub>1-3</sub> =1,000	0,9±0,02 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imupurin hidroalcoolic 1:10	638,6±2,0 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,718 P <sub>3-4</sub> =1,000	632,4±9,8 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,652 P <sub>3-4</sub> =1,000	1,01±0,1 P <sub>1-4</sub> =0,554 P <sub>2-4</sub> =0,158 P <sub>3-4</sub> =0,100	2,07±0,35 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imupurin hidroalcoolic 1:100	624,2±7,0 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	584,4±3,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	0,51±0,03 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	0,73±0,13 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imupurin hidroalcoolic 1:200	601,0±3,9 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	569,5±0,8 P <sub>1-6</sub> =0,046 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	0,48±0,01 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	0,52±0,04 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imupurin hidric 1:10	662,8±0,4 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,032 P <sub>3-7</sub> =1,000	634,7±2,7 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,417 P <sub>3-7</sub> =1,000	0,68±0,1 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =0,904 P <sub>3-7</sub> =0,617	1,12±0,13 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imupurin hidric 1:100	616,4±5,5 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	593,7±18,1 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	0,42±0,02 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	0,44±0,01 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =0,509
9. Imupurin hidric 1:200	584,8±1,6 P <sub>1-9</sub> =0,680 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	577,2±6,2 P <sub>1-9</sub> =0,583 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	0,37±0,01 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	0,34±0,01 P <sub>1-9</sub> =0,718 P <sub>2-9</sub> =0,509 P <sub>3-9</sub> =0,075

### 3.3. Concluzii la capitolul 3.

1. Screening-ul *in vitro* a relevat, că extractele alcoolice și hidrice ale imuheptinului și imupurinelor au demonstrat o capacitate superioară unor antioxidanți și diclofenacului de a proteja eritrocitele de hemoliza oxidativă în funcție de diluție și timp, argument pentru inițierea studiului mai aprofundat a proprietăților antiinflamatoare.

2. Preparatele de origine entomologică au demonstrat o capacitate mai mare de reducere a radicalului ABTS în comparație cu antiinflamatorul nesteroidian, iar în concentrațiile 333,3



μg/ml chiar ceva mai superioară față de acidul ascorbic. Acest efect s-ar putea datora conținutului de antioxidanți hidrosolubili din extractele imupurinelor și imuheptinelor.

3. Extractul etanolic al imuheptinelor a determinat o majorare mai semnificativă a activității paraoxonazei/arilesterazei față de acidul ascorbic, diclofenac și trolox, iar cel hidric față de diclofenac. Extractul etanolic al imupurinelor a manifestat un efect similar antioxidanților de majorare a activității paraoxonazei/arilesterazei, în timp ce cel hidric a fost superior antioxidanților și diclofenacului.

4. Extractul hidric al imupurinelor față de cel etanolic a manifestat capacitate mai mare de protecție a hematiilor de hemoliza oxidativă și de reducere a radicalului ABTS, în timp ce extractul alcoolic și hidric al imuheptinelor a indus creșterea mai semnificativă a activității paraoxonazei/arilesterazei față de cele ale imupurinelor.

5. Imuheptinul și imupurinelor au demonstrat o capacitate mai mare de reducere a edemului urechii la șoricei în comparație cu lotul control, exprimată printr-o valoare mai mare a procentului de inhibiție.

6. Studiul screening a demonstrat, că imupurinelor și imuheptinul prin creșterea rezistenței hematiilor la hemoliza oxidativă, majorarea capacității de reducere a radicalului ABTS și intensificarea activității paraoxonazei/arilesterazei pot fi considerate ca preparate cu proprietăți antiinflamatoare și necesită un studiu mai aprofundat.

7. Imuheptinul, în comparație cu imupurinelor, în inflamația indusă prin LPS, a diminuat mai pronunțat nivelul citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) cu majorarea sau menținerea conținutului de citokine antiinflamatorii (IL-10). Capacitatea de reducere a nivelului IL-6 a fost similară cu cea a dexametazonei.

8. Preparatele de origine entomologică nu au modificat activitatea catalazei și SOD, conținutul DAM în macrofagele nestimulate cu LPS, dar au diminuat nivelul DAM și activitatea SOD în macrofagele stimulate prin LPS, ce denotă despre modularea produselor de peroxidare a lipidelor în condiții de inflamație.

9. Imupurinelor și imuheptinul, similar dexametazonei, au restabilit capacitatea macrofagelor de a normaliza nivelul glutatationului prin creșterea activității glutatation reductazei, de a intensifica neutralizarea peroxizilor prin majorarea activității glutatation peroxidazei și de a diminua procesele de utilizare a glutatationului prin conjugarea compușilor organici electrofili, posibil, prin reducerea formării citokinelor proinflamatorii și prin aportul de substrat (aminoacizi, polipeptide etc.), ce contribuie la restabilirea activității enzimelor sistemului glutatationic.

10. Preparatele de origine entomologică, ca și dexametazona, au diminuat stresul oxidativ, indus

de lipopolizaharide, prin intensificarea utilizării tiolilor (reducerea nivelului SH-total și SH- liber cu majorarea raportului SH-liber/SH-total) și diminuarea activității sistemului prooxidant (micșorarea conținutului disulfurilor, raportului procentual al SS/SH-liber și SS/SH-total). Prin urmare, preparatele de origine entomologică și dexametazona pot majora capacitatea verigii neenzimatice a activității antioxidante și rezistenței nespecifice prin ameliorarea indicilor homeostaziei tiol-disulfurice.

## 4. INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ ASUPRA INFLAMAȚIEI SUBACUTE

### 4.1. Acțiunea imuheptinului și imupurinelui asupra inflamației subacute induse de corp străin

La șobolani, după implantarea a 2 discuri de fetru, s-a constatat dezvoltarea unei inflamații subacute cu procese exudative și proliferative relevate prin majorarea masei discurilor. După extragerea discurilor cu granulomul format în jurul lor s-a constatat, că masa acestora a crescut semnificativ în toate loturile, ceea ce ne demonstrează despre dezvoltarea procesului inflamator. Astfel, masa granulomului umed în lotul control a constituit  $315,1 \pm 32,0$  mg (s-a majorat de 11,2 ori), în lotul cu dexametazonă  $196,1 \pm 10,0$  mg (de 7 ori), în lotul cu imuheptin  $273,1 \pm 24,2$  mg (de 9,7 ori), iar în cel cu imupurin  $267,5 \pm 34,4$  mg (de 9,5 ori). Astfel, s-a concluzionat, că implantarea discurilor de fetru a determinat o reacție inflamatoare exudativă marcată. Pentru aprecierea influenței preparatelor cercetate asupra fazei exudative s-a calculat procentul de inhibiție (tab.4.1.1). Dexametazona a determinat o inhibiție a procesului exudativ cu 38%, imuheptinul cu 13%, iar imupurinel cu 15%. Analiza masei granulomului uscat a demonstrat, că în lotul de control aceasta a constituit  $90,4 \pm 12,0$  mg sau de 3,2 ori mai mare ca masa inițială, ce indică despre prezența unui proces proliferativ marcat. În lotul tratat cu dexametazonă masa discului uscat a constituit  $49,9 \pm 6,1$  mg sau de 1,8 ori mai mare față de masa inițială, dar redus semnificativ față de lotul de control. În lotul tratat cu imuheptin și imupurin masa granulomului uscat a constituit  $73,4 \pm 10,7$  mg și  $73,0 \pm 16,7$  mg, respectiv, sau de 2,6 ori mai mare decât cea inițială. Intensitatea procesului proliferativ a fost analizată prin procentul de inhibiție, care la dexametazonă a constituit 45%, la imuheptin - 19% și imupurin - 20%.

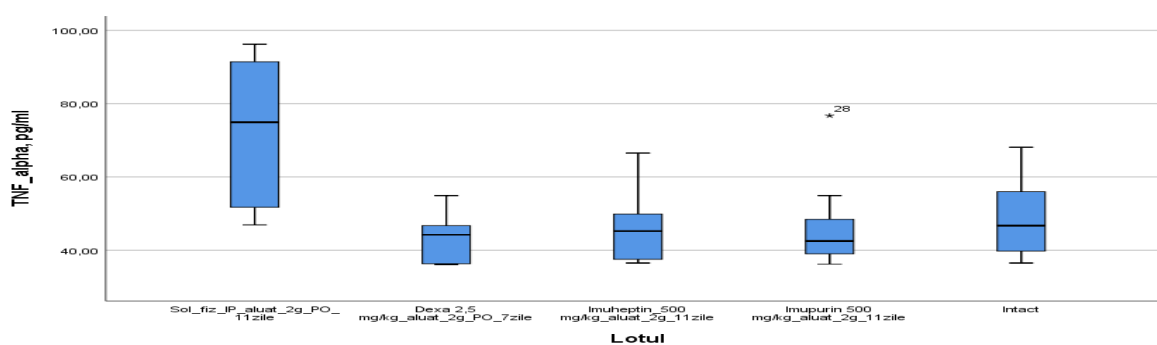
Aceste date confirmă faptul, că dexametazona a redus esențial inflamația proliferativă, iar preparatele de origine entomologică au manifestat un efect similar, dar moderat. În baza rezultatelor obținute putem concluziona, că dexametazona a inhibat efectiv faza exudativă și proliferativă în inflamația subacută, iar preparatele entomologice au diminuat preponderent faza proliferativă, ce se datorează, probabil, compoziției și proprietăților imunomodulatoare.

Modelarea inflamației subacute a demonstrat o majorare esențială a nivelului TNF-alfa de la  $48,68 \pm 10,77$  pg/ml în lotul martor până la  $72,67 \pm 20,19$  pg/ml ( $P_{1-2} > 0,05$ ) în lotul de control, o tendință de creștere a nivelului IL-6 de la  $33,75 \pm 0,57$  pg/ml în lotul martor până la  $37,57 \pm 1,69$  pg/ml ( $P_{1-2} > 0,05$ ) în lotul de control, precum și o micșorare a conținutului IL-10 de la  $32,35 \pm 13,39$  pg/ml în lotul martor până la  $15,28 \pm 2,36$  pg/ml ( $P_{1-2} < 0,05$ ) în lotul de control (anexa 8, fig. 4.1.1., 4.1.2., 4.1.3.).

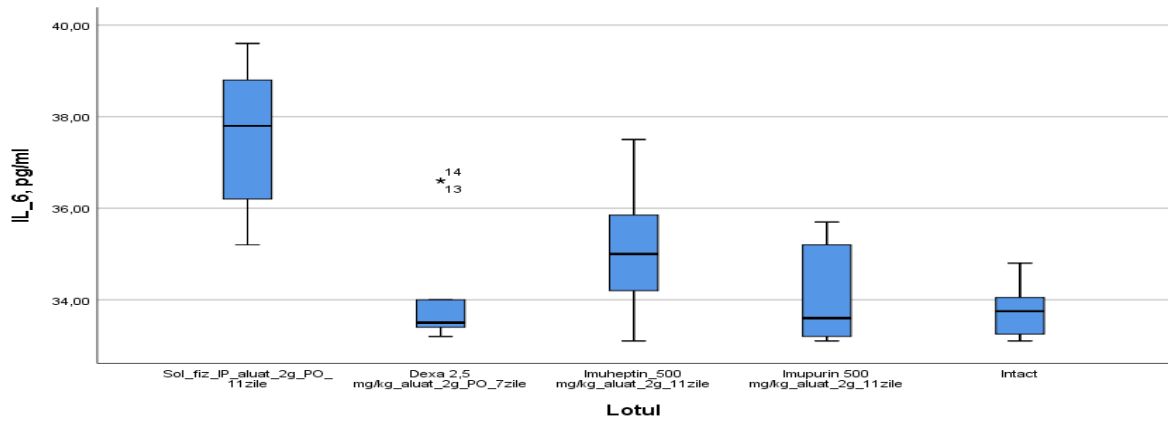
**Tabelul 4.1.1 Influența imuheptinului și imupurinului asupra inflamației subacute**

Loturile de animale	Masa medie (greutatea) a 2 discuri/granulome				
	Discurile initiale	Granulom umed	Procentul de inhibiție (faza exudativă)	Granulom uscat	Procentul de inhibiție (faza proliferativă)
	X±DS (Mediana; AIQ)				
1. Lotul control, soluție fiziologică	28,1±0,4 (28,1; 0,8)	315,1±32,0 (306,4; 48,1)		90,4±12,0 (88,6; 20,1)	
2. Dexametazonă 2,5 mg/kg	28,1±0,9 (27,8; 0,9) P <sub>1-2</sub> =1,000	196,1±10,0 (194,5; 12,9) P <sub>1-2</sub> =0,000	38%	49,9±6,4 (49,2; 13,01) P <sub>1-2</sub> =0,000	45%
3. Imuheptin 500 mg/kg	28,1±1,0 (28,0; 0,6) P <sub>1-3</sub> =1,000	273,1±24,2 (270,6; 48,6) P <sub>1-3</sub> =1,000	13%	73,4±10,7 (69,3; 18,2) P <sub>1-3</sub> =0,106	19%
4. Imupurin 500 mg/kg	28,2±0,9 (28,0; 0,7) P <sub>1-4</sub> =1,000	267,5±34,4 (261,3; 56,3) P <sub>1-4</sub> =0,106	15%	73,0±16,7 (69,3; 28,9) P <sub>1-4</sub> =0,066	20%

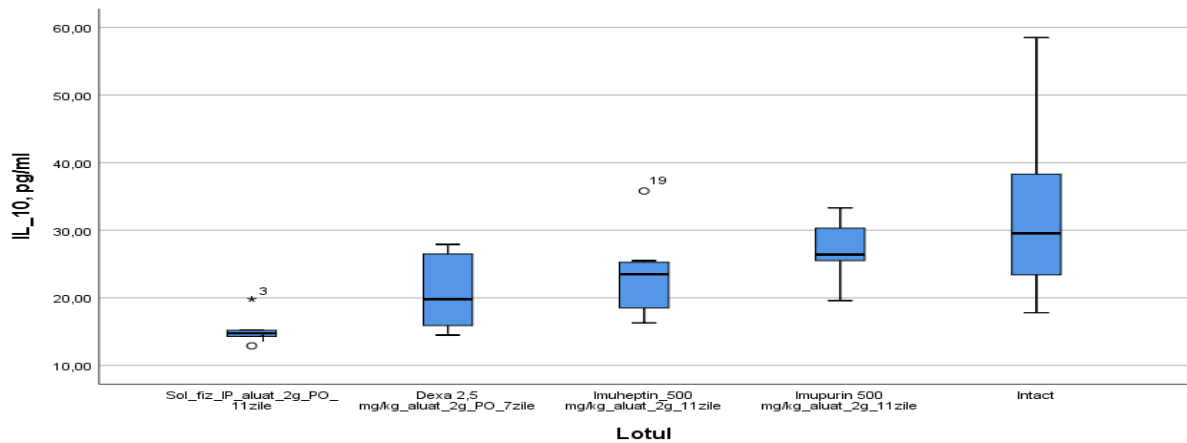
Dexametazona a determinat o diminuare marcată a nivelului TNF-alfa și neesențială a IL-6 cu o majorare neesențială a IL-10. Preparatele de origine entomologică au normalizat nivelul TNF-alfa și au micșorat neesențial pe cel al IL-6. Imuheptinul, și îndeosebi imupurinul, au majorat conținutul IL-10, citokină cu proprietăți antiinflamatorii, în comparație cu lotul de control (anexa 8). Astfel, antiinflamatorul steroidian a diminuat preponderent nivelul citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6), iar preparatele de origine entomologică au determinat restabilirea raportului dintre citokinele proinflamatoare (TNF-alfa, IL-6) și antiinflamatoare (IL-10).



**Figura 4.1.1. Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului de TNF-alfa în inflamația subacută**



**Figura 4.1.2. Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului de IL-6 în inflamația subacută**

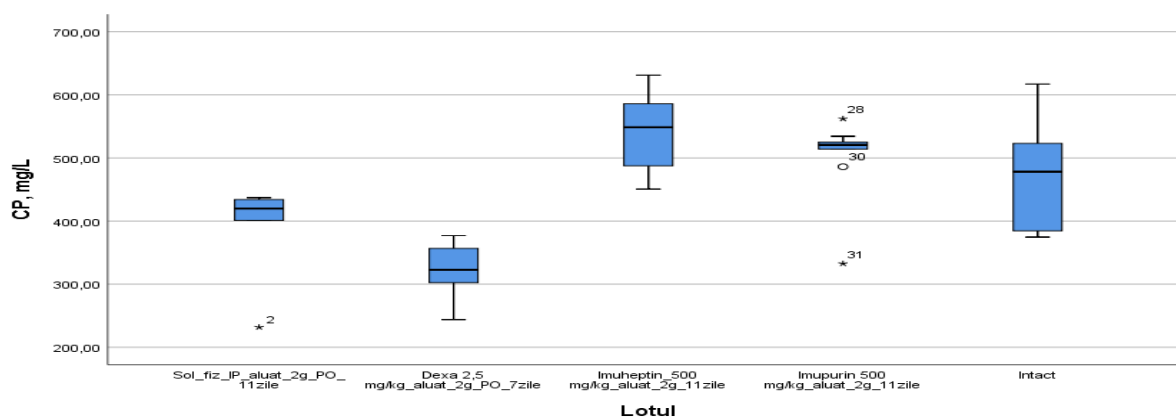


**Figura 4.1.3. Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului de IL-10 în inflamația subacută**

Nivelul plasmatic al ceruloplasminei (CS), considerată o proteină plasmatică în fază acută a inflamației, produsă preponderent de hepatocite și monocite și macrofage activate, crește ca răspuns la inflamație, traumă sau infecție. Producerea CS de celulele mieloide este indusă de  $IFN-\gamma$  și  $TNF\alpha$ . Activitatea feroxidazică a CS inhibă producerea mediată de ioni feroși ai SRO cu manifestarea activității antioxidante. CS prezintă, de asemenea, activitate bactericidă dependentă de feroxidază. Creșterea nivelului plasmatic al CS în timpul reacției de fază acută sugerează o posibilă funcție antiinflamatoare datorită activității feroxidazice și, prin urmare, a efectelor antioxidante și bactericide. CS, datorită activității antioxidante, preîntâmpină carbonilarea proteinelor de către SRO în maladiile inflamatorii. Acțiunea antiinflamatoare a CS, cel mai posibil, este cauzată de sinteza acesteia de macrofagele infiltrate în locul inflamației și, mai puțin, de modularea răspunsului celulelor T. Astfel, prevenirea oxidării și a leziunilor tisulare

poate fi considerat mecanismul de bază al CS, generată de macrofagele recrutate la locul inflamației [24].

La modelarea inflamației subacute s-a constatat o diminuare a nivelului CS de la  $470,41 \pm 87,0$  în lotul intact până la  $390,68 \pm 78,96$  mg/L ( $P < 0,05$ ) în lotul de control. Dexametazona a determinat o reducere mai importantă a nivelului CS. Preparatele de origine entomologică au majorat semnificativ conținutul CS în inflamația subacută (fig. 4.1.4.).



**Fig. 4.1.4. Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului de CP în inflamația subacută**

La modelarea inflamației subacute s-a constatat o tendință de majorare a produselor finale de glicare avansată (AGE) și a produselor proteice de oxidare avansată (PPOA).

**Tabelul 4.1.2. Influența imuheptinului și imupurinului asupra nivelului AGE și PPOA în inflamația subacută**

Parametrii	AGE pentos like, $\mu\text{M/s.L}$	PPOA, $\mu\text{M/L}$
	X $\pm$ DS (Mediana; AIQ)	
1. Lotul martor (intact)	370,8 $\pm$ 72,9 (388,8; 104,6)	24,1 $\pm$ 3,4 (24,3; 4,2)
2. Lotul control cu inflamație	399,9 $\pm$ 133,1 (436,9; 257,8) $P_{1-2}=1,000$	26,1 $\pm$ 4,8 (26,6; 4,3) $P_{1-2}=1,000$
3. Dexametazonă 2,5 mg/kg	256,4 $\pm$ 81,9 (296,8; 152,6) $P_{1-3}=0,15; P_{2-3}=0,014$	28,2 $\pm$ 7,2 (30,0; 12,5) $P_{1-3}=1,000; P_{2-3}=1,000$
4. Imuheptin 500 mg/kg	399,0 $\pm$ 64,1 (404,9; 34,7) $P_{1-4}=1,000$ $P_{2-4}=1,000$	32,4 $\pm$ 3,4 (31,5; 6,2) $P_{1-4}=0,079$ $P_{2-4}=0,558$
5. Imupurin 500 mg/kg	358,5 $\pm$ 42,9 (365,7; 70,2) $P_{1-5}=1,000$ $P_{2-5}=1,000$	33,2 $\pm$ 7,3 (32,5; 14,4) $P_{1-5}=0,023$ $P_{2-5}=0,240$

Dexametazona a determinat o reducere a nivelului AGE de la  $399 \pm 133,08 \mu\text{M/s.L}$  în lotul cu inflamație până la  $256,54 \pm 81,9 \mu\text{M/s.L}$  ( $P > 0,05$ ) cu o tendință de majorare a PPOA de la  $26,10 \pm 4,82 \mu\text{M/L}$  până la  $28,19 \pm 7,19 \mu\text{M/L}$  ( $P > 0,05$ ). Imuheptinul nu a influențat nivelul AGE cu o majorare nesemnificativă a conținutului PPOA. Imupurinul a determinat o reducere neesențială a nivelului AGE și o tendință de majorare a PPOA (tab. 4.1.2.).

La modelarea inflamației subacute s-a constatat majorarea nesemnificativă a nivelului grupelor SH totale și libere fără modificări semnificative ale grupelor SH ale proteinelor. Concomitent, s-a depistat o majorare a conținutului disulfurilor (SS), raportului procentual SS/SH libere și SS/SH totale cu o diminuare celui al SH libere/SH totale (tab.4.1.3.). Analiza acestor date a sugerat, că inflamația subacută a intensificat neesențial statusul antioxidant, posibil datorită diminuării utilizării grupelor SH libere și totale, cu augmentarea mai accentuată a celui prooxidant (SS, SS/SH libere, SS/SH totale). La rândul său, majorarea grupelor SH libere și SH totale pot indica despre inițierea proceselor proliferative, iar creșterea disulfurilor – despre procesele degenerative [106]. Astfel, disbalanța tiol-disulfidică în inflamația subacută atestă despre dezvoltarea stresului oxidativ și prezența proceselor degenerative-proliferative. Dexametazona practic a restabilit la nivelul animalelor intacte conținutul grupelor SH totale și SH libere cu o tendință de majorare a grupelor SH ale proteinelor. Antiinflamatorul steroidian a majorat nivelul disulfurilor și raportul procentual al SS/SH libere și SS/SH totale cu diminuarea celui al SH/libere/SH totale. Analiza acestor date indică, că dexametazona a intensificat consumarea compușilor tiolici pentru anihilarea stresului oxidativ, dar nu a influențat statusul prooxidant, ce și s-a manifestat prin scăderea potențialului antioxidant confirmat prin reducerea raportului procentual SH libere/SH totale.

Administrarea imuheptinului la animalele cu inflamație subacută a determinat o micșorare a conținutului grupelor SH totale și SH libere față de lotul martor și cu inflamație cu o majorare neesențială a SH grupelor proteinelor. Concomitent preparatul a diminuat față de lotul de control disulfurile, raportul procentual SS/SH libere, SS/SH totale cu majorarea celui a SH libere/SH totale (tab.4.1.3.). Analiza datelor relatate denotă, că imuheptinul a intensificat utilizarea compușilor tiolici pentru anihilarea stresului oxidativ, fapt confirmat și prin creșterea potențialului antioxidant datorită raportului procentual SH libere/SH totale. În același timp, preparatul de origine entomologică a redus semnificativ statusul prooxidant relevant prin micșorarea SS, SS/SH libere și SS/SH totale. Astfel, imuheptinul a determinat o echilibrare a statusului oxidant și prooxidant în inflamația subacută.

**Tabelul 4.1.3. Influența imuheptinului și imupurinului asupra parametrilor sistemului tiol-disulfidic în inflamația subacută**

Parametrii	Grupe SH totale μM/L	Grupe SH libere μM/L	SH grupe tiolice a proteinelor μM/L	Disulfuri (SS) μM/L	SS/SH libere x 100%	SS/SH totale x 100%	SH libere/SH totale x 100%
	X±DS (Mediana; AIQ)						
1. Lotul martor	78,2±9,8 (78,5; 20,5)	72,6±9,8 (72,5; 14,2)	4,2±0,7 (3,9; 1,2)	2,8±1,8 (2,4; 3,6)	3,9±2,6 (3,8; 4,3)	3,6±2,2 (3,6; 3,8)	92,8±4,4 (92,8; 7,5)
2. Lotul control, inflamație	82,0±8,8 (82,6; 17,4) P <sub>1-2</sub> =1,000	74,7±8,3 (75,5; 16,5) P <sub>1-2</sub> =1,000	4,1±0,6 (4,2; 1,0) P <sub>1-2</sub> =1,000	3,6±0,9 (3,8; 1,5) P <sub>1-2</sub> =1,000	4,9±1,2 (4,8; 1,9) P <sub>1-2</sub> =1,000	4,4±1,0 (4,4; 1,5) P <sub>1-2</sub> =1,000	91,1±2,1 (91,1; 3,05) P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile	79,6±8,4 (83,0; 15,4) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	72,2±7,9 (70,2; 10,5) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	4,8±0,7 (4,7; 1,4) P <sub>1-3</sub> =0,577 P <sub>2-3</sub> =0,790	3,7±1,6 (3,4; 2,6) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	5,1±2,5 (4,3; 4,4) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	4,6±2,0 (4,0; 3,5) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	90,8±4,1 (92,0; 7,2) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000
4. Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile	64,6±5,6 (64,2; 5,3) P <sub>1-4</sub> =0,047 P <sub>2-4</sub> =0,01 P <sub>3-4</sub> =0,016	60,1±4,8 (61,2; 7,5) P <sub>1-4</sub> =0,079 P <sub>2-4</sub> =0,041 P <sub>3-4</sub> =0,08	4,3±0,7 (4,3; 1,3) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000	2,3±1,4 (2,2; 2,6) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,593 P <sub>3-4</sub> =0,08	3,7±2,4 (3,6; 5,3) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	3,4±2,1 (3,4; 4,6) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	93,0±4,2 (93,2; 9,2) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imupurin 500 mg/kg, 7 zile	78,8±9,6 (80,0; 16,1) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	71,4±10,1 (74,8; 15,4) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	3,8±0,7 (3,5; 0,7) P <sub>1,2,4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,049	3,7±0,9 (3,4; 1,8) P <sub>1,2,3-5</sub> =1,000	5,1±1,8 (4,7; 2,7) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	4,7±1,5 (4,3; 2,2) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	90,5±3,0 (91,4; 4,5) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000

Imupurinul în inflamația subacută a manifestat acțiune similară cu dexametazona relevată prin reducerea nivelului grupelor SH totale și SH libere și majorarea disulfurilor și raportului procentual al SS/SH libere și SS/SH totale cu diminuarea celui al SH/libere/SH totale. Astfel, imupurinul, că și dexametazona, a intensificat consumarea compușilor tiolici pentru anihilarea stresului oxidativ, dar nu a influențat statusul prooxidant, ce și s-a manifestat prin scăderea potențialului antioxidant confirmat prin reducerea raportului procentual SH libere/SH totale (tab. 4.1.3.)

La inducerea inflamației prin implantarea discurilor de fetru s-a constatat tendința de micșorare a activității catalazei, SOD și GPO și de majorare a GR, fără modificări esențiale ale GST. Dexametazona practic a restabilit activitatea catalazei și SOD la nivelul animalelor intacte și a majorat activitatea enzimelor sistemului glutatonic (GR, GPO, GST). Imuheptinul, administrat la animalele cu inflamație, a redus activitatea SOD și a restabilit activitatea catalazei față de lotul control cu creșterea activității GR, GPO și GST. Imupurinul, față de lotul control, a



crescut activitatea catalazei, a micșorat-o pe cea a SOD și GST cu majorarea activității GR și GPO (tab.4.1.4.).

**Tabelul 4.1.4. Influența imuheptinului și imupurinului asupra enzimelor sistemului antioxidant în inflamația subacută**

Parametrii	Catalaza μM/s.L	SOD u/c	GR, nM/s.L	GPO, nM/s.L	GST, nM/s.L
	X±DS (Mediana; AIQ)				
1.Lotul martor n=8	19,7±1,7 (19,9; 2,2)	918,1±45,7	64,8±18,9 (62,5; 31,2)	430,8±90,3 (406,0; 105,1)	24,5±12,9
2.Lotul control cu inflamație	15,9±3,2 (16,1; 4,5) P <sub>1-2</sub> =1,000	905,3±49,2 (910,1; 97,0) P <sub>1-2</sub> =1,000	80,4±21,9 (89,3; 40,1) P <sub>1-2</sub> =1,000	380,3±42,3 (389,7; 54,7) P <sub>1-2</sub> =1,000	24,8±10,3 (27,5; 20,6) P <sub>1-2</sub> =1,000
3.Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile	18,3±2,4 (18,5; 4,9) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	944,9±79,3 (962,3; 139,1) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	99,2±33,5 (107,2; 62,4) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,765	531,7±116,8 (568,4; 215,4) P <sub>1-3</sub> =0,373 P <sub>2-3</sub> =0,051	50,2±13,4 (52,4; 19,3) P <sub>1-3</sub> =0,000 P <sub>2-3</sub> =0,001
4.Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile	20,4±2,9 (21,3; 5,0)P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	865,0±96,6 (834,8; 208,7) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,901	127,6±21,7 (142,9; 35,7) P <sub>1-4</sub> =0,036 P <sub>2-4</sub> =0,359 P <sub>3-4</sub> =1,000	551,8±96,8 (519,7; 127,4) P <sub>1-4</sub> =0,200 P <sub>2-4</sub> =0,029 P <sub>3-4</sub> =1,000	34,3±8,2 (33,1; 11,0) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,078
5.Imupurin 500 mg/kg,7 zile	31,8±9,5 (36,6; 19,2) P <sub>1-5</sub> =0,000 P <sub>2-5</sub> =0,000 P <sub>3-5</sub> =0,000	888,9±135,9 (881,2; 118,8) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	150,8±65,7 (142,9; 107,2) P <sub>1-5</sub> =0,001 P <sub>2-5</sub> =0,015 P <sub>3-5</sub> =0,08	535,5±100,6 (492,3; 162,4) P <sub>1-5</sub> =0,311 P <sub>2-5</sub> =0,042 P <sub>3-5</sub> =1,000	21,1±9,6 (19,3; 13,8) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,000

La inducerea inflamației prin implantarea discurilor de fetru s-a constatat diminuarea ne semnificativă a AAT (metoda ABTS), PAB și MRO cu majorarea neesențială a AAT (metoda CUPRAC) și DAM. Dexametazona a restabilit AAT (ABTS) și a majorat AAT (CUPRAC), a micșorat PAB și practic nu a influențat nivelul DAM și MRO față de lotul de control. Imuheptinul a micșorat AAT (metoda ABTS) și PAB, a restabilit DAM și MRO la nivelul animalelor din lotul martor cu majorarea AAT (metoda CUPRAC). Imupurinul a determinat conținutul PAB și MRO la nivelul animalelor din lotul martor, iar cel al AAT (ABTS) și DAM la nivelul șobolanilor cu inflamație (tab.4.1.5.).

În baza rezultatelor relatate s-a concluzionat, că imuheptinul și imupurinul au contribuit la reducerea intensității procesului inflamator (diminuarea procentului de inhibiție a proceselor exudative și proliferative, nivelului TNF-alfa, IL-6 și majorarea IL-10), precum și la modularea stresului oxidativ (micșorarea nivelului DAM, creșterea activității SOD, GR, GPO, GST, reglarea sistemului tiol-disulfidic).

**Tabelul 4.1.5. Influența imuheptinului și imupurinului asupra activității antioxidante totale și parametrilor sistemului oxidant în ser în inflamația subacută**

Parametrii	AAT ABTS μM/l	AAT CUPRAC, mM/l	DAM, μM/l	PAB, unit arbitrare	MRO, mM/l
	X±DS (Mediana; AIQ)				
1.Lotul martor	534,1±20,6 (532,6; 36,5)	4,9±3,5 (4,8; 7,0)	14,55±1,7 (14,1; 2,7)	341,7±75,7 (348,5; 147,7)	795,3±59,8 (792,1; 99,2)
2.Lotul control	515,3±19,8 (511,8; 28,4) P <sub>1-2</sub> =1,000	6,6±4,6 (6,0; 9,8) P <sub>1-2</sub> =1,000	15,4±2,6 (14,7; 3,4) P <sub>1-2</sub> =1,000	317,2±39,1 (318,9; 67,6) P <sub>1-2</sub> =1,000	766,3±52,3 (766,2; 103,7) P <sub>1-2</sub> =1,000
3.Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile	532,5±23,6 (541,3; 24,2) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	15,4±7,2 (14,3; 13,0) P <sub>1-2</sub> =0,001 P <sub>2-3</sub> =0,023	16,3±1,0 (16,5; 1,7) P <sub>1-3</sub> =0,230 P <sub>2-3</sub> =1,000	154,6±50,6 (137,1; 96,1) P <sub>1-3</sub> =0,000 P <sub>2-3</sub> =0,000	754,0±99,6 (771,7; 204,8) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000
4.Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile	487,7±44,0 (502,1; 36,7) P <sub>1-4</sub> =0,035 P <sub>2-4</sub> =0,929 P <sub>3-4</sub> =0,039	8,2±5,2 (8,3; 10,4) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,08 P <sub>3-4</sub> =1,000	14,6±0,8 (14,5; 0,6) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,286 P <sub>3-4</sub> =1,000	277,8±39,7 (289,2; 46,9) P <sub>1-4</sub> =0,380 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,001	796,3±68,9 (771,7; 128,9) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000
5.Imupurin 500 mg/kg, 7 zile	518,9±29,3 (510,3; 54,3) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	8,0±3,4 (8,4; 4,7) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,036 P <sub>3-5</sub> =1,000	15,8±1,2 (16,5; 1,8) P <sub>1-5</sub> =0,969 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	344,1±64,5 (355,5; 103,3) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,000	801,0±60,3 (795,4; 117,7) P <sub>1,2,3-5</sub> =1,000

#### 4.2. Influența preparatelor de origine entomologică asupra inflamației subacute induse de adjuvant Freund.

După extragerea discurilor cu granulomul format în jurul lor s-a constatat că masa acestora a crescut semnificativ ce ne demonstrează despre dezvoltarea procesului inflamator. Astfel, masa granulomului stâng umed în lotul martor a constituit 274,8±69,8 mg (masa inițială a discului 26,3±1,3), iar cea a granulomului drept umed 495,0±138,0 mg (masa inițială a discului 26,0±1,0). Date similare au fost raportate de Kuum M.G.M. și coaut. [84], Nair V. și coaut., [101]. Analiza masei granulomului stâng uscat a relevat, că dexametazona a determinat o reacție inflamatorie semnificativ redusă față de lotul martor, în timp ce imuheptinul și imupurinul nu au influențat semnificativ masa granulomului. Date similare au fost constatate și în cazul granuloamelor formate în jurul discurilor de fetru îmbibate cu adjuvant Freund. Analiza dinamicii masei granulomului uscat a demonstrat, că în lotul martor aceasta a constituit 73,2±23,6 mg (masa inițială a discului 26,3±1,3), iar granulomului drept (cu adjuvant Freund) 154,3±41,9 mg, masa inițială a discului fiind - 26,0±1,0 (tab.4.2.1.).

**Tabelul 4.2.1. Influența imuheptinului și imupurinului asupra inflamației subacute prin adjuvantul Freund**

Loturile de animale	Masa (greutatea) discului/granulomului					
	Disc stâng initial	Disc drept (cu adjuvant) inițial	Granulom umed stâng	Granulom umed drept (cu adjuvant)	Granulom uscat stâng	Granulom uscat drept (cu adjuvant)
	X±DS (Mediana; AIQ)					
1.Lotul control, soluție fiziologică	26,3±1,3 (36,2; 1,7)	26,0±1,0 (25,9; 1,5)	274,8±69,8 (265,0; 133,5)	495,0±138,0 (454,0; 182,0)	73,2±23,6 (84,0; 45,0)	154,3±41,9 (136,0; 80,0)
2.Dexametazonă 2,5 mg/kg	26,8±0,6 (26,6; 0,6) P <sub>1-2</sub> =1,000	26,9±1,1 (27,2; 1,8) P <sub>1-2</sub> >0,05 P <sub>1-2</sub> =0,298	203,7±24,6 (199,0; 27,0) P <sub>1-2</sub> =0,028	240,7±31,5 (256,0; 42,0) P <sub>1-2</sub> =0,000	54,7±8,1 (52,0; 15,0) P <sub>1-2</sub> =0,036	89,7±12,8 (92,0; 14,0) P <sub>1-2</sub> =0,004
3.Imuheptin 500 mg/kg	26,9±0,7 (26,9; 0,7) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	26,4±1,1 (26,3; 1,9) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	294,3±53,6 (277,5; 103,0) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,002	566,6±114,5 (568,0; 145,0) P <sub>1-3</sub> >0,05 P <sub>2-3</sub> <0,05	84,0±26,1 (82,0; 44,0) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,014	179,1±39,1 (171,5; 36,2) P <sub>1-3</sub> =0,872 P <sub>2-3</sub> =0,000
4. Imupurin 500 mg/kg	26,2±1,0 (26,1; 2,2) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000	26,4±1,2 (26,7; 1,5) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000	273,6±40,3 (257,0; 66,7) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,026	472,0±103,6 (488,5; 208,0) P <sub>1-4</sub> >0,05 P <sub>2-4</sub> <0,05	68,0±14,0 (64,0; 17,2) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,871	150,4±41,3 (151,5; 71,2) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,005

Pentru aprecierea gradului de inflamație exudativă și proliferativă s-au determinat diferențele dintre masa granulomului umed și uscat (tab.4.2.1.). În lotul de control s-a constatat un grad mai exprimat al inflamației exudative în jurul discurilor infiltrate cu adjuvantul Freund. Astfel, diferența dintre granulomul stâng umed și uscat a constituit 201,6±51,4 mg, iar diferența dintre granulomul drept (cu adjuvant Freund) umed și uscat - 384,2±138,4 mg. Dexametazona a determinat o reacție exudativă semnificativ redusă, atât în jurul discurilor fără adjuvant, cât și în jurul celor cu adjuvant Freund. Astfel, pentru granulomul stâng diferența dintre masa în stare umedă și uscată a constituit 149,0±20,9 mg (P<0,05), iar pentru cel drept (cu adjuvant Freund) - 151,0±22,29 mg (P<0,05). Preparatele entomologice, practic n-au influențat faza exudativă a inflamației în jurul discului stâng (fără adjuvant), iar în cazul inflamației exudative, indusă de adjuvantul Freund, imupurinul a manifestat o tendință de micșorare a diferenței dintre masa granulomului umed și masa inițială a discului (360,6±103,3), comparativ cu lotul martor - 384,2±138,4 mg (P>0,05), iar imuheptinul o tendință de creștere a acestei diferențe - 455,2±114,1mg față de lotul martor (P>0,05) (tab.4.2.2.).

**Tabelul 4.2.2. Influența imuheptinului și imupurinului asupra proceselor exudative și proliferative ale inflamației subacute prin adjuvantul Freund**

Loturile de animale	Diferența dintre masa (greutatea) discurilor/granulomului					
	Granulom umed stâng – masa inițială a discului	Granulom umed stâng - Granulom uscat stâng (FEx)	Granulom uscat stâng - masa inițială a discului (FPr)	Granulom umed drept (cu adjuvant)- masa inițială a discului	Granulom umed drept (cu adjuvant)- granulom uscat drept (FEx)	Granulom uscat drept (cu adjuvant) - masa inițială a discului (FPr)
	X±DS (Mediana; AIQ)					
1. Lotul martor soluție fiziologică	248,3±69,6 (239,0; 133,5)	201,6±51,4 (195,0; 98,0)	46,8±23,7 (58,1; 44,9)	384,2±138,4 (344,7; 183,4)	340,67±104,9 (339,0; 111,0)	128,48±42,1 (110,5; 79,9)
2. Dexametazonă 2,5 g/kg	177,0±24,6 (172,8; 26,3) P <sub>1-2</sub> =0,027	149,0±20,9 (147,0; 19,0) P <sub>1-2</sub> =0,024	28,0±8,1 (25,4; 14,6) P <sub>1-2</sub> =0,046	128,7±31,7 (144,3; 43,6) P <sub>1-2</sub> =0,000	151,0±22,3 (154,0; 39,0) P <sub>1-2</sub> =0,000	62,7±13,0 (64,3; 14,8) P <sub>1-2</sub> =0,003
3. Imuheptin 500 mg/kg	267,4±53,4 (250,5; 103,6) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,002	210,3±33,6 (200,5; 44,7) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,005	57,1±25,9 (55,1; 41,9) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,015	455,2±114,1 (455,6; 147,3) P <sub>1-3</sub> =0,903 P <sub>2-3</sub> =0,000	387,5±80,4 (396,0; 84,2) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,000	152,7±38,9 (144,8; 36,4) P <sub>1-3</sub> =0,931 P <sub>2-3</sub> =0,000
4. Imupurin 500 mg/kg	247,4±40,4 (230,2; 68,0) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,024	205,6±32,6 (194,5; 63,5) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,010	41,8±13,5 (38,6; 16,8) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,178	360,6±103,3 (375,8; 207,3) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,000	321,6±70,1 (325,5; 126,0) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,000	124,0±41,0 (124,9; 69,5) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,005

Analiza diferențelor dintre masa granulomului uscat și masa inițială a discurilor a permis de a aprecia intensitatea proceselor proliferative. Astfel, în lotul martor diferența dintre masa granulomului uscat stâng și masa inițială a discului a constituit 46,8±23,7 mg, iar a celui drept cu adjuvant Freund - 128,48±42,1 mg, fapt ce a demonstrat despre un grad mai marcat al inflamației, inclusiv a proceselor proliferative induse de adjuvant. Antiinflamatorul steroidian a inhibat marcat dezvoltarea proceselor proliferative cu valori de 2 ori mai mici a diferenței dintre masa granulomului stâng și masa inițială a discurilor (28,0±8,1mg față de 46,8±23,7 mg în lotul martor; (P<0,05) și a diferenței dintre masa granulomului drept și masa inițială a discurilor (62,7±13,0 față de 128,48±42,1 mg; P<0,05). Imuheptinul a influențat nesemnificativ evoluția proceselor proliferative cu tendința de majorare a diferenței dintre masa granulomului uscat stâng și drept cu adjuvantul Freund și masa inițială a discurilor (tab.4.2.2). Imupurinul a determinat tendința de micșorare a diferenței dintre masa granulomului uscat stâng și masa inițială a discurilor respective (41,8±13,5mg față de 46,8±23,7mg în lotul martor; (P>0,05), precum și în cazul discului cu adjuvant Freund (124,0±41,0 față de 128,48±42,1mg; P>0,05).

Intensitatea proceselor proliferative s-a evaluat și prin determinarea procentului de inhibiție față de lotul martor.

Analiza tabloului sângelui periferic nu a relevat modificări esențiale a numărului de eritrocite în lotul martor, cel cu dexametazonă și imuheptin.

**Tabelul 4.2.3 Influența imuheptinului și imupurinelui asupra tabloului sângelui periferic în inflamația subacută prin adjuvantul Freund**

Loturile de animale	Eritrocite 10 <sup>12</sup> /L	Hb, g/L	Hemato- crit, %	Leucocite, 10 <sup>9</sup> /L	Trombo- cite, 10 <sup>9</sup> /L	Reticu- locite, %
	X±DS (Mediana; AIQ)					
1.Lotul martor, soluție fiziologi-că	8,6±0,4 (8,6; 0,8)	147,0±8,4 (146,5; 17,2)	45,9±2,3 (45,7; 3,4)	6,7±1,8 (6,3; 2,4)	1016,8±294, 6 (925,0; 380,2)	4,8±1,7 (4,3; 2,4)
2.Dexametazonă 2,5 mg/kg	8,6±0,7 (Me-9,1) P <sub>1-2</sub> =1,000	146,5±8,7 (Me -157,5) P <sub>1-2</sub> =1,000	44,9±2,7 (Me-48,8) P <sub>1-2</sub> =1,000	3,9±1,8 (Me-3,2) P <sub>1-2</sub> =0,709	770,5±132,9 (Me-756,0) P <sub>1-2</sub> =0,495	2,4±1,0 (Me-1,8) P <sub>1-2</sub> =0,051
3.Imuheptin 500 mg/kg	8,6±1,0 (8,7; 1,0) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	136,8±10,9 (142,5; 9,7) P <sub>1-3</sub> =0,307 P <sub>2-3</sub> =0,264	43,1±2,7 (41,9; 4,2) P <sub>1-3</sub> =0,316 P <sub>2-3</sub> =1,000	7,8±5,3 (8,4; 7,2) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,104	897,7±325,2 (1079,5; 390,2) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	4,4±2,0 (3,7; 0,6) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,074
4.Imupurin 500 mg/kg	8,2±0,5 (8,3; 0,7) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000	134,2±9,9 (136,0; 13,7) P <sub>1-4</sub> =0,097 P <sub>2-4</sub> =0,073	41,36±2,7 (41,9; 4,2) P <sub>1-4</sub> =0,015 P <sub>2-4</sub> =0,051	6,2±1,7 (5,8; 3,4) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,903	938,5±217,2 (939,9; 229,2) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000	4,5±1,3 (4,0; 1,5) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,061

La animalele, cărora li s-a administrat imupurin, s-a constatat o tendință de micșorarea a numărului de eritrocite. Nivelul hemoglobinei și hematoritului practic nu a fost modificat de dexametazonă, în timp ce imuheptinul și imupurinel au manifestat o tendință de micșorare (tab.4.2.3.).

Antiinflamatorul steroidian a determinat o reducere a numărului leucocitelor față de lotul martor (3,9±1,8 față de 6,7±1,8; P>0,05), iar imupurinel mai puțin semnificativă (6,2±1,7 față de 6,7±1,8; P>0,05). Imuheptinul în condițiile modelării inflamației subacute a determinat o majorare a numărului de leucocite față de lotul martor (7,8±5,3 față de 6,7±1,8; P>0,05). Dexametazona, imuheptinul și imupurinel au redus nesemnificativ numărul trombocitelor. Antiinflamatorul steroidian a micșorat de 2 ori (P>0,05) nivelul, reticulocitelor, iar imuheptinul și imupurinel practic nu l-au influențat (tab.4.2.3.).

**Tabelul 4.2.4. Influența imuheptinului și imupurinului asupra formulei leucocitare în sângele periferic în inflamația subacută prin adjuvantul Freund**

Loturile de animale	Neutrofile, %	Limfocite %	Monocite, %	Eozinofile %	Bazofile, %	Granulocite imature, %
	X±DS (Mediana; AIQ)					
1.Lotul martor, soluție fiziologi-că	33,4±10,1 (30,7; 18,6)	51,9±9,1 (51,3; 17,1)	7,1±0,4 (7,3; 0,8)	7,5±7,8 (4,7; 15,5)	0,08±0,12 (0,05; 0,1)	0,97±2,03 (0,1; 1,65)
2.Dexametazonă 2,5 mg/kg	84,7±4,8 (Me-84,7) P <sub>1-2</sub> =0,000	12,2±2,9 (Me-12,2; ) P <sub>1-2</sub> =0,000	2,1±1,3 (Me-2,9) P <sub>1-2</sub> =0,000	1,9±2,9 (Me-1,8) P <sub>1-2</sub> =0,838	0	0,4±0,57 (Me-0,4) P <sub>1-2</sub> =0,000
3.Imuheptin 500 mg/kg	28,4±10,7 (23,6; 12,3) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,000	59,8±8,7 (58,6; 15,6) P <sub>1-3</sub> =0,821 P <sub>2-3</sub> =0,000	4,6±2,2 (4,8; 3,1) P <sub>1-3</sub> =0,119 P <sub>2-3</sub> =0,090	8,0±8,1 (2,9; 14,7) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,543	0,13±0,1 (0,1; 0,18) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,028	0,63±0,61 (0,4; 1,08) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000
4.Imupurin 500 mg/kg	32,2±10,5 (29,8; 17,1) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,000	54,5±11,3 (57,7; 19,3) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,000	5,5±2,5 (5,5; 4,7) P <sub>1-4</sub> =0,685 P <sub>2-4</sub> =0,008	7,7±6,6 (4,5; 11,9) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,535	0,15±0,1 (0,2; 0,13) P <sub>1-4</sub> =0,965 P <sub>2-4</sub> =0,009	0,75±1,2 (0,35; 0,58) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000

În condiții de inflamație subacută dexametazona a majorat procentul neutrofilelor cu micșorarea celui al limfocitelor, monocitelor, eozinofilelor și granulocitelor imature. Imuheptinul și imupurinul au determinat o tendință de reducere a procentului neutrofilelor, monocitelor, granulocitelor imature cu o creștere neesențială a procentului limfocitelor, bazofilelor și eozinofilelor (tab.4.2.4).

La șobolanii cu inflamație subacută prin implantarea adjuvantului Freund s-a constatat o majorare nesemnificativă a nivelului citokinelor proinflamatorii TNF-alfa și IL-1-beta cu o diminuare marcată a conținutului citokinei antiinflamatorii IL-10 de la 165,25±42,98 pg/ml până la 92,92±33,54 pg/ml (P<0,05). Dexametazona a determinat micșorarea nesemnificativă a nivelului citokinelor proinflamatorii TNF-alfa, IL-1beta și IL-6 și antiinflamatorii IL-10. Imuheptinul a manifestat efect similar cu antiinflamatorul steroidian față de nivelul TNF-alfa, IL-1beta și IL-10, dar a redus conținutul IL-6 de la 25,24±3,81 pg/ml (lotul control) până la 19,02±1,56 pg/ml (P<0,05). Imupurinul a micșorat semnificativ nivelul IL-6 (19,21±6,38 pg/ml) comparativ cu 25,24±3,81 pg/ml în lotul cu inflamație (P<0,05) și l-a majorat pe cel al IL-10 - 157,05±41,27 pg/ml (P<0,05), comparativ cu 92,92±33,54 pg/ml lotul martor (tab.4.2.5.). Astfel, dacă antiinflamatorul steroidian a micșorat nivelul citokinelor pro- și antiinflamatorii, imuheptinul de rând cu efectul similar dexametazonei a redus suplimentar nivelul IL-6, iar imupurinul, concomitant cu micșorarea conținutului IL-6 a restabilit nivelul IL-10.

**Tabelul 4.2.5. Influența imuheptinului și imupurinului asupra nivelului citokinelor în inflamația subacută prin adjuvantul Freund**

Loturile de animale	TNF-alpha, pg/ml	IL-1beta, pg/ml	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml
	X±DS (Mediana; AIQ)			
1. Lotul intact, soluție fiziologică	70,5±8,2 (71,9; 11,9)	48,7±20,8 (38,8; 21,1)	26,3±3,4 (27,0; 6,6)	165,2±43,0 (179,8; 57,5)
2. Lotul control cu inflamație	72,8±19,8 (82,6; 34,3) P <sub>1-2</sub> =1,000	59,2±16,9 (52,5; 30,9) P <sub>1-2</sub> =1,000	25,2±3,8 (24,5; 4,6) P <sub>1-2</sub> =1,000	92,9±33,5 (79,9; 61,4) P <sub>1-2</sub> =0,000
3. Dexametazonă 2,5 mg/kg	68,6±15,1 (66,5; 19,3) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =1,000	50,4±12,7 (48,3; 15,5) P <sub>1,2-3</sub> =1,000	19,9±4,6 (21,5; 7,6) P <sub>1-3</sub> =0,015 P <sub>2-3</sub> =0,101	84,7±15,9 (79,4; 26,8) P <sub>1-3</sub> =0,000 P <sub>2-3</sub> =1,000
4. Imuheptin 500 mg/kg	66,6±12,6 (66,3; 28,0) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000	53,4±11,4 (51,4; 20,2) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000	19,0±1,6 (19,2; 2,5) P <sub>1-4</sub> =0,003 P <sub>2-4</sub> =0,034 P <sub>3-4</sub> =1,000	85,3±15,7 (86,2; 29,1) P <sub>1-4</sub> =0,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imupurin 500 mg/kg	84,1±12,7 (86,9; 27,9) P <sub>1-5</sub> =0,313 P <sub>2-5</sub> =0,853 P <sub>3-5</sub> >0,05	63,1±15,6 (63,8; 19,9) P <sub>1-5</sub> =0,462 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,930	19,2±6,4 (19,3; 7,7) P <sub>1-5</sub> =0,004 P <sub>2-5</sub> =0,034 P <sub>3-5</sub> =1,000	157,0±41,3 (168,0; 38,7) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,001 P <sub>3-5</sub> =0,000

**Tabelul 4.2.6. Influența imuheptinului și imupurinului asupra parametrilor sistemului prooxidant și antioxidant în ser în inflamația subacută prin adjuvantul Freund**

Parametrii	SOD u/c	AAT ABTS, mM/L	MRO tert, mM/L	DAM μM/l	PAB, unități HK
	X±DS (Mediana; AIQ)				
1. Lotul intact, sol. fiziologică	1064,93±170,1 (1058,8; 151,3)	0,39±0,01 (0,39; 0,01)	2,15±0,61 (2,11; 0,64)	15,3±2,2 (15,5; 2,6)	303,4±49,57 (285,2; 60,9)
2. Lotul control cu inflamație	999,1±115,9 (1025,2; 176,2) P <sub>1-2</sub> =1,000	0,4±0,02 (0,4; 0,03) P <sub>1-2</sub> =1,000	2,36±0,43 (2,42; 0,52) P <sub>1-2</sub> =1,000	16,8±1,3 (16,5; 1,3) P <sub>1-2</sub> =0,858	348,6±43,8 (364,8; 53,0) P <sub>1-2</sub> =0,298
3. Dexametazonă 2,5mg/kg	1120,4±123,5 (1126,0; 210,1) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,755	0,4±0,01 (0,39; 0,02) P <sub>1,2-3</sub> =1,000	2,06±0,28 (2,11; 0,35) P <sub>1,2-3</sub> =1,000	16,1±1,0 (16,5; 1,9) P <sub>1,2-3</sub> =1,000	216,9±28,5 (211,8; 41,0) P <sub>1-3</sub> =0,001 P <sub>2-3</sub> =0,000
4. Imuheptin 500 mg/kg	1033,6±171,4 (1016,8; 205,9) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000	0,39±0,01 (0,38; 0,01) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000	2,25±0,53 (2,39; 0,85) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000	15,9±2,4 (15,8; 2,4) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000	325,8±57,2 (327,2; 67,7) P <sub>1,2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =0,000
5. Imupurin 500 g/kg	1117,6±103,7 (1134,4; 126,0) P <sub>1,3-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,748	0,41±0,02 (0,4; 0,02) P <sub>1-5</sub> =0,004 P <sub>2-5</sub> =0,045 P <sub>3-5</sub> =0,082	2,38±0,52 (2,33; 0,66) P <sub>1,2,3-5</sub> =1,000	14,6±2,0 (14,4; 1,8) P <sub>1,3-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,184	340,1±37,1 (344,1; 56,8) P <sub>1-5</sub> =0,672 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,000

La animalele cu inflamație subacută, indusă prin adjuvantul Freund, s-a constatat o reducere nesemnificativă a activității SOD și o tendință de majorare a nivelului DAM, fără modificări a capacității de captare a radicalului ABTS (tab.4.2.6.). Dexametazona a manifestat un efect opus agentului inflamator cu o restabilire a activității SOD și micșorarea a conținutului DAM. Preparatele de origine entomologică au manifestat acțiune similară cu antiinflamatorul steroidian.

La modelarea inflamației subacute prin implantarea discurilor cu adjuvantul Freund s-a depistat o majorare a nivelului grupelor SH totale și SH libere, disulfurilor (SS), raportului procentual SS/SH liber și SS/SH total cu o diminuare a celui de SH libere/SH totale (tab.4.2.7.). Analiza acestor date ne sugerează că inflamația subacută a crescut neesențial statusul antioxidant, posibil datorită diminuării utilizării grupelor SH libere și totale, cu o majorare a celui prooxidant (SS, SS/SH libere, SS/SH totale). La rândul său, majorarea grupelor SH libere și SH totale pot indica despre inițierea proceselor proliferative, iar creșterea disulfurilor – despre procesele degenerative. Astfel, disbalanța homeostaziei tiol-disulfidice (HTD) în inflamația subacută denotă despre dezvoltarea stresului oxidativ și prezența proceselor degenerative-proliferative. Dexametazona a diminuat nesemnificativ conținutul grupelor SH totale și SH libere și a majorat nivelul disulfurilor și raportul procentual al SS/SH libere și SS/SH totale cu diminuarea celui al SH/liber/SH total. Analiza acestor date indică, că dexametazona a intensificat neesențial consumarea compușilor tiolici pentru anihilarea stresului oxidativ, dar nu a influențat statusul prooxidant, ce și s-a manifestat prin scăderea potențialului antioxidant confirmat prin reducerea raportului procentual SH libere/SH totale.

Imuheptinul în inflamația subacută prin implantarea discurilor cu adjuvantul Freund a manifestat acțiune similară cu dexametazona relevată prin reducerea nivelului grupelor SH totale și SH libere și majorarea disulfurilor și raportului procentual al SS/SH libere și SS/SH totale cu diminuarea celui al SH/liber/SH total. Astfel, imuheptinul, ca și dexametazona, a intensificat consumarea compușilor tiolici pentru anihilarea stresului oxidativ, dar nu a influențat statutul prooxidant, ce și s-a manifestat prin scăderea potențialului antioxidant confirmat prin reducerea raportului procentual SH libere/SH totale (tab. 4.2.7.)

Imupurinul la animalele cu inflamație subacută prin implantarea discurilor cu adjuvantul Freund a determinat o micșorare a conținutului grupelor SH totale și SH libere față de lotul cu inflamație. Concomitent preparatul a diminuat neesențial nivelul disulfurilor și raportul procentual SH libere/SH totale față de lotul de control, dar a majorat raportul procentual SS/SH libere, SS/SH totale (tab.4.2.7.). Analiza datelor relatate a demonstrat, că imupurinul a intensificat utilizarea compușilor tiolici pentru anihilarea stresului oxidativ, fără a influența



semnificativ statusul prooxidant, dar în comparație cu dexametazona nu a intensificat statusul prooxidant relevat prin valori mult mai mici a SS, SS/SH libere și SS/SH totale. Astfel, imupurinul în inflamația subacută a determinat o homeostazie tiol-disulfidică mai avantajoasă ca dexametazona.

**Tabelul 4.2.7. Influența imuheptinului și imupurinului asupra parametrilor sistemului tiol-disulfidic în inflamația subacută prin adjuvantul Freund**

Parametrii	Grupe SH totale μM/L	Grupe SH libere μM/L	Disulfuri (SS) μM/L	SS/SH liber x 100%	SS/SH tot x 100%	SH lib/SH tot x100%
	X±DS (Mediana; AIQ)					
1. Lotul intact, soluție fiziologică	84,2±9,4 (82,3; 12,8)	72,59±9,8	4,0±2,4 (3,8; 1,9)	3,9	3,6	92,8
2. Lotul martor cu inflamație	93,9±12,7 (87,5; 20,7) P <sub>1-2</sub> =1,000	90,1±14,1 (83,8; 23,7) P <sub>1-2</sub> =0,192	1,9±1,2 (1,1; 2,2) P <sub>1-2</sub> =0,588	4,1	3,8	92,3
3. Dexametazonă 2,5mg/kg	96,5±8,1 (95,8; 12,0) P <sub>1-2</sub> =0,483 P <sub>2-3</sub> =1,000	82,5±8,0 (83,8; 10,5) P <sub>1,2-3</sub> =1,000	6,9±3,5 (6,4; 5,6) P <sub>1-2</sub> =0,097 P <sub>2-3</sub> =0,001	7,8	6,8	86,4
4. Imuheptin 500 mg/kg	94,3±19,2 (88,7; 30,4) P <sub>1-4</sub> =0,925 P <sub>2,3-4</sub> =1,000	84,1±18,0 (80,0, 26,1) P <sub>1,2,3-4</sub> =1,000	5,1±2,3 (5,3; 2,7) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,069 P <sub>3-4</sub> =0,948	6,1	5,5	89,1
5. Imupurin 500 g/kg	85,9±14,7 (82,3; 8,3) P <sub>1,2-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,938	78,4±12,4 (75,1; 4,5) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,520 P <sub>3-5</sub> =1,000	3,8±2,0 (3,4; 3,7) P <sub>1,2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =0,06	4,8	4,4	91,2

#### 4.3. Concluzii la capitolul 4

1. Imuheptinul și imupurinul au manifestat un efect moderat de inhibare preponderentă a proceselor proliferative în comparație cu dexametazona, care a diminuat esențial faza exudativă și proliferativă a inflamației.
2. Imuheptinul și imupurinul au redus nivelul citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) și l-au majorat pe cel a citokinelor antiinflamatorii (IL-10) și ceruloplasminei în inflamația subacută.
3. Imuheptinul în inflamația subacută, modelată prin infiltrarea discurilor, a determinat o echilibrare a statutului antioxidant relevată prin creșterea activității catalazei, SOD, GR, GPO și GST, intensificarea utilizării compușilor tiolici (raportului procentual SH-liber/SH-total) și micșorarea disulfurilor (SS) și raportului SS/SH-liber și SS/SH-total. Imupurinul, similar dexametazonei, a intensificat utilizarea compușilor tiolici fără a influența statutul prooxidant.

4. Dexametazona în inflamația subacută a diminuat nivelul citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) și antiinflamatorii (IL-10), în timp ce imuheptinul a redus esențial conținutul IL-6 și TNF-alfa, iar imupurinul a restabilit balanța citokinelor prin micșorarea nivelului citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) și majorarea semnificativă a citokinei antiinflamatorii IL-10 comparativ cu lotul control cu inflamație.
5. Inflamația subacută, indusă prin adjuvantul Freund, a determinat dezvoltarea stresului oxidativ cu majorarea statutului prooxidant (DAM, MRO, SS, SS/SH-libere, SS/SH-totale) și diminuarea celui antioxidant (SOD), inițierea proceselor proliferative (majorarea SH-libere, SH-totale) și degenerative (creșterea SS). Imuheptinul și imupurinul, similar dexametazonei în aceste condiții au anihilat moderat stresul oxidativ prin micșorarea DAM ȘI MRO, creșterea SOD, intensificarea utilizării grupelor tiolice (micșorarea SH-libere și SH-totale), dar nu au influențat statutul prooxidant (reducerea raportului procentual SH-libere/SH-totale).

## SINTEZA REZULTATELOR

Proprietățile antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului au fost testate *in vitro* prin determinarea acțiunii membranostabilizatoare (testul de hemoliză oxidativă), capacității antioxidante (testul ABTS) și activității paraoxonazei/arilesterazei (PON1). Extractul etanolic imuheptin 333,3 μg/ml, extractul etanolic și hidric imupurin în concentrațiile 333,3 μg/ml au determinat cea mai marcată acțiune de stabilizare a membranei eritrocitelor pe parcursul a 180 minute, fiind superioară antioxidanților trolox și acidul ascorbic, cât și antiinflamatorului nesteroidian - diclofenac. Extractul etanolic și hidric de imupurin în concentrațiile 111,1 μg/ml au demonstrat o capacitate de stabilizare a membranei hematiilor similar cu diclofenacul în concentrația 11,1 μg/ml, dar superioară antioxidanților. Extractul hidric imuheptin 333,3 și 111,1 μg/ml, extractul etanolic și hidric imupurin în concentrațiile 37 μg/ml au determinat o acțiune membranostabilizatoare a eritrocitelor superioară acidului ascorbic. Concomitent, diclofenacul în concentrația de 33,3 μg/ml a diminuat stabilitatea hematiilor deja după 60 minute (anexa 9). Astfel, imupurinul a demonstrat cea mai marcată acțiune membranostabilizatoare a hematiilor în comparație cu imuheptinul, troloxul, acidul ascorbic și diclofenacul.

În cadrul testului de hemoliză oxidativă *in vitro*, indus prin reagentul 2,2'-azobis(2-amidinopropan) (AAPH) diclorhidrat, s-a demonstrat creșterea marcată a radicalilor liberi intracelulari (alchil, peroxil) cu deteriorarea lipidelor și proteinelor membranei eritrocitelor și hemoliza hematiilor. S-a relatat, că creșterea hemolizei oxidative a fost minimă la 2 ore și maximă la 4 ore și 6 ore după tratamentul cu AAPH. Stabilitatea eritrocitelor până la 2 ore se explică prin faptul, că în hematii există antioxidanți endogeni care captează radicalii liberi induși de AAPH, iar expunerea continuă a eritrocitelor la AAPH a determinat utilizarea maximă a antioxidanților endogeni cu creșterea marcată a hemolizei. S-a constatat, că hemoliza oxidativă a eritrocitelor s-a manifestat prin creșterea nivelului DAM și diminuarea activității SOD și conținutului GSH, parametri ce sugerează despre vulnerabilitatea eritrocitelor la stresul oxidativ indus de AAPH. Depleția nivelului celular de GSH a corelat cu creșterea peroxidării lipidelor și a oxidării proteinelor, iar deteriorare oxidativă a lipidelor și proteinelor a destabilizat scheletul membranei cu hemoliza eritrocitelor. Scăderea activității SOD s-a datorat utilizării acesteia pentru neutralizarea radicalilor liberi [170].

Pulberea de perle, la incubarea eritrocitelor cu AAPH, a inhibat remarcabil formarea DAM, a suprimat formarea de proteine cu greutate moleculară mare indusă de AAPH și a crescut concomitent proteinele cu greutate moleculară mică din eritrocite. S-a demonstrat, că pulberea de perle a inhibat hemoliza indusă de AAPH, peroxidarea lipidelor și deteriorarea arhitecturală a

proteinelor membranei eritrocitelor. S-a constatat, că pretratarea eritrocitelor cu pulberea de perle a crescut activitatea SOD și nivelul GSH într-o manieră dependentă de concentrație și timp. Aceste date au demonstrat, că pulberea de perle a atenuat hemoliza indusă de radicalii liberi și deteriorarea oxidativă a lipidelor/proteinelor membranei eritrocitelor. S-a relatat, că perlele sunt bogate în aminoacizi, oligoelemente, calciu și proteine, componente care pot contribui la inhibarea producției de radicali liberi și la prevenirea hemolizei oxidative. S-a raportat, de asemenea, că flavonolii și glicozidele, antioxidanți eficienți, au protejat eritrocitele umane de hemoliza oxidativă, indusă de radicalii liberi. S-a demonstrat, că pulberea de perle a fost eficientă în eliminarea radicalilor liberi induși de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), a diminuat peroxidarea lipidelor și a crescut statusul antioxidant în celule. S-a concluzionat, că datorită proprietăților antioxidante, pulberea de perle a crescut conținutul GSH și activitatea SOD și a scăzut nivelul de DAM în eritrocite, iar prin conținutul de calciu, aminoacizi, proteine și oligoelemente are loc încetarea reacției în lanț de peroxidare a lipidelor și majorarea potențialului antioxidant endogen. Tratamentul cu pulberea de perle a preîntâmpinat epuizarea GSH și a suprimat peroxidarea lipidelor, ce indică faptul că, produsul moluștelor a prevenit hemoliza eritrocitelor și modificarea oxidativă a proteinelor și lipidelor membrane, parțial, datorită ameliorării stării antioxidante. Reziduurile de cisteină, prin gruparea tiol, sunt capabile să doneze un echivalent reducător sau un electron radicalilor instabili, diminuându-le reactivitatea; a fost raportat că acest mecanism este important pentru activitatea antioxidantă a unei proteine. Astfel, aminoacizii prezenți în pulberea de perle pot participa la biosinteza și majorarea nivelului GSH în eritrocite. În cadrul studiului s-a raportat, că diverse proteine din perle conțineau aminoacizi similari, inclusiv, glicină, acid glutamic, arginină, cisteină și lizină, care contribuiau la stimularea activității antioxidante în condiții de stres oxidativ. Creșterea activității SOD dezvăluie că pulberea de perle posedă o activitate antioxidantă puternică, care contribuie la eradicarea radicalilor anioni superoxid induși de AAPH. Nivelul crescut de GSH și scăderea DAM susțin și mai mult efectele protectoare ale pulberii de perle împotriva stresului oxidativ indus de AAPH. S-a documentat, că pulberea de perle conține proteine solubile în apă, acid și conchiolin, cu profil aproape similar de aminoacizi, care constituie molecule vitale pentru a crește potențialul antioxidant al celulelor expuse la radicali foarte reactivi. S-a demonstrat, că concentrațiile mai mari de oligoelemente, Cu și Se, în eritrocite au contribuit la creșterea activității SOD (dependente de Cu) și a glutatation peroxidazei (dependente de Se) și la o scădere a nivelului DAM în plasmă. Astfel, aminoacizii și oligoelementele prezente în pulberea de perle sunt de așteptat să promoveze activitatea SOD a eritrocitelor pentru a stinge radicalii liberi toxici [170].

Extractele etanolic și hidric de imuheptin și imupurin în concentrațiile 125-1000 μg/ml au demonstrat capacitatea de a crește activitatea paraoxonazei/arilesterazei, superioară diclofenacului și antioxidanților (trolox, acid ascorbic). În aceste condiții extractele imuheptinului s-au dovedit mai activi față de cele ale imupurinului, iar extractele hidrice ale preparatelor au fost mai active ca cele etanolice (anexa 2, anexa 3).

Familia paraoxonazei (PON) este compusă din PON1, PON2 și PON3, dintre care PON1 și PON3 sunt enzime plasmatică, iar PON2 intracelulară. PON1 actualmente este clasificată ca arildialchilfosfatază. Funcțiile PON1 se reduc la detoxificarea substratelor organofosforice și metalelor grele, constituie un component al sistemului antioxidant și prezintă proprietăți antiinflamatorii și antiaterogene. PON1 se consideră o hidrolază legată de HDL, dependentă de Ca, activă pentru o mare varietate de substraturi. Enzima prezintă activități de lactonază, paraoxonază, arilesterază și fosfotriesterază. Concentrația și activitatea PON1 este foarte variată, care poate fi determinată de factorii genetici și de reglarea epigenetică față de numeroși factori de mediu prin mecanisme directe și indirecte. PON1 este capabilă să inactiveze un număr mare de compuși care apar în mod anormal. Toate PON sunt capabile să inactiveze factorul de detectare a bacilului piocianic, un derivat al lactonei N-acil homocisteinei. Cercetările recente au demonstrat, că PON1 este activă față de unele eicosanoide-δ-lactone naturale (cicloepoxiciclopentona, lactona acidului 5,6-dihidro-eicosatrienoic), derivați din acidul arahidonic. Studiile referitor la activitatea antioxidantă au relevat, că PON1 poate hidroliza peroxidul de hidrogen, o formă activă a oxigenului produsă în aterogeneză. Activitatea antioxidantă se consideră a fi determinată de faptul, că PON1 este o componentă a HDL, responsabilă pentru acțiunea antioxidantă. Studiile experimentale au arătat, că PON1 reduce aterogenitatea lipoproteinelor datorită capacității de a hidroliza lipolactona. PON1 joacă un rol important în hidroliza specifică a peroxizilor lipidici cu reducerea ratei de absorbție de macrofage a LDL oxidate. Concomitent, PON inhibă eliberarea de anioni superoxid de macrofage și crește conținutul de GSH celular. S-a estimat, că capacitatea PON1 de a crește legarea HDL de macrofage și activitatea de protecție de oxidare a LDL este determinată de cuplarea PON1 de membrana plasmatică, probabil fosfolipidele celulare, a macrofagelor cu cumulara în citosolul acestora sub formă biologic activă [83, 90].

PON1 se consideră proteină responsabilă pentru majoritatea proprietăților antioxidante ale HDL. PON1 purificat protejează HDL și LDL de oxidarea catalizată de ionii de cupru prin inhibarea oxidării HDL indusă de cupru prin prelungirea fazei de întârziere a oxidării și reduce conținutul de peroxid și aldehydă în HDL oxidat. La incubarea PON1 purificată cu peroxid de hidrogen sau peroxizi lipidici are loc descompunerea parțială a acestora. PON1 este eficientă în

special în descompunerea hidroperoxidilor de linoleat. Mecanismul antioxidant exact al PON1 nu este pe deplin elucidat, deși se știe că protecția nu este cauzată de chelarea ionilor de cupru sau din cauza potențialului transfer de lipide de la LDL la HDL. Existența unui mecanism enzimatic este susținută de observația că inactivarea termică a PON1 purificat elimină efectul său antioxidant [83, 90].

Activitatea antiinflamatoare a PON1 poate fi determinată de: atenuarea secreției endoteliale a proteinei chemoattractante-1 (MCP-1), responsabilă de recrutarea monocitelor în spațiul subendotelial și migrarea către locul inflamației unde se transformă în macrofage și inițiază formarea celulelor spumoase; inhibarea moleculei de adeziune intracelulară-1 (ICAM-1), un factor inflamator, care determină oxidarea LDL; hidroliza factorului de activare a trombocitelor (PAF), un mediator proinflamator, care stimulează monocitele să migreze și să se transforme în macrofage; inhibarea secreției de citokine proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) în macrofagele stimulate [83].

Studiile clinice realizate la persoanele din populația generală au examinat relația dintre activitatea paraoxonazei și arilesterazei și nivelul markerilor proinflamatori (IL-6, proteina C reactivă de înaltă sensibilitate (PCR), TNF-alfa, leptina). S-a constatat, că creșterea nivelului leptinei, PCR și IL-6 a fost asociată cu majorarea activității arilesterazei, iar a leptinei cu creșterea activității paraoxonazei și arilesterazei. În același timp, nu s-a determinat nici o corelație între nivelul TNF-alfa și activitatea paraoxonazei și arilesterazei. Citokina IL-6, cu proprietăți pro- și antiinflamatoare, este un determinant primar al producerii hepatice de PCR. Nivelul IL-6 este foarte mic în condiții normale, dar crește semnificativ în inflamație. Studiile experimentale au arătat, că IL-6 și TNF-alfa reglează în sens pozitiv și negativ expresia genei PON1, ce sugerează, că markerii inflamatori ar putea influența activitatea PON1. Activitatea antioxidantă a PON1 este determinată de cuplarea cu HDL în sânge și transportarea în țesuturi, unde se leagă de membranele celulare cu protecția lipidelor de peroxidare și oxidare a LDL, cauza inflamației și este responsabilă de inițierea maladiilor inflamatorii (ateroscleroza, DZ, cancerul). În aceste stări HDL își pierde proprietățile antioxidante și antiinflamatorii datorită diminuării activității PON1 [98].

Edemul urechii indus de xilen a fost adoptat ca model de inflamație acută folosit frecvent pentru a evalua efectele antiinflamatorii ale produselor naturale, îndeosebi pentru screening-ul preparatelor cu presupusă activitate antiinflamatoare. Administrarea de xilen a indus un răspuns inflamator acut cu dezvoltarea procesului exudativ (acumularea de lichid și edem), caracterizat prin tumor, rubor, calor, dolor datorită eliberării de mediatori proinflamatori din neuronii, care acționează asupra celulelor țintă periferice (mastocite, celule imunitare). Suprimarea edemului

produs de xilen este un indiciu probabil al efectului antiflogistic (antiexudativ) și argumentează necesitatea cercetărilor mai aprofundate ale efectului antiinflamator al acestor preparate [29].

Un model important de studiu al proprietăților inflamatorii ale preparatelor cercetate constituie stimularea macrofagelor peritoneale prin LPS. La stimularea macrofagelor prin LPS s-a constatat creșterea nivelului citokinelor proinflamatorii (TNF- $\alpha$ , IL-6), dar și celei antiinflamatoare (IL-10) și declanșarea stresului oxidativ, relevat prin majorarea nivelului DAM și PPOA și micșorarea activității GR și GPO. Concomitent, s-a determinat o creștere compensatorie a nivelului CP și activității SOD, GST. Imuheptinul și imupurinul au contribuit la atenuarea procesului inflamator prin modularea nivelului markerilor inflamației relevat prin reducerea nivelului citokinelor proinflamatorii și majorarea celei antiinflamatorii. Preparatele cercetate au determinat anihilarea stresului oxidativ prin micșorarea nivelului DAM, PPOA, AGE și modularea activității catalazei, SOD, GR, GPO și GST (anexa 9).

Activarea macrofagelor este importantă în răspunsul imun și inflamator, care se declanșează după ce produsele microbiene interacționează cu receptorii de recunoaștere a paternelor (PRR) prezenți în membranele macrofagelor. LPS din peretele celular al bacteriilor gram negative sunt un exemplu clasic de produs microbial, care poate activa macrofagele prin PRR și poate induce producția de citokine proinflamatorii (IL-6, IL-1, TNF) și citokine imunostimulatoare (IL-12). În acest context, studiul activității antiinflamatoare *in vitro* a produselor de diferită genă (vegetală, marină etc.) prin capacitatea de a reduce producerea de citokine proinflamatorii indusă de LPS poate explica mecanismele de acțiune ale acestora, precum prezența unor substanțe care inhibă sau concurează cu ligandul LPS, receptorul TLR4 sau molecula CD14, care este co-receptor pentru LPS sau se leagă cu unele molecule de pe suprafața macrofagelor, inhibând semnalele biochimice induse de LPS pentru producerea de citokine proinflamatorii [29].

Macrofagele sunt folosite pentru studiul proceselor inflamatorii și cercetarea potențialelor substanțe cu efect antiinflamator. Macrofagele sunt prezente în toate țesuturile și sunt dedicate menținerii integrității țesuturilor, homeostaziei și echilibrului. Adaptarea și eterogenitatea macrofagelor se reflectă asupra modelelor de expresie a genelor și producerii de citokine, orchestrate pentru a regla fin răspunsurile inflamatorii. Macrofagele activate, în funcție de stare, sunt clasificate în macrofage activate clasic (proinflamatorii, M1) și activate alternativ (antiinflamatorii, M2). Macrofagele M1 proinflamatorii inițiază faza acută a inflamației prin producerea de citokine proinflamatorii (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ ), prezentând o explozie oxidativă, producere de oxid nitric (NO) și activitate antibacteriană. Macrofagele M2 mediază răspunsurile imune antiparazitare și rezoluția inflamației prin producerea unei game de molecule

antiinflamatorii (TGF- $\beta$ , IL-10). Activarea macrofagelor este un proces complex, care implică diferite căi de semnalizare intracelulară, studiile relevând existența mai multor populații de macrofage care exprimă profiluri distincte ale genelor pro- și antiinflamatorii [82].

Lipopolizaharidele stimulează macrofagele peritoneale de șobolan prin creșterea transcripției iNOS și a citokinelor proinflamatorii, inclusiv TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  și IL-6. Lipopolizaharidele au activat semnificativ transcripția și producerea de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  și IL-6, prin activarea căilor de semnalizare MAPK și NF- $\kappa$ B [160].

Glucocorticoizii (GC) joacă un rol important în reglarea răspunsului inflamator și imun, acționând asupra majorității tipurilor de celule imune. Glucocorticoizii pot: regla fenotipul, supravețuirea și funcțiile monocitelor și macrofagelor; prezenta efecte antiapoptotice, care promovează supraviețuirea macrofagelor antiinflamatorii; îmbunătăți activitatea fagocitară a macrofagelor; stimula clearance-ul neutrofilelor; inhiba eliberarea mediatorilor proinflamatorii (citokine, chemokine etc.) și specii reactive de oxigen; regla maturarea, supravețuirea și migrarea către ganglionii limfatici și funcționalitatea celulelor dendritice. Glucocorticoizii inhibă factorii de transcripție, care controlează sinteza mediatorilor proinflamatori, inclusiv macrofagele, eozinofilele, limfocitele, mastocitele și celulele dendritice. Un alt efect important este inhibarea fosfolipazei A2, responsabilă pentru producerea de mediatori proinflamatori. Glucocorticoizii inhibă genele responsabile de expresia ciclooxigenazei-2, iNOS și citokinelor proinflamatorii. Concomitent, GC induce creșterea lipocortinei și anexinei A1, cu reducerea ulterioară a sintezei prostaglandinelor și leucotrienelor [88, 163].

Studiile *in vitro* au demonstrat, că LPS stimulează activitatea macrofagelor prin creșterea eliberării de citokine proinflamatorii. Extractul din larvele de *Musca domestica*, care conține proteine cu greutate moleculară mică, a redus producerea de TNF- $\alpha$  și IL-6. Se consideră, că efectul antiinflamator poate fi cauzat de scăderea expresiei factorului nuclear de transcripție NF- $\kappa$ B [40].

Extractul din hemocitele speciei *Bombyx mori* (vierme de mătase) a diminuat inflamația indusă de LPS bacteriilor gram-negative prin inhibarea expresiei iNOS și COX-2, precum și a citokinelor proinflamatorii IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 și TNF - $\alpha$ . S-a sugerat că aceste efecte pot fi cauzate de influența asupra căii NF- $\kappa$ B, care mediază numeroase gene, responsabile de expresia mediatorilor proinflamatori [81].

Extractele apoase și hidrolizatele unor insecte conțin peptide bioactive cu activitate antiinflamatoare și antioxidantă. Extractul apos și alcoolic din larve conține flavonoide (catechina, rutina, quercetina, naringenina etc.) și compuși fenolici (resveratrol, acid cafeic, acid ferulic, acid rosmarinic etc.), care a inhibat migrarea MCF7. Extractul apos, în special cel



alcoolic din larve, a demonstrat acțiunea antiinflamatoare prin reducerea expresiei genelor NF $\kappa$ B și IL-8. Extractele din larve ar putea inhiba proliferarea MCF7 prin inducerea apoptozei, activarea sistemului antioxidant și inhibarea migrării celulelor și inflamației [176].

Incubarea macrofagelor cu dexametazonă timp de 24 ore a provocat o reducere a nivelului IL-1beta, ce demonstrează despre diminuarea activității macrofagelor implicate în procesul inflamator [192].

La modelarea inflamației subacute prin implantarea discurilor de fetru s-a constatat dezvoltarea unui process inflamator manifestat prin majorarea nivelului citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) și micșorarea conținutului celei antiinflamatoare (IL-10). Concomitent, s-a determinat dezvoltarea stresului oxidative relevat prin majorarea nivelului markerilor prooxidanți (DAM, AGE, PPOA) și diminuarea celor antioxidanți (CP, SOD, catalazei, GPO). Imuheptinul și imupurinul au contribuit la diminuarea intensității procesului inflamator prin reducerea nivelului citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) și majorarea celei antiinflamatorii (IL-10). Preparatele cercetate au contribuit la modularea stresului oxidativ prin micșorarea nivelului DAM și creșterea nivelului CP, activității catalazei, GR și GPO (anexa 12).

La pătrunderea corpurilor străini, precum implantarea discurilor de fetru, se inițiază producerea oxidului nitric sub acțiunea nitric oxid sintazei. Ulterior, se activează cascada de mediatori proinflamatori și citokine, care include COX-2, interleukinele IL-1 $\beta$  și IL-6, și TNF-alfa. Acești mediatori proinflamatori și citokinele determină activarea căii inflamatorii clasice, factorului nuclear NF- $\kappa$ B și protein kinazei activate de mitogeni (MAPK) cu declanșarea unui răspuns inflamator necontrolat. Utilizarea veninului de viespe a suprimat producerea de oxid nitric și a redus expresia ARNm ale IL-1 $\beta$ , IL-6 și TNF- $\alpha$  [135].

Majoritatea organismelor folosesc respirația celulară aerobă cu producerea de energie pentru funcționarea lor, dar provoacă și efecte secundare din metabolism sub formă de radicali liberi. Organismele vii folosesc antioxidanți exogeni și endogeni pentru a se eschiva de efectele dăunătoare ale prezenței radicalilor, iar studiile privind activitatea antioxidantă a substanțelor origine vegetală, animalieră, entomologică sau din materialul biologic reprezintă obiectul interesului cercetătorilor de mulți ani. Activitatea antioxidantilor poate fi testată folosind diferite tehnici analitice referitoare la proprietățile compușilor cercetați, etapele procesului oxidativ și la înțelegerea rolului antioxidantilor [164].

Antioxidanții sunt compuși capabili să contracareze efectele proceselor oxidative în celule sau sisteme exogene, reacționând în special cu specii reactive de oxigen sau azot sau cu alți radicali liberi sau molecule instabile, generate în timpul reacțiilor oxidative metabolice

normale. Sistemele antioxidante includ enzime (SOD, catalaza, GP, GR, GST) și substraturi neenzimatică (glutathionul, coenzima Q, acidul ascorbic, retinoli, tocoferoli, flavonoidele, carotenoidele etc.). Antioxidanții sunt prezenți în produsele de origine vegetală, animalieră sau entomologică, în suplimentele alimentare. Capacitatea antioxidantă este o capacitate generală a organismelor sau compușilor de a interacționa cu radicalii liberi și de a preveni efectul nociv al acestora. Efectul antioxidant include protecția celulelor și a structurilor celulare de afectarea radicalilor liberi, în special oxigenul și azotul [7, 8, 35, 157, 164].

Enzimele metabolismului glutationic: GR, GPO și GST constituie un grup de antioxidanți, ce asigură protecția celulelor de acțiunea SRO și SRN și produsele peroxidării lipidelor. Rolul principal în degradarea hidroperoxidilor revine sistemului enzimatic GPO/GR. Glutathionreductaza are o repartizare variabilă în organe și organitele intracelulare, ce asigură menținerea nivelului optim de GSH prin reducerea GSH oxidat (GSSG). Enzima permite de a reduce considerabil necesitate în sinteza *de novo* a GSH din aminoacizii corespunzători. Funcționarea GR este în corelație permanentă cu GPO și GST, enzime, care oxidează GSH în procesele de reducere a peroxidilor, glutaredoxina și protein disulfidizomeraza, ce asigură reducere disulfidelor, precum și cu ribonucleotidreductaza, ce asigură reducerea ribonucleotidelor [6, 156].

Glutathion peroxidaza catalizează scindarea peroxidului de hidrogen și peroxidilor organici prin utilizarea GSH și trecerea lui în GSSG. Această enzimă este în relații de competiție, datorită localizării diferite intracelulare, cu catalaza și SOD în neutralizarea excesului de peroxid de hidrogen și peroxizi organici, ce asigură o funcționare eficientă a acestor enzime. Glutathionperoxidaza în mitocondrii și peroxizomi lucrează în tandem cu catalaza, iar în citoplasmă cu SOD, ceea ce asigură, de rând cu antioxidanții neenzimatici, protecția structurilor subcelulare și modularea procesului de activare a oxigenului cu dereglarea formării radicalului hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ) [6, 156].

Glutathion-S-transferaza catalizează conjugarea GSH cu compuși organici electrofili, o reacție importantă de detoxifiere a produselor exogene și neutralizarea substanțelor endogene în cadrul proceselor fiziologice de eliminare a deșeurilor metabolice [6, 156].

Produse finale de glicare avansată (AGE) sunt un grup eterogen de produse ireversibile, care rezultă din glicarea neenzimatică și oxidarea proteinelor, acizilor nucleici și lipidelor. Glicarea produce compuși AGE cu proprietăți toxice asociate cu inflamația și stresul oxidativ. Produsele AGE se cumulează în matricea extracelulară a diferitelor țesuturi și contribuie în mod critic la bolile cronice, devin antigenice și induc răspunsuri imune, au efecte adverse asupra funcțiilor celulare prin reticularea proteinelor intracelulare și extracelulare, care declanșează

diverse maladii. Glicarea proteinelor are loc atât în stare normală, cât și în stări patologice (hiperglicemie, dezechilibre redox, îmbătrânire, boli de rinichi sau boli autoimune) cu formarea AGE ireversibile prin conversia aducțiilor de bază Schiff reversibili în produse de rearanjare Amadori mai stabile, legați covalent și, în final, reacția Maillard. S-a constatat, că nivele majorate de AGE susțin formarea de SRO și SRA care, la rândul lor, induc formarea ulterioară de AGE. Produsele AGE, inclusiv cele eliberate de macrofagele activate, induc stresul oxidativ prin activarea receptorilor AGE (RAGE) cu disfuncția mitocondrială, cumulara de  $Ca^{2+}$  și moartea celulară [30].

Produșii finali de glicare avansată (AGE) sunt molecule eterogene, reactive și cu reticulare ireversibilă formate prin glicarea neenzimatică a proteinelor, lipidelor și acizilor nucleici și sunt unul dintre semnalele endogene a proceselor patologice inflamatorii. AGE interacționează cu receptorul AGE (RAGE) și/sau receptorul TLR4 pentru a induce răspunsuri inflamatorii (producerea de citokine). S-a demonstrat, că tratamentul cu AGE a crescut secreția de IL-6, expresia ARNm a IL-6 în macrofage. Concomitent administrarea de AGE nu a influențat secreția de IL-1 $\beta$  cu reglarea expresiei ARNm de IL-1 $\beta$ . S-a confirmat, că receptorii RAGE și TLR4 au fost exprimați în macrofage. Administrarea antagoniștilor RAGE sau TLR4, urmat de adăugarea AGE la 1 oră după tratamentul cu blocantul, a arătat că secreția IL-6 indusă de AGE a fost inhibată prin pretratament cu antagonistul RAGE și TLR4. Tratamentul cu AGE a indus o suprareglare a conținutului de proteină NF-kB p65 în macrofage, iar administrarea inhibitorului NF-kB a redus secreția de IL-6 indusă de AGE, sugerând că AGE stimulează secreția de IL-6 într-o manieră dependentă de NF-kB. S-a demonstrat, că AGE stimulează producerea de SRO, iar secreția de IL-6 indusă de tratamentul cu AGE sugerează că producerea de SRO implică inflamație indusă de AGE. Această ipoteză a fost susținută de investigațiile care au demonstrat, că pretratamentul cu antioxidantul N-acetilcisteină (NAC) a inhibat secreția de IL-6 din macrofagele tratate cu AGE, ce indică faptul că producerea de SRO este un factor cheie în secreția IL-6 în macrofagele murine [111].

Produsele proteice de oxidare avansată (PPOA), considerate ca un marker nou al leziunii proteice mediate de oxidanți, conțin ditirozină și produse proteice formate în timpul stresului oxidativ prin reacția albuminei plasmatică cu oxidanții clorurați. Nivele crescute de PPOA au fost determinate în plasma pacienților aflați în dializă, la subiecții cu diabet zaharat, sindrom metabolic, boli inflamatorii cronice intestinale și obezitate, ceea ce poate sugera că cumulara de PPOA ar putea fi cauzată de unele afecțiuni patofiziologice. Stresul oxidativ generează specii reactive de oxigen (SRO), ca urmare a dezechilibrului dintre peroxidare și sistemele de apărare antioxidantă. Concentrația plasmatică de PPOA este strâns corelată cu nivelul de ditirozină,

semnul distinctiv al proteinei oxidate, și pentozidină, markerul glioxidării proteinelor, induse de stresul oxidativ. Daunele oxidative ale proteinelor sunt reflectate de niveluri crescute de PPOA. Produsele proteice de oxidare avansată s-au dovedit a fi o moleculă efectoră, care participă la multe procese biologice. S-a raportat, că PPOA pot induce disfuncție endotelială vasculară și accelera ateroscleroză prin creșterea nivelului de stres oxidativ și supraexprimarea factorului inflamator, pot declanșa explozia respiratorie și inflamația prin activarea celulelor imune, precum monocitele [61, 177].

În infecția SARS-CoV-2 s-a raportat relația dintre inflamație și deteriorarea stării pacientului, iar „furtună de citokine” este considerată a fi un factor major pentru deteriorarea stării pacientului și a disfuncției poliorganice. Concomitent s-a estimat, că există o corelație puternică între inflamație și stresul oxidativ (SO). Studii recente au postulat, că SO ar putea fi la intersecția dintre inflamație și disfuncția microvasculară. Pe lângă infiltrarea neutrofilelor și eliberarea excesivă de SRO, infecțiile virale s-au dovedit a scădea apărarea antioxidantă. Infecția cu SARS-CoV-2 poate duce, de asemenea, la leziuni celulare care pot iniția răspunsuri la stres toxic și inflamator. SO provoacă modificări moleculare precum carbonilarea albuminei și formarea de PPOA, acestea din urmă fiind buni indicatori ai gradului de deteriorare oxidativă. Mai mult, leziunea SRO pot induce modificări structurale în regiunea N-terminală a albuminei cu formarea albuminei modificate de ischemie (IMA). S-a estimat, că explozia oxidativă, reflectată de dezechilibrul dintre biomarkerii antioxidanți (tiol) și pro-oxidanți (PPOA, IMA), ar putea corela cu severitatea COVID-19, iar biomarkerii SO, inflamației și de activare celulară ar putea servi ca prognostic la acești pacienți [50].

S-a constatat o corelație semnificativă dintre nivelele crescute de biomarkeri pro-oxidativi (IMA, PPOA), nivelele scăzute de biomarkeri antioxidanți (tiolul total) și biomarkerii inflamatori (IL-6, PCR și procalcitonina (PCT), calprotectina). Concentrația de tiol în plasmă este constituită din tiolul albuminei serice, cel mai abundent, predominant în formă redusă (75%), și tiolul cu masa moleculară mică. Scăderea tiolului total din plasmă reflectă în principal scăderea albuminei reduse, la care aminoacizii metionina și cisteina reprezintă 40-80% din activitatea antioxidantă totală a albuminei și determină captarea preferată a SRO. Albumina poate suferi o oxidare ireversibilă, ceea ce îi afectează proprietatea antioxidantă, cu diminuarea nivelului ei în plasmă. Hipoalbuminemia se consideră o caracteristică a inflamației, inclusiv la pacienții cu COVID-19 aflați în furtuna citokinică, prin relația inversă dintre albumină și PCR sau IL-6, dar ar putea fi și consecința clearance-lui ridicat al formei oxidate a albuminei. Stresul oxidativ provoacă alte modificări moleculare, precum carbonilarea albuminei serice și formarea PPOA, iar aceste produse finale stabile sunt considerate a fi indicatori ai gradului de deteriorare

oxidativă. S-a demonstrat că leziunea radicalilor liberi induce modificări structurale în regiunea N-terminală a albuminei [50].

Celulele imune induc secreția de IL-1 $\beta$ , una dintre citokinele proinflamatorii majore, sub formă de precursorul IL-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) reglată de caspaza-1 (enzimă de conversie a IL-1 $\beta$ ) datorită activării inflamazomilor, inclusiv a inflamazomilor NLRP3. AGE și LPS au reglat semnificativ expresia ARNm a IL-1 $\beta$ , dar nu au influențat asupra secreției de IL-1 $\beta$  în macrofage, ce sugerează că AGE și LPS joacă rol în producția de pro-IL-1 $\beta$ , dar nu și în activarea inflamazomului.

AGE și/sau LPS se leagă și semnalează prin receptori multivalenți, cum ar fi RAGE și/sau TLR (TLR2 și TLR4), expresia cărora a fost confirmată în macrofage. Blocarea RAGE sau TLR4 a abolit inflamația indusă de AGE, iar inhibitorul TLR-4 a redus secreția IL-6 indusă de LPS în macrofage. La utilizarea anticorpilor de neutralizare s-a demonstrat că AGE a stimulat secreția de IL-6 prin RAGE și/sau TLR4, în timp ce LPS a îmbunătățit-o prin TLR4. Factorul nuclear-kB este o componentă cheie în producerea de citokine inflamatorii. Studiile *in vitro* au demonstrat că AGE și LPS au crescut eliberarea IL-6, în funcție de activarea NF-kB în diferite tipuri de cellule, prin translocarea nucleară a NF-kB și induc direct răspunsuri la inflamație prin calea de activare RAGE și/sau TLR4-NF-kB [111].

AGE și LPS au stimulat producția de SRO, mediatori ai inflamației acute, esențiale pentru inducerea secreției IL-6, prin calea RAGE/NF-kB și TLR4. Compușii cu acțiune antioxidantă (resveratrol) inhibă translocarea NF-kB indusă de LPS și secreția de citokine inflamatorii în linia celulară de macrofage murine, precum și secreția IL-6 indusă de LPS și AGE în macrofage. Resveratrolul a suprimat în mod semnificativ producția intracelulară de IL-6 și expresia ARNm a IL-6 prin controlul inhibitor la nivel transcriptional, datorat activării căii sirtuinei 1 (SIRT1) și adenzin monofosfat-activat protein kinazei (AMPK) [111].

Numeroase studii au indicat că AGE și LPS promovează producția de mediatori proinflamatori (IL-6, IL-1 $\beta$  și TNF $\alpha$ ) în diferite tipuri de cellule (macrofage, condrocite, celule endoteliale). S-a demonstrat că AGE și LPS au crescut secreția de IL-6 în urma inducerii exprimării ARNm a IL-6 în liniile celulare de macrofage murine. S-a constatat că LPS reglează diferențierea macrofagelor în fenotipul M1 proinflamator. S-a raportat că AGE promovează diferențierea macrofagelor în fenotipul M1 proinflamator [111].

Organismul uman are capacitatea de a elimina radicalii liberi sau de a repara prejudiciile produse de aceștia prin sisteme de apărare prompte și eficiente, inclusiv sistemul redox tiol-disulfuri. Tiolii plasmatici sunt constituiți din tioli proteici (proteine, în special, albumina) și tioli nonproteici (cisteina, homocisteina, glutatiunul, gama-glutamilcisteina, cisteinil-glicina). Tiolii

reprezintă 52,9% din capacitatea totală antioxidantă a serului și sunt primii antioxidanți consumați în caz de stres oxidativ. Dovezile din ultimii ani au confirmat, că sistemul tiol-disulfuri poate fi evaluat ca răspuns adaptativ în condiții de inflamație cronică și stres oxidativ. Tiolii, compuși nucleofili și susceptibili la atacuri electrofile, funcționează ca un sistem de captare a radicalilor liberi și speciilor reactiv oxidante. În acest context compușii tiolici pot interacționa cu: speciile reactive de oxigen (SRO) cu formarea punților disulfurice intra- și intermoleculare; speciile reactive de azot (SRN) cu declanșarea reacțiilor de nitrare și nitrozilare a tiolului; speciile carbonil reactive (SCR) cu stimularea formării aductelor [106].

Tiolii plasmatici sunt constituiți din tioli proteici (preponderent albumina) și nonproteici (cisteina, homocisteina, glutatiunea, gama-glutamil-cisteina, cistenil-glicina) și reprezintă circa 53% din capacitatea antioxidantă a serului și sunt primii antioxidanți consumați în caz de stres oxidativ. Tiolii, ca compuși nucleofili și susceptibili la atacurile electrofile, funcționează ca un sistem de captare a radicalilor liberi și speciilor reactive oxidante. Compușii electrofile, precum speciile reactive ale oxigenului, azotului și carbonilice, polarizează legătura –SH, scad constanta de disociere și cresc vulnerabilitatea la modificările oxidative. Sistemul tiol-disulfuri poate fi evaluat ca răspuns adaptiv în condițiile de inflamație cronică și stres oxidativ. Tiolul liber și total, raportul SH-liber/SH-total caracterizează potențialul antioxidant al serului, iar disulfurile, raportul SS/SH-liber și SS/SH-total statusul prooxidant. Reducerea nivelului grupelor SH libere și SH totale indică, că acești compuși au fost consumați datorită stresului oxidativ prezent într-un anumit context patologic. Reducerea raportului SS/SH totale poate sugera că mecanismele antioxidante au fost eficiente, adică activitatea antioxidantă protectivă a fost crescută în acea fază a bolii. Creșterea nivelului grupelor SH libere și SH totale și scăderea nivelului disulfurilor sunt asociate cu boli proliferative, în timp ce nivelul mai scăzut de SH și nivelul SS mai mare sunt asociate cu boli degenerative [106].

Echilibrul tiol-disulfuri și sistemul redox extracelular este strict reglat printr-o varietate de mecanisme și de o multitudine de procese moleculare. Homeostazia tiol-disulfidică (HTD) joacă un rol cheie în patogeneza multor boli, inclusiv cancer, infecții, inflamație. Modificarea HTD spre statusul oxidant afectează apărarea antioxidantă, apoptoza, proliferarea, detoxifiere, transcripție, reglarea activităților enzimatică, semnalizarea. Menținerea unor nivele adecvate de tioli oxidabili, turnover-ul și starea de oxidare sunt importante pentru desfășurarea normală a funcțiilor celulare, iar modificări în aceste procese determină apariția diverselor patologii. Alterarea HTD se manifestă printr-o susceptibilitate crescută la stres oxidativ, iar prejudiciul rezultat este considerat a fi un pas cheie în debutul și progresia mai multor boli. Concomitent,

nivele majorate de tioli, creșterea capacității antioxidante și rezistența la stresul oxidativ se observă în multe tipuri de celule tumorale [106].

Grupele SH libere, grupele SH totale, raportul SH libere/SH totale definesc potențialul antioxidant al serului, iar disulfurile, raportul SS/SH libere și raportul SS/SH totale definesc statusul prooxidant. Reducerea nivelului grupelor SH libere și SH totale indică că acești compuși au fost consumați datorită stresului oxidativ prezent într-un anumit context patologic. Reducerea raportului SS/SH totale poate sugera că mecanismele antioxidante au fost eficiente, adică activitatea antioxidantă protectivă a fost crescută în acea fază a bolii. Creșterea nivelului grupelor SH libere și SH totale și scăderea nivelului disulfurilor sunt asociate cu boli proliferative, în timp ce nivelul mai scăzut de SH și nivelul SS mai mare sunt asociate cu boli degenerative [106].

Inflamația subacută și cronică este un răspuns la stimularea prelungită a factorilor proinflamatori asupra țesuturilor și se caracterizează prin infiltrarea leucocitelor în locul inflamației, fibroză și formarea de granulom. Mecanismul inflamației cronice este atribuit, în parte, eliberării SRO din neutrofilele și macrofagele activate, producerea excesivă de citokine, dereglarea semnalizării celulare și pierderea funcției de barieră. Această supraproducție provoacă peroxidarea lipidelor membranare, ceea ce duce la lezarea țesuturilor prin deteriorarea macromoleculilor. Speciile reactive ale oxigenului provoacă sau extind inflamația, stimulând eliberarea de citokine (IL-1beta, TNF-alfa, INF-alfa), care stimulează recrutarea de neutrofile și macrofage suplimentare [84].

Implantarea subcutanată a discurilor de fetru provoacă formarea de țesut granulomatos. Acest țesut granulomatos se datorează concentrării macrofagelor, neutrofilelor și limfocitelor în jurul particulelor străine, urmată de proliferarea celulelor fibroblaste. Discul de fetru implantat stimulează sistemul imunitar pentru a produce interleukine și anticorpi care stimulează proliferarea limfocitelor și acumularea de celule în jurul acestora. Inițial se dezvoltă procesele exudative prin transudarea lichidului și creșterea marcată a greutateii discurilor fetru umede. S-a demonstrat, că antiinflamatoarele steroidiene și nesteroidiene reduc dimensiunea granulomului și cantitatea de transudat prin inhibarea producerii de mediatori proinflamatori (citokine inflamatorii, leucotrienele și prostaglandine), inhibarea infiltrării cu celule (leucocite) și prevenirea proliferării fibroblastelor și a producerii fibrelor de colagen și sintezei mucopolizaharidelor. Efect similar a demonstrat dexametazona și în studiul nostru. Imupurinul a manifestat o capacitate mai redusă față de dexametazonă, de a micșora procesele exudative și proliferative. Posibil, spre deosebire de antiinflamatorul steroidian, preparatul de origine entomologică dezvoltă un efect mai lent datorită proprietăților imunotrope asupra imunității celulare (modularea T-limfocitelor) [84].

La modelarea inflamației subacute prin implantarea discului cu adjuvant Freund s-a constatat dezvoltarea unui proces inflamator determinat de majorarea nivelului citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-1beta) și micșorarea celei antiinflamatorii (IL-10). Concomitent s-a demonstrat dezvoltarea stresului oxidativ relevat prin majorarea nivelului DAM, MRO, PAB și diminuarea activității SOD. Imuheptinul, similar dexametazonei, a determinat diminuarea intensității procesului inflamator (tendința de micșorare a nivelului TNF-alfa, IL-1beta, IL-6), iar imupurinul a contribuit la restabilirea raportului dintre citokinelor proinflamatorii (micșorarea marcată a IL-6 și majorarea semnificativă a IL-10). Dexametazona și preparatele de origine entomologică autohtone au determinat o reducere a stresului oxidativ prin micșorarea nivelului DAM, MRO, PAB și creșterea activității SOD (anexa 10).

Adjuvantul Freund poate determina o acțiune modulatorie asupra hemopoiezei, Astfel, în studii experimentale și clinice vaccinul BCG a demonstrat creșterea capacității de apărare a organismului-gazdă în leucemie și alte tumori prin sporirea repopulării măduvei osoase și leucopoiezei după chimioterapia mieloablativă. Pretratarea șoarecilor cu BCG sau adjuvant Freund a contribuit la recuperarea funcțiilor leucopoietice în urma unei injecții melosupresoare ulterioare cu ciclofosamidă. Tratamentul cu BCG sau adjuvant a determinat intensificarea unităților formatoare de colonii în măduva osoasă. În mod similar, s-a constatat că imunoadjuvanții cu micobacterii, de natură chimică definită, exercită efecte hemopoietice, precum și determină o creștere a nivelului activității de stimulare a coloniilor monocitelor-macrofage în ser și proliferarea celulelor stem multipotențiale în măduva osoasă [28].

În studiile experimentale s-a constatat că adjuvantul Freund complet produce o majorare a nivelului citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, INF-gama) cu declanșarea proceselor imunității celulare preponderent pe calea Th1, iar în lipsa micobacteriilor (adjuvant incomplet) diferențierea limfocitelor-T tinde spre profilul Th2 cu producerea intensă a anticorpilor [28].

Implantarea discurilor de fetru determină o reacție exudativă și proliferativă și creșterea nivelului citokinelor proinflamatorii TNF-alfa, IL-1beta și IL-6, produși ce caracterizează funcția macrofagelor (activare, infiltrare, agregare). Administrarea indometacinei, antiinflamator nesteroidian, provoacă diminuarea masei granulomului și a nivelului de IL-6, cu o creștere a TNF-alfa, fără a modifica pe cel al IL-1beta [101].

Inflamația constituie un răspuns la diverși factori nocivi și este mediată de sistemul imun înnăscut și adaptativ al organismului, care are consecințe benefice la un grad adecvat de răspuns și care devine nedorit la o stimulare excesivă cu dezvoltarea afecțiunilor inflamatorii acute și cronice. S-a demonstrat, că afecțiunile inflamatorii sunt însoțite de stres oxidativ care agravează



și mai mult evoluția procesului patologic. În cadrul procesului inflamator celulele sunt expuse la o varietate de oxizi cu formarea ulterioară a complexelor cu ADN-ul, lipidele și structurile proteice ce determină modificări organizaționale majore. Speciile reactive de oxigen induc diverse enzime protectoare (catalaza, SOD, GR etc.) pentru a reduce stresul oxidativ. Mecanismul enzimatic de apărare față de SRO stimulat prin diverse substanțe biologice active poate induce efecte antioxidante suplimentare cu ameliorarea procesului inflamator.

În baza analizei literaturii științifice s-a concluzionat, că acțiunea antioxidantă a produselor de origine entomologică poate fi determinată de: conținutul de enzime antioxidante (catalaza, SOD, GRx, GPO, GST etc.) și antioxidanți neenzimatici (polifenoli, flavonoide, tocoferoli, acid ascorbic, tioli etc.); conținutul de proteine și peptide bioactive (cu umai puțin de 20 reziduri de aminoacizi); prezența aminoacizilor (glutamat, aspartat, arginină, lizină, prolină, tirozină etc.); trigliceride și lipide (acizii grași mono și polinesaturați); compuși fenolici (acid clorogenic, epicatechină, acid cumaric, acid cafeic, acid galic, kaempferol, galat de epicatechină etc.); chitină și chitozan. Substanțele biologice active din insecte pot manifesta acțiune antioxidantă prin: capacitatea de neutralizare a SRO; chelarea ionilor metalelor; modularea activității enzimelor antioxidante endogene; reducere a radicalilor DPPH, ABTS, FRAP; reducerea produselor de peroxidare a lipidelor; inhibarea enzimelor responsabile de producerea radicalilor liberi (NOSi, peroxidaza, xantinoxidaza, hexozaminidaza etc.); protecția lipidelor și proteinelor de oxidare.

Datele din literatura științifică au demonstrat, că produsele de origine entomologică pot manifesta acțiune antiinflamatoare prin următoarele mecanisme: inhibarea enzimelor implicate în metabolismul acidului arahidonic (fosfolipaza A2, COX, LOX) cu reducerea producerii de prostaglandine și leucotriene; inhibarea secreției de citokine cu micșorarea nivelului citokinelor proinflamatorii; reglarea expresiei genelor și a proteinelor moleculelor de semnalizare implicate în patofiziologia inflamației; majorarea nivelului citokinelor antiinflamatorii; inhibarea căilor de semnalizare a procesului inflamator (NF-kB etc.) responsabile de expresia citokinelor proinflamatorii și mediatorilor, infiltrarea leucocitelor, eliberarea de proteaze și formarea de SRP și SRN; modularea sistemului imun înăscut.

Studiului preclinic al produselor biologice active, obținute din țesuturile de insecte din ordinul *Lepidoptera*, familia *Lymantridae*, genul *Lymantria*, specia *Lymantria dispar* (omida păroasă a stejarului, omida moliei țigănești), la diferite etape de dezvoltare (ou și pupă). S-a efectuat analiza cantitativă a preparatelor de origine entomologică imuheptin (25%/75% ouă și pupe) și imupurin (pupe) a demonstrat un conținut de proteine, inclusiv hidrosolubile, lipide, trigliceride și antioxidanți hidrosolubili. Concomitent s-a demonstrat, că produsele entomologice

din Lepidoptere au cel mai mare conținut de proteine la toate etapele de evoluție în comparație cu Coleopterele, Dipterele, ouăle de prepeliță și aloec. Analizele spectrale ale proteinelor produselor biologice active au demonstrat că acestea conțin întregul set de aminoacizi: esențiali (treonină, metionină, valină, izoleucină, leucină, fenilalanină, histidină, lizină, arginină, triptofan) și non-esențiali (acid asparagic, serină, acid glutamic, prolină, cisteină, glicină, alanină, tirozină). Astfel, în imuheptin și imupurin aminoacizii esențiali au constituit 50%. S-a demonstrat predominarea următorilor aminoacizi: fenilalanina, acidul glutamic, lizina, leucina, acidul asparagic și arginina, precum și a aminoacizilor cu catenă laterală dezvoltată (leucina, izoleucina, valina) și aminoacizii aromatici (fenilalanina, triptofan, tirozina).

Rezultatele cercetărilor au demonstrat o corelație între evoluția procesului inflamator și statusul pro- și antioxidant relevată prin: dezvoltarea proceselor exudative și proliferative; majorarea nivelului citokinelor proinflamatoare (TNFalfa, IL-1beta, IL-6) și micșorarea celor antiinflamatorii (IL-10; activarea celulelor sistemului imun înăscut (macrofage, neutrofile etc.) și dezvoltarea stresului oxidativ (creșterea DAM, produselor de glicare avansată, produselor intermediare ale oxigenului și diminuarea activității enzimelor antioxidante – catalaza, SOD, GRx, GPO, GST, compușilor tiolici). Analiza rezultatelor obținute au permis să estimăm, că imuheptinul și imupurinul, prin componența sa (proeine, aminoacizi, lipide, antioxidanți hidrosolubili), au dovedit proprietăți antiinflamatoare și antioxidante concomitente, responsabile de ameliorarea evoluției procesului inflamator, posibil prin următoarele posibile mecanisme: modularea profilului citokinic prin diminuarea nivelului citokinelor proinflamatorii și majorarea celor antiinflamatorii; reducerea proceselor exudative și proliferative; influențarea activității macrofagelor; diminuarea activității sistemului prooxidant și modularea celui antioxidant; acțiunea imunomodulatoare (modularea sistemului imun înăscut, imunității celulare).

## CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

### CONCLUZII

1. Studiul comparativ a imuheptinului și imupurinului cu diclofenacul, acidul ascorbic și troloxul a demonstrat, că preparatele cercetate au manifestat un potențial antiinflamator datorită efectului mai marcat de protecție a hematiilor în testul hemolizei oxidative, creșterii activității antioxidante totale prin reducerea radicalului ABTS, intensificării semnificative a activității paraoxonazei/arilesterazei și capacității de reducere a edemului la administrarea preventivă a preparatelor de origine entomologică.
2. La stimularea macrofagelor peritoneale cu lipopolizaharide s-a constatat, că imuheptinul și, îndeosebi, imupurinul au diminuat mai accentuat nivelul citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) cu menținerea sau majorarea citokinelor antiinflamatorii (IL-10). Imupurinul și imuheptinul, similar dexametazonei, au crescut activitatea glutatation reductazei (normalizarea utilizării glutatationului), glutatation peroxidazei (neutralizarea peroxizilor) și au diminuat procesele de epuizare a glutatationului, posibil, prin conjugarea compușilor electrofili. Preparatele cercetate și dexametazona au redus stresul oxidativ prin intensificarea utilizării tiolilor și diminuarea statusului prooxidant.
3. Imuheptinul și imupurinul, în inflamația subacută prin implantarea discurilor de fetru, au determinat inhibarea moderată a proceselor exudative și proliferative în comparație cu dexametazona, au redus nivelul TNF-alfa și IL-6 și l-au majorat pe cel al IL-10 și au contribuit la echilibrarea statusului pro- și antioxidant cu creșterea utilizării compușilor tiolici, micșorarea disulfurilor și raportului SS/SH-libere și SS/SH-totale.
4. În inflamația subacută, indusă prin adjuvantul Freund, imuheptinul și imupurinul, în comparație cu dexametazona au determinat o diminuare mai marcată a nivelului citokinelor, îndeosebi IL-6, iar imupurinul o majorare semnificativă a IL-10. Imupurinul, spre deosebire de dexametazonă, a determinat un echilibru între nivelul citokinelor pro- și antiinflamatorii prin majorarea marcată a nivelului citokinei antiinflamatorii IL-10. Imuheptinul, imupurinul și dexametazona au anihilat moderat stresul oxidativ prin intensificarea utilizării grupelor tiolice.
5. În baza rezultatelor obținute s-au evidențiat posibilele mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare ale imuheptinului și imupurinului, care pot consta în: diminuarea nivelului citokinelor pro-inflamatorii și majorarea celor antiinflamatorii; anihilarea stresului oxidativ în inflamație prin restabilirea raportului dintre sistemul pro- și antioxidant; acțiunea imunomodulatoare prin reglarea activității celulelor implicate în inflamație (macrofage etc.).

## RECOMANDĂRI

1. Pentru dezvoltarea direcției de studiu a acțiunii antiinflamatoare a preparatelor de origine entomologică a recomanda diversificarea metodelor și modelelor de cercetare a procesului inflamator cronic.
2. De a iniția studiile clinice cu imuheptin și imupurin la pacienții cu procese inflamatorii de diferită geneză.
3. Implementarea în cercetare a recomandărilor metodice de studiu a preparatelor cu presupuse proprietăți antiinflamatoare.

## BIBLIOGRAFIE

1. ACOSTA-ESTRADA, B. et al. Benefits and Challenges in the Incorporation of Insects in Food Products. In: *Frontiers in nutrition*. 2021, vol. 8, 687712. doi:10.3389/fnut.2021.687712.
2. AGUILAR-TOALÁ, J.E., CRUZ-MONTERROSA, R.G., LICEAGA, A.M. Beyond Human Nutrition of Edible Insects: Health Benefits and Safety Aspects. In: *Insects*. 2022, Nov 1;13(11):1007. doi: 10.3390/insects13111007.
3. AHMAD, S., CAMPOS., M.G., FRATINI, F., ALTAYE, S.Z, LI J. New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. In: *Int J Mol Sci*. 2020, 21(2):382. Published 2020 Jan 8. doi:10.3390/ijms21020382.
4. AIELLO, D., BARBERA, M., BONGIORNO, D. et al. Edible Insects an Alternative Nutritional Source of Bioactive Compounds: A Review. In: *Molecules*. 2023, Jan 10; 28(2): 699. doi: 10.3390/molecules28020699.
5. ALAMDARI, D.H. et al. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. In: *Clinical biochemistry*. 2007, vol. 40,3-4: 248-54. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.10.017.
6. ANDRONACHE, L. *Influența unor compuși biologici activi autohtoni asupra ciclului glutationic în normă și în patologia hepatică experimentală* . Teza dr.șt.med., 2016, 162p.
7. APAK, R. et al. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. In: *Microchim Acta*. 2008, 160: 413–419 DOI 10.1007/s00604-007-0777-0.
8. APAK, R., et al. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. In: *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016, 64(5), 997–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>.
9. ARAB, Z. N. et al. Phytochemicals as Modulators of Paraoxonase-1 in Health and Diseases. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2022, 11(7), 1273. <https://doi.org/10.3390/antiox11071273>.
10. BACINSCHI, N. Influența preparatelor entomologice asupra nivelului substanțelor necrotice și mezomoleculelor medii în afecțiunea toxică a ficatului. În: *Anale științifice ediția VIII-a vol.1 Probleme medico-biologice și farmaceutice*. Zilele Universității Chișinău 15-17 octombrie 2008. p. 199-204.
11. BACINSCHI, N. Influența preparatelor entomologice asupra conținutului enzimelor în ficat în afecțiunea hepatică indusă prin paracetamol. În: *Revista Farmaceutică a Moldovei*. 2008, nr.3-4, p.19-23.
12. BACINSCHI, N. Influența preparatelor entomologice asupra sindromului de citoliză în afecțiunea hepatică ischemică. În: *Anale științifice ediția X-a vol.1 Probleme medico-biologice și farmaceutice*. Zilele Universității. Chișinău 21 - 23 octombrie 2009. p. 254-258.
13. BACINSCHI, N. Preparate entomologice cu proprietăți imunotrope. In: *Curierul Medical*, 2010, nr. 6(318), pp. 3-8. ISSN 1875-0666.
14. BACINSCHI, N. Modificările metabolice în afecțiunea hepatică sub influența preparatelor entomologice. În: *Anale științifice ediția XI-a vol.1 Probleme medico-biologice și farma-ceutice*. Zilele Universității. Chișinău 13-15 octombrie 2010, p. 354-358.
15. BACINSCHI, N. Influența preparatelor entomologice asupra stresului oxidativ în

- afecțiunile hepatice. În: *Anale științifice ediția XII-a vol.1 Probleme medico-biologice și farmaceutice*. Zilele Universității. Chișinău 19-21 octombrie 2011, p. 340-347.
16. BACINSCHI, N. Eficacitatea preparatelor entomologice în hepatita virală cronică În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*, 2012, nr. 1(33), pp. 210-214. ISSN 1857-0011.
  17. BACINSCHI, N. *Hepatoprotectoare entomologice*. Chișinău. 2012. 312 p. ISBN 978-9975-4333-8-9
  18. BACINSCHI, N. *Farmacologia preparatelor entomologice și utilizarea lor rațională*. Teza de doctor habilitat în științe medicale. Chișinău, 2013, 275p.
  19. BACINSCHI, N. Preparatele de origine entomologică: ipoteze, mecanisme, perspective. În: *Moldovan Journal of Health Sciences*. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2020; 25(3); 72-81. ISSN 2345-1467.
  20. BACINSCHI, N., GHICAVÎL, V., BUTOROV, I., POGONEA, I. Eficacitatea preparatelor entomologice în tratamentul complex al hepatitelor de diferită etiologie. In: *Curierul Medical*, 2010, nr. 3(315), pp. 81-84. ISSN 1875-0666.
  21. BACINSCHI, N., GHICAVÎL, V., DUMBRAVA, V.-T., POGONEA, I. Preparatele entomologice în tratamentul complex al hepatitei virale cronice. In: *Curierul Medical*, 2011, nr. 6(324), pp. 6-10. ISSN 1875-0666.
  22. BACINSCHI, N.; GUȚU, I.; GHICAVÎL, V.; POGONEA, I, CATCOV. C. Antiinflammatory action of the entomological drugs. In: *British Medical Bulletin*. 2016, 1, p.231-238. ISSN 0007-1420.
  23. BACINSCHI, N., GHICAVÎL, V., POGONEA, I. Peptide din insecte cu acțiune antivirală și antitumorală. În: *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, 2012, nr. 1(13), pp. 196-201. ISSN 1857-1719.
  24. BAKHAUTDIN, B. et al. (2013). Protective role of macrophage-derived ceruloplasmin in inflammatory bowel disease. In: *Gut*, 62(2), 209–219. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300694>
  25. BANERJEE, S. et al. Evaluation of Phytochemical Screening and Anti Inflammatory Activity of Leaves and Stem of Mikania scandens (L.) Wild. In: *Annals of Medical and Health Sciences Research*. 2014; 4(4): 532-536.
  26. BARBEHENN, R.V., NIEWIADOMSKI, J., KOCHMANSKI, J., CONSTABEL, C.P. Limited effect of reactive oxygen species on the composition of susceptible essential amino acids in the midguts of *Lymantria dispar* caterpillars. In: *Arch Insect Biochem Physiol*. 2012; 81(3):160-177.
  27. BARTOSH, T. J. AND YLOSTALO, J. H. (2014). Macrophage Inflammatory Assay. *Bio-protocol* 4(14): e1180. DOI: 10.21769/BioProtoc.1180.
  28. BILLIAU, A., MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. In: *Journal of leukocyte biology*. 2001, 70(6), 849–860.
  29. BITENCOURT, M.A., DANTAS, G.R., LIRA, D.P. et al. Aqueous and Methanolic Extracts of *Caulerpa mexicana* Suppress Cell Migration and Ear Edema Induced by Inflammatory Agents. In: *Mar Drugs*. 2011;9(8):1332-45. doi: 10.3390/md9081332.
  30. BYUN, K., YOO, Y., SON, M. et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. In: *Pharmacol Ther*. 2017 Sep;177:44-55. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.030. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28223234.
  31. BUYUKGUZEL, E. Effects of Eicosanoid Biosynthesis Inhibitors on Selected Oxidative Stress Biomarkers in the Midgut of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. In: *Journal of Entomological Science*. 2014, 49 (2): 144–155. doi.org/10.18474/0749-8004-49.2.144.
  32. CAMPOS, J.F. et al. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic

- Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). In: *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015:296186. doi: 10.1155/2015/296186. Epub 2015 Jun 22. PMID: 26185516; PMCID: PMC4491730
33. CATCOV, C., POGONEA, I., GHICAVÎL, V. Artropodele – o sursă bogată de medicamente. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*, 2018, nr. 4(78), pp. 93-96. ISSN 1729-8687.
  34. CATORCE, M.N., GEVORKIAN, G. Evaluation of Anti-inflammatory Nutraceuticals in LPS-induced Mouse Neuroinflammation Model: An Update. In: *Curr Neuropharmacol.* 2020; 8(7): 636-654. doi:10.2174/1570159X18666200114125628
  35. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*. 2010, 81(4–5), 1300-1309. doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.025
  36. CHERNYSH, S. et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(20), 12628–12632. <https://doi.org/10.1073/pnas.192301899>
  37. CERNYSH S.I., FILATOVA N.A., CERNYSH N.S.: Cytotoxic activity of blow fly *Calliphora vicina* hemocytes. In: *Journal of Insect Physiology*, 2004, v.50, 777-781.
  38. CHERNYSH, S., IRINA, K., IRINA, A. Anti-tumor activity of immunomodulatory peptide alloferon-1 in mouse tumor transplantation model. In: *Int Immunopharmacol.* 2012 Jan;12(1):312-4. doi: 10.1016/j.intimp.2011.10.016. Epub 2011 Oct 31. PMID: 22051974.
  39. CHERNYSH S, KOZUHAROVA I. Anti-tumor activity of a peptide combining patterns of insect alloferons and mammalian immunoglobulins in naïve and tumor antigen vaccinated mice. In: *Int Immunopharmacol.* 2013 Dec;17(4):1090-3. doi: 10.1016/j.intimp.2013.10.014.
  40. CHU, F.J., JIN, X.B., XU, Y.Y. et al. Inflammatory Regulation Effect and Action Mechanism of Anti-Inflammatory Effective Parts of Housefly (*Musca domestica*) Larvae on Atherosclerosis. In: *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 340267. doi: 10.1155/2013/340267.
  41. CIUHRIL, M. Terapii complementare noi bazate pe substanțe biologice active extrase din insecte [New complementary therapies based on biologically active substances extracted from insects]. În: *Priorități în dezvoltarea biotehnologiei românești: Lucrările simpozionului [Priorities in the development of Romanian biotechnology: Symposium papers]*; 2002 Dec 12-13; Târgoviște (Romania). Târgoviște: [s. n]; 2002. p. 96-103.
  42. CIUHRIL, M., VERNESCU, S. Entomologia la finele secolului XX. În: *Dezvoltarea în pragul mileniului III. Lucrările celui de-al II-lea Congres.* București, 1999; p. 560-567.
  43. COLȚA, A., GHICAVÎL, V., Entomoterapia în prostatita cronică abacteriană. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină.* 2021, nr. 1(88), pp. 71-78. ISSN 2587-3873.
  44. CORBETT, Adrian et al. A method for reliable voluntary oral administration of a fixed dosage (mg/kg) of chronic daily medication to rats. In: *Laboratory animals.* 2012, vol. 46,4: 318-24. doi:10.1258/la.2012.012018
  45. DADAR, M., SHAHALI, Y., CHAKRABORTY, S. et al. Anti-inflammatory peptides: current knowledge and promising prospects. In: *Inflammation Research.* 2019; 68(2):125-145. doi:10.1007/s00011-018-1208-x.
  46. D'ANTONIO, V., SERAFINI, M., BATTISTA, N. Dietary Modulation of Oxidative Stress From Edible Insects: A Mini-Review. In: *Front Nutr.* 2021 Feb 26; 8: 642551. doi: 10.3389/fnut.2021.642551.
  47. D'ANTONIO, V., BATTISTA, N., SACCHETTI, G., DI MATTIA, C., & SERAFINI,

- M. (2023). Functional properties of edible insects: a systematic review. In: *Nutrition research reviews*, 36(1), 98–119. <https://doi.org/10.1017/S0954422421000366>
48. DI MATTIA, C., BATTISTA, N., SACCHETTI, G., SERAFINI, M. Antioxidant Activities in vitro of Water and Liposoluble Extracts Obtained by Different Species of Edible Insects and Invertebrates. In: *Front. Nutr.* 2019; 6:106. doi: 10.3389/fnut.2019.00106.
  49. DOS SANTOS., A.T., CRUZ, G.S., BAPTISTA, G.R. Anti-inflammatory activities of arthropod peptides: a systematic review. In: *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2021 Oct 22;27:e20200152. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0152.
  50. DUCASTEL, M. et al. Oxidative stress and inflammatory biomarkers for the prediction of severity and ICU admission in unselected patients hospitalized with COVID-19. In: *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.14: 7462.
  51. DUMBRAVEANU, I., BANOV, P., ARIAN, I., TANASE, A. The use of entomological drugs in the complex treatment of patients with chronic prostatitis and erectile dysfunction. In: *Moldovan Journal of Health Sciences.* 2017;14(4). 31-43.
  52. DUTTA, P., DEY, T., MANNA, P., KALITA, J. Antioxidant potential of vespa affinis l., a traditional edible insect species of north east india. In: *PLoS ONE.* 2016; 11(5): e0156107. doi: 10.1371/ journal.pone. 0156107
  53. DUTTA, P., SAHU, R.K., DEY, T. et al. Beneficial role of insect-derived bioactive components against inflammation and its associated complications (colitis and arthritis) and cancer. In: *Chem Biol Interact.* 2019 Nov. 1;313:108824. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108824.
  54. EARP, J.C. et al. Pharmacokinetics of dexamethasone in a rat model of rheumatoid arthritis. In: *Biopharmaceutics & drug disposition.* 2008, vol. 29,6: 366-72. doi:10.1002/bdd.626
  55. EREL, O., NESELIOGLU, S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. In: *Clinical biochemistry.* 2014, vol. 47,18: 326-32. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.09.026
  56. FAAST, R., WEINSTEIN, P. Plant-derived medicinal entomochemicals: an integrated approach to biodiscovery in Australia. In: *Austral Entomology.* 2019, November. <https://doi.org/10.1111/aen.12433>.
  57. FALLON, J., KELLY, J., KAVANAGH, K. Galleria mellonella as a model for fungal pathogenicity testing. In: *Methods Mol Biol.* 2012;845:469-85. doi: 10.1007/978-1-61779-539-8\_33. PMID: 22328396.
  58. FEHRENBACHER, J.C. et al. Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. In: *Current protocols in pharmacology.* 2012, vol. Chapter 5: Unit5.4. doi:10.1002/0471141755.ph0504s56
  59. FRAN CZYK, B., GLUBA-BRZÓZKA, A., RYSZ-GÓRZYŃSKA, M., RYSZ, J. The Role of Inflammation and Oxidative Stress in Rheumatic Heart Disease. In: *Int J Mol Sci.* 2022, Dec 13;23(24):15812. doi: 10.3390/ijms232415812.
  60. FROMMLET, F., GEORG H. Experimental replications in animal trials. In: *Laboratory animals.* 2021, vol. 55,1: 65-75. doi:10.1177/0023677220907617.
  61. GARIBALDI S. et al. Advanced Oxidation Protein Products-Modified Albumin Induces Differentiation of RAW264.7 Macrophages into Dendritic-Like Cells Which Is Modulated by Cell Surface Thiols. *Toxins* **2017**, 9, 27. doi.org/10.3390/toxins9010027.
  62. GARRIDO, G., et. al. (2004). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of Mangifera indica L. extract (VIMANG). In: *Pharmacological research*, 50(2), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2003.12.003>
  63. GHICAVÎL, V., BACINSCHI, N. Preparatele entomologice – o nouă direcție de



- cercetare și elaborare a medicamentelor. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*, 2006, nr. 3(7), pp. 221-226. ISSN 1857-0011.
64. GHICAVÎI, V., BACINSCHI, N., GHICAVÎI, V.V. et al. Insectele o sursă variată de substanțe biologice active pentru obținerea preparatelor medicamentoase. În : *Revista farmaceutică a Moldovei*. 2006, ediție specială. Conferința științifică „Farmacologia națională la 35 ani” a Societății Științifice a Farmacologilor din Republica Moldova cu participare internațională. Chișinău, 16 decembrie 2006. p.26-34.
  65. GHICAVÎI, V., BACINSCHI, N., GUDUMAC, V., PÂNTEA, V. Influența imuheptinului asupra unor procese metabolice în afecțiunea hepatică indusă de fenilefrină. În.: “*Actualități în patologia infecțioasă parazitara*”. Conferința VI-a a infecționiștilor din Republica Moldova. 5-6 octombrie 2006. Chișinău. P.278-282.
  66. GHICAVÎI, V., BACINSCHI, N., POGONEA, I., POPOVICI S., GHERMA, A. Evoluția maladiilor imunodeficiente pe fondal de tratament cu un nou preparat entomologic – imupurin. În.: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale*. Chișinău, 1(24)2010, p. 82-85.
  67. GHICAVÎI, V., BACINSCHI, N. Analiza comparativă a acțiunii hepatoprotectoare a preparatelor entomologice în afecțiunile hepatice toxice. În.: *Farmacist.ro*. 2011, 3, anul VIII, nr.140
  68. GHICAVÎI, V., POGONEA, I., Bacinschi N., Andrieș L. Entomoterapia, o strategie nouă în medicină. În.: *Farmacist.ro*. 2011, 2, anul VIII, nr.139, p.34-39.
  69. GHICAVÎI, V., POGONEA, I., BACINSCHI et al. *Optimizarea tratamentului complex al unor imunodeficiențe*. Recomandare practică. Chișinău, 2011, 23 p.
  70. GHICAVÎI, V., POGONEA, I., BACINSCHI, N., GHINDA, S. Acțiunea entomopreparatelor asupra imunității umorale și celulare. În: *Anale științifice ale USMF „N.Testemițanu”*, ediția XIV-a. 2013, vol. 1, 236-239. ISSN 1857-1719.
  71. GUDUMAC, V., RÎVNEAC, V., TAGADIUC, O., et al. *Metode de cercetare a metabolismului hepatic: elaborare metodică [Research methods of liver metabolism: methodical guidelines]*. Chisinau: Tehnica-Info; 2012. 162 p.
  72. GUDUMAC, V., TAGADIUC, O., ANDRONACHE, L., ȘTÎRBA, O., PANTEA, V. *Procedeu de dozare a dialdehidei malonice în materialul biologic*. Certificat de inovator nr. 5157 din 14.12.2012.
  73. GUDUMAC, V., TAGADIUC, O., RÎVNEAC, V., SARDARI, V., PANTEA, V. *Investigații biochimice. Volumul II. Micrometode. Elaborare metodică*. Chișinău. 2010. ISBN 978-9975-106-06-1.
  74. HUSSAIN., T., TAN, B., YIN, Y. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? In: *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:7432797. doi: 10.1155/2016/7432797.
  75. IJINU, T.P., MANIKANTAN, K., ANEESKUMAR, A.L. et al. Ameliorative effect of the ethnomedicinal plant *Blepharis maderaspatensis* (L.) B.Heyne ex Roth on lipopolysaccharide-induced acute liver inflammation and oxidative stress in Wistar rat model. In: *Phytomedicine Plus*. 2022, May, Volume 2, Issue 2, 100247. doi.org/10.1016/j.phyflu.2022.100247.
  76. ITO, FUMIAKI et al. The Application of a Modified d-ROMs Test for Measurement of Oxidative Stress and Oxidized High-Density Lipoprotein. In: *International journal of molecular sciences*. 2017, vol. 18,2 454, doi:10.3390/ijms18020454.
  77. IVANOVA, E., POGONEA, I., GHICAVÎI, V., BACINSCHI, N., POPOVICI, S. Evoluția maladiei HIV/SIDA pe fondal de tratament cu un nou preparat entomologic – imupurin (caz clinic) În.: *Anale științifice ediția XI-a vol.1 Probleme medico-biologice și farmaceutice. Zilele Universității*. Chișinău 13-15 octombrie 2010, p.343-346.
  78. KAI S. et al. “Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Water

- Extract of *Galla Chinensis In Vivo* Models.” In: *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2018, vol. 6784032. 18 Feb. 2018, doi:10.1155/2018/6784032
79. KESHERWANI, R., KUMAR, R., MINHAS, U., RIZVI, S.I. Euglena tuba extract provides protection against lipopolysaccharide-induced inflammatory response and oxidative stress in mice. In: *Biologia (Bratisl)*. 2020 Oct 21:1-6. doi: 10.2478/s11756-020-00623-7.
  80. KIM, T.K., CHA, J.Y., YONG, H.I. et al. Application of Edible Insects as Novel Protein Sources and Strategies for Improving Their Processing. In: *Food Sci Anim Resour*. 2022 May;42(3):372-388. doi: 10.5851/kosfa.2022.e10.
  81. KIM, Y.I., CHOI, K.H., KIM S.R. et al. Bombyx mori hemocyte extract has anti-inflammatory effects on human phorbol myristate acetate-differentiated THP-1 cells via TLR4-mediated suppression of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. In: *Molecular Medicine Reports*. 2017, 16(4).
  82. KOLLINIATI, O., IERONYMAKI, E., VERGADI, E., TSATSANIS, C. Metabolic Regulation of Macrophage Activation. In: *J Innate Immun*. 2021 Jul 9:1-17. doi: 10.1159/000516780.
  83. KUNACHOWICZ, D., ŚCISKALSKA, M., KEPINSKA, M. Modulatory Effect of Lifestyle-Related, Environmental and Genetic Factors on Paraoxonase-1 Activity: A Review. In: *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Feb 5;20(4):2813. doi: 10.3390/ijerph20042813.
  84. KUUM, M.G.M. et al. Anti-inflammatory Effects of the Stem Barks from Albizia Ferruginea (Mimosaceae) on Chronic Inflammation Induced in Rats. In: *International Journal of Innovative Research in Medical Science (IJIRMS)*. 2018, 3(9), 2183-2194 .
  85. LAZĂR, C. Ceruloplasmin in experimental ovarian torsion/detorsion. In: *Biological markers in fundamental and clinical medicine*. 2017; 1(3): p. 24-25. Disponibil la: <https://biologicalmarker.com/index.php/journal/article/view/11> [accesat la 29.06.2020]
  86. LEE, J.H., KIM, T.K., JEONG, C.H. et al. Biological activity and processing technologies of edible insects: a review. In: *Food Sci Biotechnol*. 2021 Aug 5;30(8):1003-1023. doi: 10.1007/s10068-021-00942-8.
  87. LEELAPRAKASH, G., DASS, SM. In vitro Anti-Inflammatory activity of Methanol extract of *Enicostemma axillare*. In: *International Journal of Drug Development & Research*. 2011; 3(3): 189-196.
  88. LIBERMAN, A.C., BUDZIŃSKI, M.L., SOKN, C. et al. Regulatory and mechanistic actions of glucocorticoids on and inflammatory cells. In: *Front Endocrinol*. 2018;9:235. doi: 10.3389/fendo.2018.00235.
  89. LICEAGA, A.M. *Edible insects, a valuable protein source from ancient to modern times*. In: *Adv Food Nutr Res*. 2022;101:129-152. doi: 10.1016/bs.afnr.2022.04.002.
  90. LITVINOV, DMITRY et al. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. In: *North American journal of medical sciences*. 2012, vol. 4,11: 523-32. doi:10.4103/1947-2714.103310.
  91. LIU, Z, WANG, M, ZHANG, C, ZHOU, S, JI G. Molecular Functions of Ceruloplasmin in Metabolic Disease Pathology. In: *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2022;15:695-711. doi.org/10.2147/DMSO.S346648
  92. LU X, JIN X, WANG J, CHU F, ZHU J. Antihepatitis B virus activity of a protein-enriched fraction from housefly (*Musca domestica*) in a stable HBV-producing cell line. In: *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:389560. doi: 10.1155/2014/389560
  93. MALEMATJA, E., MANYELO, T.G., SEBOLA, N.A., MABELEBELE, M. The role of insects in promoting the health and gut status of poultry. In: *Comp. Clin. Pathol*. 2023; doi.org/10.1007/s00580-023-03447-4.

94. MANS, D.R.A., SAIRRAS, S. , GANGA, D., KARTOPAWIRO, J. Exploring the global animal biodiversity in the search for new drugs – insects. In: *J. Transl Sci*, 2016; 3(1): 371-386. doi: 10.15761/JTS.1000164.78.
95. MANOSROI, A, et al. Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of oils and sericin extracted from Thai native silkworms (*Bombyx mori*). In.: *Pharm Biol*. 2010 Aug;48(8):855-60.
96. MARUYAMA, H, SAKAMOTO, T, ARAKI, Y, HARA, H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. In: *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:30.
97. MATSUMOTO, H, et al., Characteristics common to a cytokine family spanning five orders of insects. In.: *Insect Biochem Mol Biol*. 2012 Jun;42(6):446-54.
98. MEISINGER, C., FREUER, D., BUB, A. et al. Association between inflammatory markers and serum paraoxonase and arylesterase activities in the general population: a cross-sectional study. In: *Lipids Health Dis*. 2021; 20, 81. doi.org/10.1186/s12944-021-01508-7.
99. MISHYNA, M., GLUMAC, M. So different, yet so alike Pancrustacea: Health benefits of insects and shrimps. In: *Journal of Functional Foods*. 2021; 76, 104316. doi.org/10.1016/j.jff.2020.104316.
100. MONINCOVÁ, L, et al., Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Halictus sexcinctus* (Hymenoptera: Halictidae) and their analogs. In.: *Amino Acids*. 2010 Aug;39(3):763-75
101. NAIR, V., KUMAR, R., SINGH, S., GUPTA, Y.K. Anti-granuloma activity of *Terminalia chebula* retz in wistar rats. In: *European journal of inflammation*. 2012, 18(2), 185-191.
102. NAVARRO DEL HIERRO, J.; GUTIÉRREZ-DOCIO, A.; OTERO, P.; REGLERO, G.; MARTIN, D. Characterization, antioxidant activity, and inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. In: *Food Chem*. 2020, 309, 125742.
103. NAVARRO DEL HIERRO J., CANTERO-BAHILLO, E., FERNANDEZ-FELIPE, M.T. et al. Effects of a Mealworm (*Tenebrio molitor*) Extract on Metabolic Syndrome-Related Pathologies: In Vitro Insulin Sensitivity, Inflammatory Response, Hypolipidemic Activity and Oxidative Stress. In: *Insects*. 2022 Sep 30;13(10):896. doi: 10.3390/insects13100896.
104. NESCI, S, SPAGNOLETTA, A, OPPEDISANO, F. Inflammation, Mitochondria and Natural Compounds Together in the Circle of Trust. In: *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 24;24(7):6106. doi: 10.3390/ijms24076106.
105. NGUYEN, T., CHEN, X., CHAI, J. et al. Antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activities of *Periplaneta americana* extract and underlying mechanisms. In: *Biomed Pharmacother*. 2020 Mar;123:109753. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109753.
106. NICOLAE, I., TAMPA, M., MITRAN, M. et al. Investigarea homeostaziei tiol-disulfuri în boli dermatologice – metodă de analiză, semnificația clinică. În: *DermatoVenerol. (Buc.)*. 2019, 64(3): 135–141.
107. NINO, M. C., REDDIVARI, L., OSORIO, C., KAPLAN, I., LICEAGA, A. M. Insects as a source of phenolic compounds and potential health benefits. In: *Journal of Insects as Food and Feed*. 2021; 1-12. https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0113
108. NOH, AIN' SABREENA MOHD et al. Effects of different doses of complete Freund's adjuvant on nociceptive behaviour and inflammatory parameters in polyarthritic rat model mimicking rheumatoid arthritis. In: *PloS one*. 2021, vol. 16,12 e0260423. doi:10.1371/journal.pone. 0260423
109. NUMBI MUYA, G.M., MUTIAKA, B.K., BINDELLE, J. et al. Human Consumption of

- Insects in Sub-Saharan Africa: Lepidoptera and Potential Species for Breeding. In: *Insects*. 2022 Sep 29;13(10):886. doi: 10.3390/insects13100886.
110. OGHENESUVWE, E.E., PAUL, C. Edible insects bio-actives as anti-oxidants: Current status and perspectives. In: *Journal of Complementary Medicine Research*. 2019; 10 (2), 89–102 10.5455/jcmr.20190130100319.
  111. OHTSU, A. et al. Advanced glycation end products and lipopolysaccharides stimulate interleukin-6 secretion via the RAGE/TLR4-NF- $\kappa$ B-ROS pathways and resveratrol attenuates these inflammatory responses in mouse macrophages. In: *Exp Ther Med*. 2017 Nov;14(5):4363-4370. doi: 10.3892/etm.2017.5045.
  112. OJHA, S., BUßLER, S., SCHLÜTER, O.K. Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. In: *Waste Manag*. 2020 Dec;118:600-609. doi: 10.1016/j.wasman.2020.09.010.
  113. ORDOÑEZ-ARAQUE, R., QUISHPILLO-MIRANDA, N., RAMOS-GUERRERO, L. Edible Insects for Humans and Animals: Nutritional Composition and an Option for Mitigating Environmental Damage. In: *Insects*. 2022 Oct 18;13(10):944. doi: 10.3390/insects13100944.
  114. OURTH, DD. Antitumor cell activity in vitro by myristoylated-peptide. In: *Biomed Pharmacother*. 2011 Jul;65(4):271-4. doi: 10.1016/j.biopha.2011.02.015. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21741202.
  115. OYEDAPO, O. O., FAMUREWA, A. J. (1995). Antiprotease and Membrane Stabilizing Activities of Extracts of Fagara Zanthoxyloides, Olax Subscorpioides and Tetrapleura Tetraptera. In: *International Journal of Pharmacognosy*, 33(1), 65–69. doi:10.3109/13880209509088150.
  116. PANTEA, V., COREȚCHI, I., GHINDA, S., GUDUMAC, V., TAGADIUC, E. *Metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active*. Brevet de invenție MD 1301Y nr. 1/2019, 2019.01.30.
  117. PÂNTEA, V. *Hepatitele virale acute și cronice. Actualități*. Chișinău, 2009, 224 p.
  118. PÂNTEA V., *Hepatitele virale C, B și D acute și cronice. Particularitățile clinice, epidemiologice, imunologice, evolutive și de tratament*. Chișinău 2011, 104p.
  119. PÂNTEA, V., CUȘNIR, GH., GHICAVÂI, V., CIUHRUI, V. Tratamentul cu Imuheptin în hepatita cronică virală C. In: *Romanian journal of Gastroenterology*. Al XV-lea congres Național de Hepatologie cu participare internațională. Program final. În: Volum de rezumate. București, România, 2005, p. 87-88.
  120. PÂNTEA, V., GHICAVÂI, V., CIUHRUI, V. Tratamentul cu Entoheptin în hepatita cronică virală C. In: *Romanian journal of Gastroenterology*. Al XV-lea Congres Național de Hepatologie cu participare internațională. Program final. În: Volum de rezumate. București, România, 2005, p. 86-87.
  121. PÂNTEA, V. SPÂNU, C., COJUHARI, L., CEBOTARESCU, V. *Hepatita Virală C acută. Particularitățile clinice, epidemiologice, imunologice și de tratament la persoanele de vârstă tânără și medie*. Chișinău, 2009, 108 p.
  122. POGONEA I. *Inofensivitatea și aspectele farmacologice ale preparatului entomologic imupurin*. Teza doctor în medicină. Chișinău. 2009. 126p.
  123. POGONEA I., BACINSCHI N., GHICAVÎI V. Influența imupurinului asupra enzimelor citolitice și colestactice în ficat în leziunea hepatică produsă de paracetamol. În: *Anale științifice ediția VIII-a vol.2 Probleme medico-biologice și farmaceutice*. Zilele Universității consacrate anului „Nicolae Testemițanu” cu prilejul aniversării a 80 ani de la naștere. Chișinău 16-19 octombrie 2007.p. 148-152.
  124. POGONEA I., SPINEI R., BACINSCHI N., GHICAVÎI V. Acțiunea comparativă a preparatelor entomologice imupurin și entoheptin. În: *Anale științifice ediția VIII-a vol.1 Probleme medico-biologice și farmaceutice. Zilele Universității*. Chișinău 15-17 oc

- tombrie 2008. p. 213-217.
125. POGONEA I., GHICAVÎI V., DUMBRAVA V., BUTOROV I., BACINSCHI N. Eficacitatea tratamentului complex cu imupurin al pacienților cu hepatite cronice de diferită geneză. În: *Anale științifice ediția X-a vol.1 Probleme medico-biologice și farma-ceutice. Zilele Universității*. Chișinău 21-23 octombrie 2009. p. 228-231.
  126. POGONEA I., BACINSCHI N., GHICAVĂI V., POPOVICI S. Tratamentul complex cu imupurin al formelor simptomatice și asimptomatice în HIV SIDA. În: *Anale științifice ediția XI-a vol.1 Probleme medico-biologice și farmaceutice. Zilele Universității*. Chișinău 19-21 octombrie 2011, p. 330-333.
  127. RAGHAVENDRA, R., et al., Protective effect of partially purified 35 kDa protein from silk worm (*Bombyx mori*) fecal matter against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity and in vitro anti-viral properties. In.: *Pharm Biol*. 2010 Dec;48(12):1426-31.
  128. RAJESWARAMMA, G., JAYASREE, D. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* seed extract. In: *IOSR J Dent Med Sci*. 2018, 17:18–22.
  129. RANNEH, Y., MAHMOUD, A.M., FADEL, A. et al. Acute Inflammation and Oxidative Stress Induced by Lipopolysaccharide and the Ameliorative Effect of Stingless Bee Honey. In: *Comb Chem High Throughput Screen*. 2021, 24(6):744-757. doi: 10.2174/1386 207323999200918152111.
  130. RATCLIFFE, N.A. et al. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. In: *Insect Biochem Mol Biol*. 2011 Oct;41(10):747-69.
  131. RATCLIFFE N, AZAMBUJA P, MELLO CB. Recent advances in developing insect natural products as potential modern day medicines. In: *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 904958.
  132. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radic Biol Med*. 1999;26:1231-1237. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
  133. ROS-BARÓ, M., et al. Edible Insect Consumption for Human and Planetary Health: A Systematic Review. In: *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Sep 15;19(18):11653. doi: 10.3390/ijerph191811653.
  134. RUIZ-RUIZ, JC., MATUS-BASTO. AJ., ACERETO-ESCOFFIÉ. P., SEGURACAMPOS. MR. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. In: *Food and Agricultural Immunology*. 2017, 28(6):1424-1437.
  135. SABA, R., SHAFEEQ, T., IRFAN, M. et al. Anti-Inflammatory Activity of Crude Venom Isolated from Parasitoid Wasp, *Bracon hebetor* Say. In: *Mediators of Inflammation*. 2017, ID articol 6978194.
  136. SAIKI, M., TAKEMOTO, N., NAGATA, M. et al. Analysis of Antioxidant and Antiallergic Active Components Extracted From the Edible Insect *Oxya yezoensis*. In: *Natural Product Communications*. 2021;16(5). doi:10.1177/1934578X211023363.
  137. SANZ, A., TRENZADO, C.E., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.J., FURNÉ, M, DE FIGUEROA, J.M. Study of antioxidant defense in four species of Perloidea (Insecta, Plecoptera). In: *Zoolog Sci*. 2010 Dec;27(12):952-8. doi: 10.2108/zsj.27.952. PMID: 21110722.
  138. SANCHEZ, M.L, CALTZONTZIN, V., FEREGRINO-PÉREZ, A.A. Nutritional Composition, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Different Samples of Water Boatmen Eggs (Hemiptera: Corixidae). In: *Foods*. 2022 Dec 21;12(1):28. doi: 10.3390/foods12010028.
  139. SARKAR, P., PECORELLI, A., WOODYBY, B. et al. Evaluation of Anti-

- Oxinflammatory and ACE-Inhibitory Properties of Protein Hydrolysates Obtained from Edible Non-Mulberry Silkworm Pupae (*Antheraea assama* and *Philosomia ricinii*). In: *Nutrients*. 2023 Feb 19;15(4):1035. doi: 10.3390/nu15041035.
140. SARVESWARAN, R., JAYASURIYA, W. J. A. B. N., SURESH, T.S. In vitro assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extracts: a review. In: *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2017, Vol 6, Issue 17, pp. 131-141.
  141. SIDDIQUI SA et al. Unravelling the potential of insects for medicinal purposes – A comprehensive review. In: *Heliyon*. 2023 Apr 29;9(5):e15938. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e15938.
  142. SOLIMAN, S. et al. The deleterious effect of xylene-induced ear edema in rats: Protective role of dexketoprofen trometamol transdermal invasomes via inhibiting the oxidative stress/NF- $\kappa$ B/COX-2 pathway. In: *International Journal of Pharmaceutics*. 2023, Volume 631, 122525, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122525>.
  143. SON, H., HEO, J., LEE, S. et al. Comparison of Anti-Oxidative and Cox-2 Promoter Activities of Lepidoptera Extracts. In: *Korean J. Food Preserv.* 2010, Vol. 17, No. 5. pp. 752-756.
  144. SOUSA, A.B., BARBOSA, J.N. The Use of Specialized Pro-Resolving Mediators in Biomaterial-Based Immunomodulation. In: *J Funct Biomater*. 2023 Apr 15;14(4):223. doi: 10.3390/jfb14040223.
  145. SOWA-JASIŁEK A, ZDYBICKA-BARABAS A, STĄCZEK S, et al. Antifungal Activity of Anionic Defense Peptides: Insight into the Action of *Galleria mellonella* Anionic Peptide 2. In: *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):1912.
  146. SPINEI, L., LOZAN, O., BADAN, V. *Biostatistica*. Univ. de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”; Școala de Management în Sănătate Publică. – Ch. : Școala de Management în Sănătate Publică, 2009. ISBN 978-9975-78-743-7.
  147. SUH H.-J., KIM S.-R., HWANG J.-S. et al. Antioxidant activity of aqueous methanol extracts from the lucanid beetle, *Serrognathus platymelus castanicolor* Motschulsky (Coleoptera: Lucanidae), *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2011, Volume 14, Issue 1, p. 95-98. ISSN 1226-8615. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.10.002>.
  148. TIAN, G., GU, X., BAO, K. et al. Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Pudilan Antiphlogistic Oral Liquid. In: *ACS Omega*. 2021 Dec 9;6(50):34512-34524.
  149. ȘVEȚ I, PANTEA V., TAGADIUC O., GUDUMAC V., POPA V., ANDRONACHE L. *Metodă de apreciere a activității ateroprotective a substanțelor biologice active*. Buletinul Oficial de Proprietate Intelectuală (BOPI), MD - BOPI 8/2019, pag. 54-55.
  150. TAGADIUC, O., ANDRONACHE, L., ȘTÎRBA O., SARDARI, V., PANTEA, V. *Determinarea glutation peroxidazei*. Certificat de inovator nr. 5161 din 26.10.2012. 299.
  151. TAGADIUC, O., GUDUMAC, V., PANTEA, V. *Procedeu de dozare a activității superoxidismutazei*. Certificat de inovator nr.4891 din 15.07.2010. 300.
  152. TAGADIUC, O., SARDARI, V., ANDRONACHE, L., ȘTÎRBA, O., PANTEA, V. *Determinarea glutation-Stransferazei (GST)*. Certificat de inovator nr.5163 din 29.10.2012.
  153. TAKEBAYASHI, J., IWAHASHI, N., ISHIMI, Y., TAI, A. Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). In: *Food Chemistry*. 2012, Volume 134, Issue 1, p. 606-610. ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.086>.
  154. TANG, Y., DEBNATH, T., CHOI, E.-J. et al. Changes in the amino acid profiles and free radical scavenging activities of *Tenebrio molitor* larvae following enzymatic hydrolysis. In: *PLoS ONE*. 2018; 13(5): e0196218.
  155. TIAN, G., GU, X., BAO, K. et al. Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of

- Pudilan Antiphlogistic Oral Liquid. In: *ACS omega*. 2021, 6(50), 34512–34524. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04797>.
156. TIMERCAN T. *Evaluarea unor modificări metabolice (glucidice, lipidice) și inflamatorii în infarct miocardic acut – studiu preclinic experimental*. 2020. Teza dr.șt.med., 161p.
  157. TROFIN A.E., TRINCĂ L.C., UNGUREANU E., ARITON A.M. CUPRAC Voltammetric Determination of Antioxidant Capacity in Tea Samples by Using Screen-Printed Microelectrodes. In: *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2019. Article ID 8012758 [doi.org/10.1155/2019/8012758](https://doi.org/10.1155/2019/8012758)
  158. UMAMAHESWARAN, S., DASARI, S.K., YANG, P. et al. Stress, inflammation, and eicosanoids: an emerging perspective. In: *Cancer Metastasis Rev*. 2018 Sep;37(2-3):203-211. doi: 10.1007/s10555-018-9741-1.
  159. VOGEL, H. GERHARD, et al., eds. *Drug discovery and evaluation: safety and pharmacokinetic assays*. New York: Springer, 2006.
  160. WEI, L. et al. A potent anti-inflammatory peptide from the salivary glands of horsefly. In: *Parasit Vectors*. 2015 Oct 24;8:556. doi: 10.1186/s13071-015-1149-y. PMID: 26496724; PMCID: PMC4619319.
  161. WANG, K.R. et al. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. In: *Peptides*. 2008 Jun;29(6):963-8. doi: 10.1016/j.peptides.2008.01.015. Epub 2008 Feb 3. PMID: 18328599.
  162. WANG, H., ZHAO, J.G., WEI, Z.G., ZHANG, Y.Q. The renal protection of flavonoid-rich ethanolic extract from silkworm green cocoon involves in inhibiting TNF- $\alpha$ -p38 MAP kinase signalling pathway in type 2 diabetic mice. In: *Biomed Pharmacother*. 2019;118:109379.
  163. WILLIAMS, D.M. Clinical pharmacology of corticosteroids. In: *Respir Care*. 2018;63(6):655-670. doi: 10.4187/respcare.06314.
  164. WOŁOSIAK, R. et al. Verification of the Conditions for Determination of Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays—A Practical Approach. In: *Molecules*. 2022; 27(1):50. [doi.org/10.3390/molecules27010050](https://doi.org/10.3390/molecules27010050)
  165. XIAO, R., PANG, Y., LI, Q.W. The buccal gland of *Lampetra japonica* is a source of diverse bioactive proteins. In: *Biochimie*. 2012 May; 94(5):1075-9. doi: 10.1016/j.biochi.2011.12.025. PMID: 22586701.
  166. XIE, J., ZHANG, D., LIU, C., WANG, L. A periodic review of chemical and pharmacological profiles of Tubiechong as insect Chinese medicine. In: *RSC Adv*. 2021, 11, 33952. DOI: 10.1039/d1ra05425b.
  167. XIN, F., CHUN-LI, C., YU-PING, L. et al. Metabolomics reveals abundant flavonoids in edible insect *Antheraea pernyi*. In: *Journal of Asia-Pacific Entomology*, Volume 24, Issue 3, 2021, Pages 711-715, ISSN 1226-8615, [doi.org/10.1016/j.aspen.2021.06.004](https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.06.004).
  168. XU, X., XIA, Q. Progress in immunomodulatory effects and their mechanisms of insect antimicrobial peptides. In: *Journal of Medical Postgraduates*. 2020, (12): 771-776.
  169. YEUNG, A.T, GELLATLY, S.L., HANCOCK, R.E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. In: *Cell Mol Life Sci*. 2011 Jul;68(13):2161-76.
  170. YANG, H.L., KORIVI, M., LIN, M.K. et al. Antihemolytic and antioxidant properties of pearl powder against 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced hemolysis and oxidative damage to erythrocyte membrane lipids and proteins. In: *J Food Drug Anal*. 2017 Oct;25(4):898-907. doi: 10.1016/j.jfda.2016.10.007.
  171. ZHANG, X., GONCALVES, R., MOSSER, D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. In: *Curr Protoc Immunol*. 2008 Nov; Chapter 14:14.1.1-14.1.14. doi: 10.1002/0471142735.im1401s83. PMID: 19016445; PMCID: PMC2834554..

172. ZHANG, Y., DONG, Z., ZHAO, D. et al. Comparison of Chemical Constituents of Wild Silkworm Cocoon and Domestic Silkworm Cocoon by UHPLC-MS Technology. In: *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2019; 35(8):1546-1556.
173. ZHAO, H.W. et al. Experimental selection for *Drosophila* survival in extremely high O<sub>2</sub> environments. In: *PLoS One*, 2010 Jul 23;5(7):e11701.
174. ZHAO, H.W., ZHOU, D., HADDAD, G.G. Antimicrobial peptides increase tolerance to oxidant stress in *Drosophila melanogaster*. In: *J Biol Chem*. 2011 Feb 25;286(8):6211-8.
175. ZHAO, P., et al., Antiviral, anti-parasitic, and cytotoxic effects of 5,6-dihydroxyindole (DHI), a reactive compound generated by phenoloxidase during insect immune response. In: *Insect Biochem Mol Biol*. 2011 Sep;41(9):645-52.
176. ZEDAN, A.M.G., SAKRAN, M.I., BAHATTAB, O. et al. Oriental Hornet (*Vespa orientalis*) Larval Extracts Induce Antiproliferative, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Migratory Effects on MCF7 Cells. In: *Molecules*. 2021 May 31;26(11):3303. doi: 10.3390/molecules26113303.
177. ZHENG, S. et al. Advanced Oxidation Protein Products Induce Inflammatory Response in Fibroblast-Like Synoviocytes through NADPH Oxidase -Dependent Activation of NF-κB. In: *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2013; 32 (4): 972–985. <https://doi.org/10.1159/000354500>.
178. ZHOU, Y., WANG, D., ZHOU, S. et al. Nutritional Composition, Health Benefits, and Application Value of Edible Insects: A Review. In: *Foods*. 2022, Dec 7;11(24):3961. doi: 10.3390/foods11243961.
179. ZIELIŃSKA, E., BARANIAK, B., KARAS, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydrolysates and Peptide Fractions Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Selected Heat-Treated Edible Insects. In: *Nutrients*. 2017, Sep 2;9(9):970. doi: 10.3390/nu9090970.
180. ZIELIŃSKA, E., BARANIAK, B., KARAS, M. E Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insects species (*Gryllobates sigillatus*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria*). In: *International Journal of Food Science and Technology*. 2018, 53, 2542–2551. doi.org/10.1111/ijfs.13848.
181. ZOU, C.G., AGAR, N.S., JONES, G.L. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. In: *Life Sci*. 2001 May 25;69(1):75-86. doi: 10.1016/s0024-3205(01)01112-2.
182. БАЧИНСКИЙ, Н.Г., ГИКАВЫЙ, В.И., ПОГОНЯ, И.Н. Влияние энтомологических препаратов на процессы перекисного окисления липидов при токсических поражениях печени. В: *Клінічна та експериментальна фармакологія метаболічних коректорів, органопротекція, доказова медицина. Матеріали VI Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології, присвяченої 90-річчю професора О.О.Столярчука*. 2010. Вінниця, Україна, 2010, с. 38-47.
183. БАЧИНСКИЙ, Н.Г., ПОГОНЯ, И.Н., ГИКАВЫЙ, В.И. Иммунотропные свойства энтомологических препаратов. В.: *Международная конференция по медицине и физиологии –Phsiomedi*. 2010, Санкт-Петербург, с. 30-40.
184. ВАСИЛЕНКО, Ю.К., КЛИМОВА, О.В., ЛАЗАРЯН, Д.С. Биологические свойства трутневого расплода в условиях длительной гиперлипидемии. В: *Химико-фармацевтический журнал*, 2002, №8, с. 34-36.
185. ВАСИЛЕНКО, Ю.К., ЛАЗАРЯН, Д.С., КЛИШИНА, И.И. Сравнительное изучение иммуно- и гепатотропного действия продуктов пчеловодства у крыс при химической интоксикации. В: *Химико-фармацевтический журнал*, 2005, №6, с. 36-38.



186. ВЛАСОВА, СН., ШАБУНИНА, ЕИ., ПЕРЕСЛЕГИНА, ИА. Активность глутатионозависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. В: *Лаб. дело*. 1990;8: с. 19-22.
187. ГАЛАКТИОНОВА, Л.П., МОЛЧАНОВ, А.В., ЕЛЬЧАНИНОВА, С.А., ВАРШАВСКИЙ, Б.Я. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. В: *Лаб. Дело*. 1998; 6: с. 10-14.
188. ГИКАВЫЙ, В.И., БАЧИНСКИЙ, Н.Г., ПОГОНЯ, И.Н. Изучение гепатопротекторных свойств энтомологических препаратов. В: *Клиническая фармакология и терапия. Вторая Международная конференция «Информация о лекарственных средствах – качественному использованию лекарств»*. Казань, 2010, № 6, с. 254-257. ISSN 0869 5490.
189. ГИКАВЫЙ, В.И., БАЧИНСКИЙ, Н.Г., ПОГОНЯ, И.Н. Фармакологические эффекты энтомологических препаратов. В.: *«Клинической фармакологии в Республике Беларусь-25 лет» Материалы научно-практической конференции с международным участием*, 2010. «Равнодействие», 2010, с. 57-61.
190. ГИКАВЫЙ, В.И., ПОГОНЯ, И.Н., БАЧИНСКИЙ, Н.Г. Эффективность имупурина при повреждении печени различной этиологии. В.: *«Клинической фармакологии в Республике Беларусь-25 лет» Материалы научно-практической конференции с международным участием*, 2010. «Равнодействие», с. 62-65.
191. ГИКАВЫЙ, В.И., БАЧИНСКИЙ, Н.Г., ПОГОНЯ, И.Н. Биологически активные вещества энтомологического происхождения и их эффекты. В: *Клиническая фармакология и фармакотерапия заболеваний в свете доказательной медицины. Материалы VII Всеукраинской научно-практической конференции с международным участием по клинической фармакологии*. Винница, 2013, с. 9-26.
192. ДОЛМАТОВА, Л.С., УЛАНОВА, О.А., ДОЛМАТОВ, И.Ю. Сравнительное исследование действия дексаметазона и нового экстракта из голотурий на уровень цитокиноподобных веществ в отдельных типах иммунцитов голотурии *Eupentacta Fraudatrix*. В: *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014, 1, с. 34-38.
193. ДУБОВСКИЙ, И.М. и др. Генерация активированных кислородных метаболитов и активность антиоксидантов в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pupalidae) при развитии процесса инкапсуляции. В: *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, 2010, т. 46, №1, с. 30-36.
194. ДУБОВСКИЙ, И.М. и др. Активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансферазы у личинок саранчи (*Locusta migratoria*) при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopilae* (Ascomycota, Hypocreales). В: *Зоологический журнал*, 2011, т.90, №11, с.1360-1364.
195. ЕРШОВ Ф.И. и др. *Применение аллокина-альфа в терапии вирусных инфекций*. Москва-Санкт-Петербург. 2008. 91 с.
196. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств* (под ред. МИРОНОВА А.Н.). Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
197. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ* (под ред. ХАБРИЕВА Р.У.). Второе изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2005. - 832 с.
198. САЛТЫКОВА, Е.С., ГАЙФУЛЛИНА, ЛЛ.Р., НИКОЛЕНКО, А.Г. Онтогенез насекомых и формирование защитных реакций. В: *Энтомологические исследования в Северной Азии. Материалы Межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока с участием зарубежных ученых*. Новосибирск, 2010, с.297-299.
199. ЧЕРНЫШ С.И. Аллокины (цитокинноподобные пептиды насекомых) как модуляторы иммунного ответа человека и других млекопитающих. В: *Russian*

- Journal of immunology*. 2004, v.9, s.1,36
200. ЧЕРНЫШ, С.И., ГОРДЯ, Н.А. Иммуная система личинок *Callphora vicina* (Diptera, Callphoridae) как источник лекарственных веществ. В: *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2011, т.47, нр.6, с.444-452.

## ANEXE

### Anexa 1. Influența imuheptinului și imupurinului asupra reducerii radicalului ABTS

Loturile experimentale	Procentul de inhibiție a ABTS, % $X \pm DS$ (Mediana; AIQ)	Loturile experimentale	Procentul de inhibiție a ABTS, % $X \pm DS$ (Mediana; AIQ)
1. control (soluție tampon fosfat)	1,82±1,1 (1,4; 2,2)	1. control (soluție tampon fosfat)	1,82±1,1 (1,4; 2,2)
2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	32,34±2,9 (31,9; 4,5) $P_{2-1}=0,000$	2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	32,34±2,9 (31,9; 4,5) $P_{2-1}=0,000$
3. trolox 33,3 μg/ml	59,84±3,9 (59,0; 8,3) $P_{3-1}=0,000$	3. trolox 33,3 μg/ml	59,84±3,9 (59,0; 8,3) $P_{3-1}=0,000$
4. Diclofenac 33,3 μg/ml	8,48±1,95 (8,5; 2,9) $P_{4-1}=1,000; P_{4-3}=0,001$	4. Diclofenac 33,3 μg/ml	8,48±1,95 (8,5; 2,9) $P_{4-1}=1,000; P_{4-3}=0,006$
5. Diclofenac 11,1 μg/ml	9,94±2,74 (10,5; 4,1) $P_{5-1}=1,000; P_{5-3}=0,009$	5. Diclofenac 11,1 μg/ml	9,94±2,74 (10,5; 4,1) $P_{5-1}=1,000; P_{5-3}=0,008$
6. Extract etanolic imuheptin 333,3 μg/ml	25,72±3,8 (25,4; 6,8) $P_{6-1}=0,000; P_{6-2,3}=1,000$ $P_{6-4}=0,191; P_{6-5}=0,771$	6. Extract etanolic imupurin 333,3 μg/ml	30,64±5,72 (30,3; 11,7) $P_{6-1}=0,000; P_{6-2,3}=1,000$ $P_{6-4}=0,145; P_{6-5}=0,584$
7. Extract etanolic imuheptin 111,1 μg/ml	16,28±2,4 (15,6; 4,4) $P_{7-1}=0,047;$ $P_{7-2,3,4,5}=1,000$	7. Extract etanolic imupurin 111,1 μg/ml	16,01±2,17 (15,8; 3,3) $P_{7-1}=0,077$ $P_{7-2,3,4,5}=1,000$
8. Extract etanolic imuheptin 37 μg/ml	13,42±1,7 (13,0; 3,3) $P_{8-1}=0,489$ $P_{8-2,4,5}=1,000; P_{8-3}=0,241$	8. Extract etanolic imupurin 37 μg/ml	12,11±3,15 (12,0; 5,4) $P_{8-1,2,5}=1,000$ $P_{8-3}=0,049$
9. Extract etanolic imuheptin 12,3 μg/ml	10,21±1,6 (10,3; 2,8) $P_{9-1,4,5}=1,000$ $P_{9-2}=0,215; P_{9-3}=0,008$	9. Extract etanolic imupurin 12,3 μg/ml	10,04±1,95 (9,5; 3,8) $P_{9-1,4,5}=1,000$ $P_{9-2}=0,260; P_{9-3}=0,006$
10. Extract hidric imuheptin 333,3 μg/ml	39,97±3,3 (39,2; 6,6) $P_{10-1}=0,000; P_{10-2,3}=1,000$ $P_{10-4}=0,008; P_{10-5}=0,049$	10. Extract hidric imupurin 333,3 μg/ml	47,14±4,44 (46,1; 6,9) $P_{10-1}=0,000; P_{10-2,3}=1,000$ $P_{10-4}=0,008; P_{10-5}=0,043$
11. Extract hidric imuheptin 111,1 μg/ml	19,77±2,71 (19,7; 4,9) $P_{11-1}=0,004$ $P_{11-2,3,5}=1,000; P_{11-4}=0,977$	11. Extract hidric imupurin 111,1 μg/ml	24,89±2,47 (24,4; 3,9) $P_{11-1}=0,001$ $P_{11-2,3,5}=1,000; P_{11-4}=0,525$
12. Extract hidric imuheptin 37 μg/ml	15,97±3,45 (16,2; 6,3) $P_{12-1}=0,070; P_{12-3,4,5}=1,000$	12. Extract hidric imupurin 37 μg/ml	16,45±2,94 (15,9; 5,1) $P_{12-1}=0,083; P_{12-2,4,5}=1,000$ $P_{12-3}=0,977$
13. Extract hidric imuheptin 12,3 μg/ml	9,91±3,18 (9,8; 6,2) $P_{13-1,4,5}=1,000; P_{13-3}=0,206$ $P_{13-3}=0,008$	13. Extract hidric imupurin 12,3 μg/ml	12,41±2,63 (11,8; 5,3) $P_{13-1,2,4,5}=1,000$ $P_{13-3}=0,072$

**Notă:** p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni ( $\bar{II}=95\%$ )

## Anexa 2. Influența imuheptinului asupra activității paraoxonazei/arilesterazei

Loturile experimentale	Procentul de activare a paraoxonazei/arilesterazei, % X±DS (Mediana; AIQ)	Loturile experimentale	Procentul de activare a paraoxonazei/arilesterazei, % X±DS (Mediana; AIQ)
1. control (soluție tampon fosfat)	100,0±5,0 (100,7; 6,9)	1. control (soluție tampon fosfat)	100,0±5,0 (100,7; 6,9)
2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	113,4±3,3 (114,3; 6,0) P <sub>2-1</sub> =1,000	2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	113,4±3,3 (114,3; 6,0) P <sub>2-1</sub> =0,861
3. trolox 33,3 μg/ml	115,5±3,4 (116,2; 6,4) P <sub>3-1</sub> =0,537	3. trolox 33,3 μg/ml	115,5±3,4 (116,2; 6,4) P <sub>3-1</sub> =0,444
4. Diclofenac 33,3 μg/ml	93,4±2,5 (93,8; 4,8) P <sub>4-1</sub> =1,000	4. Diclofenac 33,3 μg/ml	93,4±2,5 (93,8; 4,8) P <sub>4-1</sub> =1,000
5. Diclofenac 11,1 μg/ml	103,4±3,8 (102,2; 6,9) P <sub>5-1</sub> =1,000	5. Diclofenac 11,1 μg/ml	103,4±3,8 (102,2; 6,9) P <sub>5-1</sub> =1,000
6. Extract etanolic imuheptin 1000 μg/ml	135,5±7,5 (136,9; 13,6) P <sub>6-1</sub> =0,001 P <sub>6-2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,001	6. Extract hidric imuheptin 1000 μg/ml	156,2±8,4 (157,3; 16,1) P <sub>6-1</sub> =0,004 P <sub>6-2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,001; P <sub>6-5</sub> =0,277
7. Extract etanolic imuheptin 500 μg/ml	130,49±6,2 (130,6; 11,9) P <sub>7-1</sub> =0,004 P <sub>7-2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,004 P <sub>7-5</sub> =0,268	7. Extract hidric imuheptin 500 μg/ml	146,5±7,3 (146,3; 13,5) P <sub>7-1</sub> =0,012 P <sub>7-2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,003 P <sub>7-5</sub> =0,588
8. Extract etanolic imuheptin 250 μg/ml	124,9±9,46 (125,3; 18,3) P <sub>8-1</sub> =0,034; P <sub>8-2,3</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,023; P <sub>8-5</sub> =0,996	8. Extract hidric imuheptin 250 μg/ml	126,9±7,9 (128,6; 14,7) P <sub>8-1</sub> =0,079; P <sub>8-2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,016
9. Extract etanolic imuheptin 125 μg/ml	120,6±8,5 (121,3; 16,3) P <sub>9-1</sub> =0,108 P <sub>9-2,3,5</sub> =1,000; P <sub>9-4</sub> =0,061	9. Extract hidric imuheptin 125 μg/ml	111,9±2,4 (111,8; 4,6) P <sub>9-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,243
10. Extract etanolic imuheptin 62,5 μg/ml	116,2±6,3 (116,1; 11,9) P <sub>10-1</sub> =0,498 P <sub>10-2,3,5</sub> =0,498; P <sub>10-4</sub> =0,228	10. Extract hidric imuheptin 62,5 μg/ml	106,1±1,8 (106,8; 3,1) P <sub>10-1,2,3,4,5</sub> =1,000
11. Extract etanolic imuheptin 31,25 μg/ml	109,8±5,2 (109,6; 10,0) P <sub>11-1,2,3,4,5</sub> =1,000	11. Extract hidric imuheptin 31,25 μg/ml	103,5±1,3 (103,7; 2,4) P <sub>11-1,2,3,4,5</sub> =1,000
12. Extract etanolic imuheptin 15,62 μg/ml	106,9±4,1 (105,9; 7,4) P <sub>12-1,2,3,4,5</sub> =1,000	12. Extract hidric imuheptin 15,62 μg/ml	96,3±2,6 (96,7; 4,7) P <sub>12-1,4,5</sub> =1,000 P <sub>12-2</sub> =0,406; P <sub>12-3</sub> =0,228

**Notă:** p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

### Anexa 3. Influența imupurinelor asupra activității paraoxonazei (PON)/arilesterazei

Loturile experimentale	Procentul de activare a PON/ arilesterazei, % X±DS (Mediana; AIQ)	Loturile experimentale	Procentul de activare a PON/ arilesterazei, % X±DS (Mediana; AIQ)
1. control (soluție tampon fosfat)	100,0±5,0 (100,7; 6,9)	1. control (soluție tampon fosfat)	100,0±5,0 (100,7; 6,9)
2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	113,43±3,3 (114,3; 6,0) P <sub>2-1</sub> =0,114	2. acid ascorbic 33,3 μg/ml	113,43±3,3 (114,3; 6,0) P <sub>2-1</sub> =1,000
3. trolox 33,3 μg/ml	115,5±3,4 (116,2; 6,4) P <sub>3-1</sub> =0,033	3. trolox 33,3 μg/ml	115,5±3,4 (116,2; 6,4) P <sub>3-1</sub> =0,396
4. Diclofenac 33,3 μg/ml	93,4±2,5 (93,8; 4,8) P <sub>4-1</sub> =1,000 P <sub>4-2</sub> =0,015; P <sub>4-3</sub> =0,005	4. Diclofenac 33,3 μg/ml	93,4±2,5 (93,8; 4,8) P <sub>4-1</sub> =1,000
5. Diclofenac 11,1 μg/ml	103,4±3,8 (102,2; 6,8) P <sub>5-1</sub> =1,000	5. Diclofenac 11,1 μg/ml	103,4±3,8 (102,2; 6,8) P <sub>5-1</sub> =1,000
6. Extract etanolic imupurin 1000 μg/ml	117,2±1,1 (117,2; 2,2) P <sub>6-1</sub> =0,010; P <sub>6-2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,002; P <sub>6-5</sub> =0,791	6. Extract hidric imupurin 1000 μg/ml	148,5±4,1 (147,4; 7,3 ) P <sub>6-1</sub> =0,000; P <sub>6-2,3</sub> =1,000 P <sub>6-4</sub> =0,001; P <sub>6-5</sub> =0,081
7. Extract etanolic imupurin 500 μg/ml	111,7±1,8 (111,4; 3,4) P <sub>7-1</sub> =0,241 P <sub>7-3,4,5</sub> =1,000; P <sub>7-4</sub> =0,031	7. Extract hidric imupurin 500 μg/ml	136,0±3,5 (135,4; 6,6) P <sub>7-1</sub> =0,003; P <sub>7-2,3</sub> =1,000 P <sub>7-4</sub> =0,003; P <sub>7-5</sub> =0,260
8. Extract etanolic imupurin 250 μg/ml	109,6±1,3 (109,2; 2,3) P <sub>8-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,124	8. Extract hidric imupurin 250 μg/ml	125,6±7,7 (125,5; 13,4) P <sub>8-1</sub> =0,017 P <sub>8-2,3</sub> =1,000 P <sub>8-4</sub> =0,012; P <sub>8-5</sub> =0,703
9. Extract etanolic imupurin 125 μg/ml	106,16±0,99 (106,2; 1,9) P <sub>9-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>9-4</sub> =0,888	9. Extract hidric imupurin 125 μg/ml	116,7±3,2 (117,3; 5,9) P <sub>9-1</sub> =0,194 P <sub>9-2,3,5</sub> =1,000; P <sub>9-4</sub> =0,093
10. Extract etanolic imupurin 62,5 μg/ml	103,5±2,4 (103,6; 4,4) P <sub>10-1,2,3,4,5</sub> =1,000	10. Extract hidric imupurin 62,5 μg/ml	112,8±3,4 (112,9; 6,5) P <sub>10-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>10-4</sub> =0,587
11. Extract etanolic imupurin 31,25 μg/ml	102,0±1,0 (102,4; 1,7) P <sub>11-1,2,4,5</sub> =1,000 P <sub>11-3</sub> =0,703	11. Extract hidric imupurin 31,25 μg/ml	109,0±4,3 (107,8; 7,8) P <sub>11-1,2,3,4,5</sub> =1,000
12. Extract etanolic imupurin 15,62 μg/ml	96,8±3,4 (98,1; 5,8) P <sub>12-1,4,5</sub> =1,000 P <sub>12-2</sub> =0,056; P <sub>12-4</sub> =0,019	12. Extract hidric imupurin 15,62 μg/ml	105,3±4,4 (104,5; 8,3) P <sub>12-1,2,3,5</sub> =1,000 P <sub>12-4</sub> =0,587

Notă: p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

**Anexa 4. Efectul imuheptinului asupra nivelurilor de citokine macrofage la stimularea cu lipopolizaharide (LPS)**

Parametrii	TNF-alfa, <i>pg /ml</i>	IL-6, <i>pg /ml</i>	IL-10, <i>pg /ml</i>
	<i>X±DS</i>		
1. Macrofage nestimulate, control negativ	36,7±0,6	35,23±0,25	8,67±3,75
2. Macrofage stimulate de LPS, control pozitiv	1388,4±39,1 <i>p</i> <sub>1-2</sub> =0,008	55,6±0,8 <i>p</i> <sub>1-2</sub> =1,000	313,9±24,4 <i>p</i> <sub>1-2</sub> =1,000
3. Macrofage stimulate cu LPS + dexametazonă 1 µg/ml	417,1±61,8 <i>p</i> <sub>1-3</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-3</sub> =0,045	34,3±0,7 <i>p</i> <sub>1-3</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-3</sub> =0,105	440,7±47,5 <i>p</i> <sub>1-3</sub> =0,038 <i>p</i> <sub>2-3</sub> =1,000
4. Macrofage stimulate cu LPS + imuheptin extract etanolic (diluție 1:10)	661,4±75,8 <i>p</i> <sub>1-4</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-4</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-4</sub> =1,000	34,5±0,5 <i>p</i> <sub>1-4</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-4</sub> =0,179 <i>p</i> <sub>3-4</sub> =1,000	626,2±15,8 <i>p</i> <sub>1-4</sub> =0,008 <i>p</i> <sub>2-4</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-4</sub> =1,000
5. Macrofage stimulate cu LPS + imuheptin extract etanolic (diluție 1: 100)	1021,4±115,7 <i>p</i> <sub>1-5</sub> =0,099 <i>p</i> <sub>2-5</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-5</sub> =0,423	35,5±0,2 <i>p</i> <sub>1-5</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-5</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-5</sub> =1,000	334,5±23,9 <i>p</i> <sub>1-5</sub> =0,715 <i>p</i> <sub>2-5</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-5</sub> =1,000
6. Macrofage stimulate cu LPS + imuheptin extract etanolic (diluție 1: 200)	865,0±4,2 <i>p</i> <sub>1-6</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-6</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-6</sub> =1,000	35,3±0,4 <i>p</i> <sub>1-6</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-6</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-6</sub> =1,000	281,63±4,85 <i>p</i> <sub>1-6</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-6</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-6</sub> =0,715
7. Macrofage stimulate cu LPS + imuheptin extract hidric (diluție 1:10)	481,6±22,4 <i>p</i> <sub>1-7</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-7</sub> =0,135 <i>p</i> <sub>3-7</sub> =1,000	38,5±5,3 <i>p</i> <sub>1-7</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-7</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-7</sub> =1,000	294,4±31,8 <i>p</i> <sub>1-7</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-7</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-7</sub> =1,000
8. Macrofage stimulate cu LPS + extract hidric de imuheptin (diluție 1: 100)	991,5±38,7 <i>p</i> <sub>1-8</sub> =0,135 <i>p</i> <sub>2-8</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-8</sub> =0,552	34,5±0,4 <i>p</i> <sub>1-8</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-8</sub> =0,207 <i>p</i> <sub>3-8</sub> =1,000	301,8±20,5 <i>p</i> <sub>1-8</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-8</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-8</sub> =1,000
9. Macrofage stimulate cu LPS + extract hidric de imuheptin (diluție 1: 200)	900,6±155,0 <i>p</i> <sub>1-9</sub> =0,423 <i>p</i> <sub>2-9</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-9</sub> =1,000	34,4±1,1 <i>p</i> <sub>1-9</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-9</sub> =0,275 <i>p</i> <sub>3-9</sub> =1,000	312,5±57,4 <i>p</i> <sub>1-9</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>2-9</sub> =1,000 <i>p</i> <sub>3-9</sub> =1,000

**Notă:** **p** – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

**Anexa 5. Efectul impurinelor asupra nivelurilor citokinilor în macrofage stimulate cu lipopolizaharide (LPS)**

Parametrii	TNF-alfa, pg /ml	IL-6, pg /ml	IL-10, pg /ml
	X±DS		
1. Macrofage nestimate , control negativ	36,7±0,6	35,2±0,2	8,7±3,7
2. Macrofage stimulate de LPS, control pozitiv	1388,4±39,1 $p_{1-2}=0,008$	55,6±0,8 $p_{1-2}=1,000$	313,9±24,4 $p_{1-2}=1,000$
3. Macrofage stimulate cu LPS + dexametazonă 1 µg/ml	417,1±61,8 $p_{1-3}=1,000$ $p_{2-3}=0,038$	34,3±0,7 $p_{1-3}=1,000$ $p_{2-3}=0,156$	440,7±47,5 $p_{1-3}=0,019$ $p_{2-3}=1,000$
4. Macrofage stimulate cu LPS + impurin extract etanolic (diluție 1:10)	1016,6±37,9 $p_{1-4}=1,000$ $p_{2-4}=1,000$ $p_{3-4}=1,000$	34,9±0,9 $p_{1-4}=1,000$ $p_{2-4}=0,514$ $p_{3-4}=1,000$	232,7±6,6 $p_{1-4}=1,000$ $p_{2-4}=1,000$ $p_{3-4}=0,116$
5. Macrofage stimulate cu LPS + impurin extract etanolic (diluție 1: 100)	1204,9±48,9 $p_{1-5}=0,243$ $p_{2-5}=1,000$ $p_{3-5}=0,811$	34,3±0,6 $p_{1-5}=1,000$ $p_{2-5}=0,134$ $p_{3-5}=1,000$	311,0±24,2 $p_{1-5}=1,000$ $p_{2-5}=1,000$ $p_{3-5}=1,000$
6. Macrofage stimulate cu LPS + impurin extract etanolic (diluție 1: 200)	1151,4±96,9 $p_{1-6}=0,863$ $p_{2-6}=1,000$ $p_{3-6}=1,000$	33,5±0,4 $p_{1-6}=1,000$ $p_{2-6}=0,013$ $p_{3-6}=1,000$	358,1±12,5 $p_{1-6}=0,157$ $p_{2-6}=1,000$ $p_{3-6}=1,000$
7. Macrofage stimulate cu LPS + extract hidric de impurin (diluție 1:10)	942,2±137,6 $p_{1-7}=1,000$ $p_{2-7}=0,918$ $p_{3-7}=1,000$	52,1±0,7 $p_{1-7}=1,000$ $p_{2-7}=1,000$ $p_{3-7}=0,549$	444,3±109,1 $p_{1-7}=0,053$ $p_{2-7}=1,000$ $p_{3-7}=1,000$
8. Macrofage stimulate cu LPS + extract hidric de impurin (diluție 1: 100)	1238,1±46,6 $p_{1-8}=0,135$ $p_{2-8}=1,000$ $p_{3-8}=0,484$	49,0±0,9 $p_{1-8}=1,000$ $p_{2-8}=1,000$ $p_{3-8}=1,000$	283,7±15,7 $p_{1-8}=1,000$ $p_{2-8}=1,000$ $p_{3-8}=0,811$
9. Macrofage stimulate cu LPS + extract hidric de impurin (diluție 1: 200)	1198,8±82,5 $p_{1-9}=0,322$ $p_{2-9}=1,000$ $p_{3-9}=1,000$	36,1±2,1 $p_{1-9}=1,000$ $p_{2-9}=1,000$ $p_{3-9}=1,000$	333,7±35,4 $p_{1-9}=1,000$ $p_{2-9}=1,000$ $p_{3-9}=1,000$

**Notă:** p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

**Anexa 6. Influența imuheptinului și imupurinului asupra nivelului dialdehidei malonice (DAM) în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS *in vitro***

Parametri	DAM, $\mu\text{M/L}$	DAM, $\mu\text{M/L}$	Parametri	DAM, $\mu\text{M/L}$	DAM, $\mu\text{M/L}$
	X $\pm$ DS				
Loturi testate	- LPS	+LPS	Grupele testate	- LPS	+LPS
1. Control	11,8 $\pm$ 1,0	17,0 $\pm$ 1,7 P <sub>LPS- /LPS+</sub> =0,007	1. Control	11,8 $\pm$ 1,0	17,0 $\pm$ 1,7 P <sub>LPS- /LPS+</sub> =0,008
2. Dexametazon ă 1 $\mu\text{g/ml}$	13,5 $\pm$ 0,6 P <sub>1-2</sub> =1,000	12,5 $\pm$ 0,6 P <sub>1-2</sub> =0,970	2. Dexametaz onă 1 $\mu\text{g/ml}$	13,5 $\pm$ 0,6 P <sub>1-2</sub> =1,000	12,5 $\pm$ 0,7 P <sub>1-2</sub> =0,774
3. Dexametazon ă 10 $\mu\text{g/ml}$	12,3 $\pm$ 0,7 P <sub>1-3</sub> =1,000	12,8 $\pm$ 0,7 P <sub>1-3</sub> =1,000	3. Dexametaz onă 10 $\mu\text{g/ml}$	12,3 $\pm$ 0,7 P <sub>1-3</sub> =1,000	12,8 $\pm$ 0,7 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imuheptin hidro- alcoolic 1:10	12,5 $\pm$ 0,8 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	13,9 $\pm$ 0,6 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	4. Imupurin hidro-alc 1:10	11,2 $\pm$ 1,3 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	11,3 $\pm$ 1,2 P <sub>1-4</sub> =0,025 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imuheptin hidro- alcoolic 1:100	11,3 $\pm$ 0,4 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	11,2 $\pm$ 1,1 P <sub>1-5</sub> =0,017 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	5. Imupurin hidro-alc 1:100	11,1 $\pm$ 0,5 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	13,8 $\pm$ 0,3 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imuheptin hidro- alcoolic 1:200	12,0 $\pm$ 1,7 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	10,3 $\pm$ 1,2 P <sub>1-6</sub> =0,002 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> >0,05	6. Imupurin hidro-alc 1:200	12,8 $\pm$ 0,5 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	13,4 $\pm$ 1,1 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000
7. Imuheptin hidric 1:10	11,4 $\pm$ 0,5 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	12,3 $\pm$ 0,6 P <sub>1-7</sub> =0,428 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	7. Imupurin hidric 1:10	13,0 $\pm$ 0,8 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	11,7 $\pm$ 0,2 P <sub>1-7</sub> =0,027 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imuheptin hidric 1:100	12,4 $\pm$ 0,4 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	13,2 $\pm$ 0,3 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	8. Imupurin hidric 1:100	11,9 $\pm$ 1,0 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	12,9 $\pm$ 0,8 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imuheptin hidric 1:200	11,5 $\pm$ 0,4 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	12,4 $\pm$ 0,7 P <sub>1-9</sub> =0,651 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	9. Imupurin hidric 1:200	10,1 $\pm$ 1,0 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =0,506 P <sub>3-9</sub> =1,000	11,0 $\pm$ 1,9 P <sub>1-9</sub> =0,029 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000

**Notă:** p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni ( $\text{Î}=95\%$ )



**Anexa 7. Influența imuheptinului și imupurinului asupra nivelului ceruloplasminei (CP) în macrofagele peritoneale în inflamația indusă prin LPS *in vitro***

Parametri	CP, mg/L	CP, mg/L	Parametri	CP, mg/L	CP, mg/L
	X±DS				
Grupele testate	- LPS	+LPS <sup>#</sup>	Grupele testate	- LPS	+LPS <sup>#</sup>
1. Control	87,0±12,5	155,5±21,3 P <sub>LPS- /LPS+</sub> =0,002	1. Control	87,0±12,5	155,5±21,3 P <sub>LPS- /LPS+</sub> =0,033
2. Dexametazonă 1 µg/ml	76,4±1,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	165,2±0,4 P <sub>1-2</sub> =1,000	2. Dexametazonă 1 µg/ml	76,4±1,9 P <sub>1-2</sub> =1,000	165,2±0,4 P <sub>1-2</sub> =1,000
3. Dexametazonă 10 µg/ml	157,3±5,3 P <sub>1-3</sub> =0,190	241,2±13,2 P <sub>1-3</sub> =0,790	3. Dexametazonă 10 µg/ml	157,3±5,3 P <sub>1-3</sub> =1,000	241,2±13,2 P <sub>1-3</sub> =1,000
4. Imuheptin hidro-alcoolic 1:10	142,6±0,4 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,997 P <sub>3-4</sub> =1,000	215,6±22,2 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000	4. Imupurin hidro-alc 1:10	171,9±16,2 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,142 P <sub>3-4</sub> =1,000	233,3±2,3 P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =1,000 P <sub>3-4</sub> =1,000
5. Imuheptin hidro-alcoolic 1:100	106,1±3,8 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	196,4±22,6 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	5. Imupurin hidro-alc 1:100	118,5±1,1 P <sub>1-5</sub> =0,094 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000	146,4±2,7 P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =1,000 P <sub>3-5</sub> =1,000
6. Imuheptin hidro-alcoolic 1:200	120,0±7,9 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	165,2±12,4 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	6. Imupurin hidro-alc 1:200	101,6±2,3 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =1,000	77,9±1,9 P <sub>1-6</sub> =1,000 P <sub>2-6</sub> =1,000 P <sub>3-6</sub> =0,052
7. Imuheptin hidric 1:10	161,8±6,0 P <sub>1-7</sub> =0,067 P <sub>2-7</sub> =0,071 P <sub>3-7</sub> =1,000	235,9±12,4 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000	7. Imupurin hidric 1:10	168,9±10,2 P <sub>1-7</sub> =0,094 P <sub>2-7</sub> =0,142 P <sub>3-7</sub> =1,000	245,7±2,6 P <sub>1-7</sub> =1,000 P <sub>2-7</sub> =1,000 P <sub>3-7</sub> =1,000
8. Imuheptin hidric 1:100	92,6±8,3 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	158,0±4,5 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000	8. Imupurin hidric 1:100	162,5±15,8 P <sub>1-8</sub> =0,334 P <sub>2-8</sub> =0,396 P <sub>3-8</sub> =1,000	166,7±1,1 P <sub>1-8</sub> =1,000 P <sub>2-8</sub> =1,000 P <sub>3-8</sub> =1,000
9. Imuheptin hidric 1:200	88,0±6,1 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	127,9±6,8 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,234	9. Imupurin hidric 1:200	76,8±0,8 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =1,000	118,9±6,0 P <sub>1-9</sub> =1,000 P <sub>2-9</sub> =1,000 P <sub>3-9</sub> =0,952

**Notă:** p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni (Î=95%)

**Anexa 8. Influența imuheptinului și imupurinului asupra nivelului citokinelor în inflamația subacută**

Loturile de animale	TNF-alfa, pg/ml	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml	Ceruloplasmina mg/L
	X±DS			
1. Lotul martor, soluție fiziologică	48,7±10,8 (46,7; 17,7)	33,6±0,6 (33,7; 0,95)	32,3±13,4 (29,5; 19,7)	470,41±87,0 (478,2; 145,9)
2. Lotul control cu inflamație	72,7±20,2 (74,9; 42,1) P <sub>1-2</sub> =0,011	37,6±1,7 (37,8; 0,05) P <sub>1-2</sub> =0,000	15,3±2,4 (14,7; 2,4) P <sub>1-2</sub> =0,000	390,7±78,9 (419,9; 76,1) P <sub>1-2</sub> =0,398
3. Dexametazonă 2,5 mg/kg	43,3±6,5 (44,2; 11,1) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> =0,001	34,2±1,4 (33,5; 2,0) P <sub>1-3</sub> =1,000 P <sub>2-3</sub> <0,000	21,2±5,6 (19,8; 11,7) P <sub>1-3</sub> =0,045 P <sub>2-3</sub> =1,000	323,7±42,5 (322,8; 65,2) P <sub>1-2</sub> =0,001 P <sub>2-3</sub> =0,746
4. Imuheptin 500 mg/kg	46,1±10,9 (45,2; 16,5) P <sub>1-4</sub> =1,000 P <sub>2-4</sub> =0,005 P <sub>3-4</sub> =1,000	35,1±1,5 (35,0; 2,2) P <sub>1-4</sub> =0,449 P <sub>2-4</sub> =0,012 P <sub>3-4</sub> =1,000	23,3±6,6 (23,5; 7,4) P <sub>1-4</sub> =0,266 P <sub>2-4</sub> =0,647 P <sub>3-4</sub> =1,000	539,7±68,5 (548,6; 134,7) P <sub>1-4</sub> =0,610 P <sub>2-4</sub> =0,005 P <sub>3-4</sub> =0,000
5. Imupurin 500 mg/kg	46,2±12,9 (42,5; 13,9) P <sub>1-3-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,003	34,1±1,04 (33,6; 2,1) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,000 P <sub>1-5</sub> =1,000	27,4±4,2 (26,4; 6,1) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,045 P <sub>3-5</sub> =0,904	501,5±66,4 (520,7; 29,7) P <sub>1-5</sub> =1,000 P <sub>2-5</sub> =0,045 P <sub>3-5</sub> <0,000

**Notă:** p – semnificația testului ANOVA cu corecția Bonferroni (IÎ=95%)

**Anexa 9. Influența imuheptinului și impurinelor asupra profilului citokinic și stresului oxidativ în macrofagele stimulate prin lipopolizaharide**

Loturi	TN F- $\alpha$	IL- 6	IL- 10	DA M	CP	Cat	SOD	GR	GPO	GST	AG E	PP OA
Macrofage nestimulate	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒
Macrofage stimulate prin LPS	↑	↑	↑	↑	↗	↗	↑	↓	↓	↗	↘	↑
Macrofage LPS + dexametazonă 1 $\mu$ g/ml	↓	↓	↗	↘	↗	↘	↘	↗	↘	↘	↘	↘
Macrofage LPS + imuheptin extract etanolic (1:10)	↓	↓	↑	↘	↗	↗	↘	↗	↑	↗	↘	↘
Macrofage LPS + imuheptin extract etanolic (1: 100)	↓	↓	↗	↓	↗	↗	↘	↗	↗	↘	↘	↘
Macrofage LPS + imuheptin extract etanolic (1: 200)	↓	↓	↘	↓	↗	↗	↘	↗	↗	↘	↓	↘
Macrofage LPS + imuheptin extract hidric (1:10)	↓	↓	⇒	↘	↗	⇒	⇒	↗	↗	↗	↘	↘
Macrofage LPS + extract hidric de imuheptin (1: 100)	↓	↓	↘	↘	⇒	↘	↘	↗	↗	↗	↘	↘
Macrofage LPS + extract hidric de imuheptin (1: 200)	↓	↓	⇒	↘	↘	↘	↘	↑	↗	↗	↘	↘
Macrofage LPS + impurin extract etanolic ( 1:10)	↓	↓	↘	↑	⇒	↘	↘	↗	↗	↗	↘	⇒
Macrofage LPS + impurin extract etanolic (1: 100)	↓	↓	↘	↘	↘	↘	↘	↑	↗	↗	↘	⇒
Macrofage LPS + impurin extract etanolic (1: 200)	↓	↓	↑	↘	↘	↘	↘	↑	↘	↗	↓	↘
Macrofage LPS + extract hidric de impurin (1:10)	↓	↘	↑	↓	↗	⇒	↘	↑	↗	↗	↘	↗
Macrofage LPS + extract hidric de impurin (1: 100)	↘	↓	↘	↘	↗	↘	↘	↗	⇒	⇒	↘	↗
Macrofage LPS + extract hidric de impurin (1: 200)	↘	↓	↗	↓	↘	↗	↘	↗	↘	↘	↘	↘

Notă: ↑sau↗: majorarea sau tendința de majorare în comparație cu macrofagele nestimulate prin LPS;  
 ↓ sau ↓: micșorare sau tendința de micșorare în comparație cu macrofagele nestimulate prin LPS;  
 ↑ sau ↗: majorarea sau tendința de majorare în comparație cu macrofagele stimulate prin LPS;  
 ↓ sau ↘: micșorare sau tendința de micșorare în comparație cu macrofagele stimulate prin LPS;  
 ⇒: nu se modifică în comparație cu macrofagele stimulate prin LPS;

## Anexa 10.

### Anexa 10.1. Influența imuheptinului și imupurinului asupra profilului citokinic și stresului oxidativ în inflamația subacută (discuri de fetru)

Loturi	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-10	DAM	CP	Cat	SO D	GR	GP O	GST	AGE	PPOA
Lotul martor (intact)	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒
Lotul control (inflamație, 2 discuri de fetru)	↑	↗	↓	↗	↓	↘	↘	↗	↘	→	↗	↗
Dexametazonă 2,5 mg/kg	↘	↘	↗	↗	↓	↗	↗	↗	↗	↑	↘	↗
Imuheptin 500 mg/kg	↘	↓	↑	↘	↑	↗	↘	↗	↑	↗	⇒	↗
Imupurin 500 mg/kg,	↘	↓	↑	⇒	↑	↑	↘	↑	↑	↘	↘	↗

Notă:

↑sau↗: majorarea sau tendința de majorare în comparație cu lotul martor;

↓ sau ↓: micșorare sau tendința de micșorare în comparație cu lotul martor;

↑ sau ↗: majorarea sau tendința de majorare în comparație cu lotul martor;

↓ sau ↘: micșorare sau tendința de micșorare în comparație cu lotul martor;

⇒: nu se modifică în comparație cu lotul control;

### Anexa 10.2. Influența imuheptinului și imupurinului asupra profilului citokinic și stresului oxidativ în inflamația subacută (disc cu adjuvant Freund)

	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$	IL-10	DAM	MRO	PAB	AAT	SOD
Lotul martor (intact)	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒
Lotul control (inflamație, disc fetru impregnat cu adjuvant Freund)	↗	↘	↑	↓	↗	↗	↗	↗	↘
Dexametazonă 2,5 mg/kg	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↓	⇒	↗
Imuheptin 500 mg/kg	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↗
Imupurin 500 mg/kg	↗	↓	↗	↑	↘	⇒	↘	↗	↗

Notă:

↑sau↗: majorarea sau tendința de majorare în comparație cu lotul martor;

↓ sau ↓: micșorare sau tendința de micșorare în comparație cu lotul martor;

↑ sau ↗: majorarea sau tendința de majorare în comparație cu lotul martor;

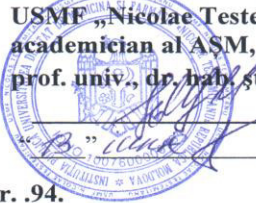
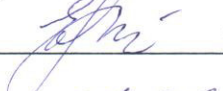



↓ sau ↘: micșorare sau tendința de micșorare în comparație cu lotul martor;

⇒: nu se modifică în comparație cu lotul control;

Anexa 11. Inovații



## Anexa 12. Acte de implementare

	<p style="text-align: center;"><b>INSTITUȚIA PUBLICĂ</b> <b>UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE</b> <b>„NICOLAE TESTEMIȚANU DIN REPUBLICA MOLDOVA</b></p> <p style="text-align: center;">Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate</p>	<p style="text-align: right;">Pag. 7 / 7</p>
<p><b>APROB</b></p> <p><b>Prorector pentru activitate de cercetare,</b> <b>USMF „Nicolae Testemițanu” din RM</b> <b>academician al ASM,</b> <b>prof. univ., dr. hab. șt. med.</b></p> <p style="text-align: right;"> <b>Stanislav GROPPA</b> 2023</p> <p><b>ACTUL nr. 94.</b></p> <p><b>DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI</b> (în procesul științifico-didactic)</p> <p><b>1. Denumirea ofertei pentru implementare: „DETERMINAREA ACTIVITĂȚII PARAOXONAZEI/ARILESTERAZEI CA METODĂ DE SCREENING A PROPRIETĂȚILOR ANTIINFLAMATOARE A PREPARATELOR BIOACTIVE”</b></p> <p><b>2. Autori:</b> <b>GUȚU Ina</b>, catedra de farmacologie și farmacologie clinică, asist. univ., <b>ANDRONACHE Lilia</b> dr.șt.med., cercet. șt. superior, <b>BACINSCHI Nicolae</b>, catedra de farmacologie și farmacologie clinică, dr. hab. șt. med., prof.univ., <b>PANTEA Valeriana</b>, doctorand, cercet. șt. <b>CATCOV Carolina</b>, catedra de farmacologie și farmacologie clinică, asist. univ., doctorand an.V.</p> <p><b>3. Numărul inovației: Nr.6064 din 29 Mai 2023</b></p> <p><b>4. Unde și când a fost implementată:</b> IP USMF ”Nicolae Testemițanu”, Laboratorul de Biochimie și ”, catedra de farmacologie și farmacologie clinică.</p> <p><b>5. Eficacitatea implementării:</b> Identificarea precoce a unor efecte farmacologice ce ar permite planificarea argumentată a studiilor in vivo ulterioare, respectând condițiile eticii științifice și conform “conceptului celor trei R” (introdus în 1959 de Russel și Burch).</p> <p><b>6. Rezultatul implementării:</b> Imuheptinul și imupurinul au demonstrat o capacitate de activare a PON/arilesterazei, ceea ce sugerează potential antiinflamator, atenuarea secreției endoteliale a proteinei chemoattractante-1 (MCP-1), inhibarea moleculei de adeziune intracelulară-1 (ICAM-1), hidroliza factorului de activare a trombocitelor (PAF), inhibarea secreției de citokine proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) în macrofagele stimulate.</p> <p><i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere</i></p> <p><b>Șef Departament Cercetare,</b> <b>conf. univ., dr. hab. șt. med.</b>  <b>Elena RAEVSCHI</b></p> <p><b>Departamentul didactic</b> <b>conf. univ., dr. șt. med.</b>  <b>Silvia STRATULAT</b></p> <p><b>Șef laborator de biochimie</b> <b>dr.hab.șt. med., prof. univ.</b>  <b>Valentin GUDUMAC</b></p> <p></p>		

## **DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII**

Subsemnatul, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Guțu Ina

Data

## CV-ul AUTORULUI



### Informații personale

Nume / Prenume **GUȚU Ina Alexandru**  
Adresă str. Abba Gohberg 16, or. Codru, mun. Chișinău, Republica Moldova  
Telefon 022 28 55 22 Mob 0686 50 393  
E-mail [ina.gutu@usmf.md](mailto:ina.gutu@usmf.md)  
il:  
Naționalitate moldoveancă  
Data nașterii 17 noiembrie 1977

### Experiența profesională

Perioada Din 2012 până în prezent  
Funcția sau postul ocupat Asistent universitar  
Numele și adresa angajatorului USMF „N. Testemițanu”, mun. Chișinău, Republica Moldova  
Perioada Din aprilie 2005 până în 2012  
Funcția sau postul ocupat Farmacolog clinician  
Numele și adresa angajatorului Agenția Medicamentului, str. Korolenco 2/1, Chișinău, Republica Moldova  
Tipul activității sau sectorul de activitate Autorizare medicamente

### Educație și formare

Perioada 2014-2019  
Doctorat Specialitatea Farmacologie și farmacologie clinică ,  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
„N. Testemițanu”  
Perioada 2000-2002  
Calificarea / diploma obținută USMF „N. Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova



Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Rezidențiat în farmacologie clinică
Perioada	1994-2000
Calificarea / diploma obținută	USMF „N. Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Facultatea medicină generală
<b>Aptitudini și competențe personale</b>	
Limba maternă	<b>Română</b>
Limbi străine cunoscute	Rusă – fluent; engleză – cadrul european de referință – nivel B2; franceză – citit, scris
Competențe și abilități sociale	Integrare rapidă în colectiv nou, eficientă, gândire pozitivă, competentă
Competențe și aptitudini de utilizare a calculatorului	Windows, MS office applications: Word, Excel, Power Point.
Permis de conducere	Categoria B
<b>Informații suplimentare</b>	Persoană de referință: Nicolae Bacinschi, dr.hab.șt.med. Șef al Catedrei de farmacologie și farmacologie clinică USMF „N.Testemițanu”