

9. Phull P.S., Green C.J., Jacyna M.R. A radical view of stomach: the role of oxygen – derived free radicals and anti-oxidants in gastroduodenal disease // Eur. J Gastroenterology and Hepatology 1995; 7: 679-683.

10. Saito M., Hosoyama H., Ariga T. et al. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins // J Agric. Food Chem. 1998; 46: 1460-1464.

11. Shaker E. Antioxidative effect of extracts red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of Sunflower // LWT 2006;39: 883-892.

12. Богатов Ю.Н. Комплексное лечение язвенной болезни с применением фито - средствами // Дисс.к.м. н., Москва, 2002;130.

13. Лапина Т.Л. Выбор схемы эрадикационной терапии при *Helicobacter pylori* в случае необходимости повторного лечения // Врач. 2008; 4: 64-67.

## ACȚIUNEA IMUNOMODULATOARE A IMUPURINULUI *IN VITRO* PRIN REACȚIA DE FORMARE A ROZETELOR

Ina Pogonea

Catedra Farmacologie și Farmacologie clinica USMF „Nicolae Testemițanu”

### Summary

#### **Immunomodulating action of imupurin *in vitro* through rosettes formation reaction**

*Imupurin* exerted significant influence on the humoral and cellular immunity. In that way, entomologic drug contributed to the normalization of lymphocytes B and T. Simultaneously, considerable changes in the population of T lymphocytes take place, with the increase of Th, responsible for the formation of interleukines, with subsequent activation of B-lymphocytes, their blasttransformation and production of immunoglobulins.

### Rezumat

*Imupurininul* exercită o influență semnificativă asupra imunității umorale și celulare. Astfel, preparatul entomologic a contribuit la normalizarea limfocitelor B și T. Concomitent au loc modificări importante ale populațiilor limfocitelor T, cu majorarea Th, responsabile de formarea interleukinelor cu activarea în continuare a limfocitelor B, cu blasttransformarea lor și producerea de imunoglobuline.

### Actualitate

Actualmente, specialiștii în domeniul biologiei au constatat că insectele pot produce o mulțime de substanțe biologice active (peptide, hormoni, feromoni etc.), ce servesc drept modele de imitare sau, ceea ce este și mai important, o nouă sursă pentru obținerea preparatelor medicamentoase. De menționat că eforturile lor s-au soldat deja cu rezultate importante: în practica medicală au fost introduse unele suplimente alimentare sau medicamente entomologice cu proprietăți antivirale, imunomodulatoare, antibacteriene, hepatoprotectoare, antitumorale etc. [1,2].

O atenție deosebită se acordă preparatelor imunotrope de origine naturală, care se apropie tot mai mult de cele mai puternice imunomodulatoare, datorită cărora organismul poate obține protecție și echilibru imunitar. Cele mai bogate în proteine și peptide sunt sursele naturale [3].

O direcție nouă în imunofarmacologie este studiul și elaborarea preparatelor entomologice: preparate bazate pe sistemul imunitar a insectelor, formula cărora este dictată de însuși natura.

Imupurininul reprezintă o biomasă de origine entomologică, care include un set de aminoacizi (19 aminoacizi esențiali și semiesențiali) și aminoacizi considerați „imunogeni” – acidul asparagic, arginina, treonina, serina, acidul glutamic, fenilalanina, alanina, acidul  $\gamma$ -

aminobutiric, valina, cisteina, glicina, triptofanul, tirozina. Datorită lor, imupurinul obține proprietăți bioactive imunogene.

**Scopul studiului** a constituit determinarea proprietăților imunotrope ale imupurinului prin cercetarea influenței preparatului asupra imunității celulare (limfocitelor T și subpopulațiilor lor) și umorale (limfocitelor B) utilizând reacția de formare a rozetelor cu eritrocite de berbec.

### **Materiale și metode**

Pentru determinarea acțiunii imunomodulatoare a imupurinului, s-a cercetat *in vitro* sângele a 24 persoane cu predispunere alergică. Pentru estimarea cantitativă a concentrației de limfocite T și B s-a folosit *reacția de formare a rozetelor*.

- Pentru limfocitele T (T-CFR) s-au utilizat eritrocite de berbec, cu termenul de păstrare de cel puțin trei zile, care s-au spălat de trei ori cu soluție fiziologică (pH=7,2) și s-au diluat până la concentrația de 0,5%.

- Pentru limfocitele B (B-CFR) s-au luat eritrocite de berbec în concentrație de 2,5% și s-au amestecat cu ser hemolitic de iepure (doză subhemolitică) în raport de 10:1.

Amestecul obținut se agita periodic, apoi s-a incubat timp de 30 minute la 37°C. După o dublă spălare cu soluție fiziologică (pH=7,2), s-a adăugat mediul 199, apoi s-a spălat dublu în soluție fiziologică (pH=7,2), iar la precipitat s-a adăugat același volum de mediu 199 și ser murin proaspăt în diluție de 1:10 și s-a incubat timp de 30 min. la 37°C, după care s-a spălat de trei ori cu soluție fiziologică (pH=7,2). Amestecul s-a diluat până la concentrația de 0,5%.

*In vitro*, pentru separarea limfocitelor, s-a injectat cu un ac special sub stratul de sânge soluție de 15,2% verografină, în raport de 1:2, centrifugată timp de 40 min. Inelul obținut de limfocite s-a separat, s-a spălat de trei ori cu soluție fiziologică (pH=7,2), s-a resuspendat și s-a calculat numărul de celule în camera Goreaev. Pentru obținerea reacției s-au utilizat limfocite și eritrocite în raport de 1:50 la volumul de 0,2 mL.

Preparatul studiat s-a folosit în doze predestinate adultului, ținându-se cont de doza nictemerală a preparatului. La 10 mg de preparat s-a adăugat 1 ml soluție fiziologică, cu formarea unei suspensii. S-a luat 0,1 mL din suspensia obținută și s-a adăugat 0,9 mL soluție fiziologică (diluție 1:10). Din ultima diluție s-au luat 40 mkl de preparat, adăugându-se la 200 mkl de celule, adică la o probă se lua 0,02 mg preparat. Controlul se făcea fără preparat. Indicele de modulare (IM) s-a determinat prin raportul probei cu preparat la proba fără preparat: la valorile mai mici de 0,8, acțiunea preparatului s-a estimat ca supresoare, iar la valorile mai mari de 1,2, acțiunea preparatului s-a apreciat ca stimuloare. Valorile cuprinse între 0,8 și 1,2 s-au apreciat ca neschimbate.

Eprubeta cu limfocite T s-a lăsat în termostat pe 5 min., iar eprubeta cu limfocite B s-a expus 5 min. la temperatura camerei, cu centrifugarea în continuare timp de 3 min. la 175g. Limfocitele B s-au lăsat la temperatura camerei, iar eprubeta cu limfocite T s-a introdus într-un pahar cu gheață topită (4°C). În ambele eprubete s-a adăugat ulterior câte 0,4 ml sol. de glutaraldehidă de 0,6%. După o agitare ușoară, conținutul s-a turnat pe lame, s-a difuzat pe toată suprafața, cu uscarea lamelor în continuare. Frotiul s-a fixat cu metanol, timp de 5 minute, s-a colorat timp de 10 minute cu sol. (0,1%) de roșu neutral. La microscop, sub imersie, s-au numărat câte 200 limfocite pe fiecare lamă; s-a calculat procentul de limfocite care au conjugat 3 și mai multe eritrocite, considerându-se celule care au format rozete.

*De asemenea, s-au determinat limfocitele T rezistente și sensibile la teofilină:* limfocitele cu un volum echivalent de teofilină, în concentrație de 0,6 mg/mL, s-au incubat la 37°C timp de 30 min., după care s-au spălat de trei ori cu soluție fiziologică (pH=7,2). În continuare s-a efectuat aceeași reacție ca și pentru limfocitele T. Rozetele sensibile la teofilină (T-TFS) s-au determinat după formula:

$$(T-TFS = T - T-TFR) (3),$$

unde: T – rozetele cu eritrocite de berbec;

T-TFR – teofilinrezistente, adică rozetele cu eritrocite de berbec preincubate cu teofilină.

Preparatul entomologic s-a utilizat în doze (0,02 mg) ce corespund celor nictemerale recomandate pentru pacienți.

Indicele de modulare s-a calculat prin raportul dintre proba cu preparat și proba martor. Valorile indicelui de modulare sub 0,8 relatează o acțiune imunodepresivă a preparatului, valorile peste 1,2 – o acțiune imunostimulatoare, iar valorile cuprinse între 0,8 și 1,2 – fără modificări.

### Rezultate și discuții

Cercetările efectuate ne-au relatat că imupurinel are acțiune și asupra verigii celulare și asupra celei umorale, fapt demonstrat în cercetările populațiilor și subpopulațiilor limfocitare. Astfel, prin reacția de formare a rozetelor, s-a demonstrat că imupurinel a stimulat numărul limfocitelor T/TFS, comparativ cu lotul martor, indicele de modulare fiind mai mare de 1,2 (acțiune imunostimulatoare). În același timp s-a micșorat procentul limfocitelor T de la  $56,0 \pm 0,86\%$  în grupul martor până la  $34,1 \pm 2,89\%$  în grupul cu preparatul studiat, al limfocitelor T/TFR de la  $40,9 \pm 1,25\%$  până la  $31,6 \pm 2,11\%$  ( $p < 0,05$ ) și al limfocitelor B de la  $31,9 \pm 1,29\%$  la  $26,4 \pm 1,73\%$  cu indicele modulator mai mic de 0,8 (acțiune imunosupresoare).

Procentul limfocitelor T sensibile la teofilină (T-supresori) a crescut de la  $15,2 \pm 3,04\%$  până la  $24,4 \pm 2,09\%$  ( $p < 0,05$ ). În acest caz, indicele de modulare a constituit  $1,66 \pm 0,14$ , ceea ce ne denotă o acțiune imunostimulatoare a imupurinelui (tab. 1.).

Tabelul 1

#### Acțiunea imupurinelui asupra procentului de limfocite (M ± m)

Indicii	Proba martor	Proba experimentală cu imupurin (n - 24)
Limfocitele T (%) IM	$56,0 \pm 0,86$	$34,1 \pm 2,89^*$ $0,62 \pm 0,05$
Limfocite T/TFR (%) IM	$40,9 \pm 1,25$	$31,6 \pm 2,11^*$ $0,78 \pm 0,05$
Limfocite T/TFS (%) IM	$15,2 \pm 3,04$	$24,4 \pm 2,09^*$ $1,66 \pm 0,14$
Limfocite B (%) IM	$31,9 \pm 1,29$	$26,4 \pm 1,73^*$ $0,84 \pm 0,05$

\* Statistică veridică între proba de control și cea cu preparat;  $p < 0,05$ .

Procentul limfocitelor B la pacienții examinați a crescut dublu, norma fiind de 5 -15%.

Imupurinel a contribuit la micșorarea limfocitelor B de la  $31,9 \pm 1,29\%$  în proba martor până la  $26,4 \pm 1,73\%$  în cea experimentală (tab. 1.). În acest caz, IM a constituit  $0,84 \pm 0,05$ , ceea ce remarcă o acțiune modulatorie asupra limfocitelor B.

Din rezultatele experienței reiese că imupurinel a provocat o depresie ușoară a imunității celulare, relevată prin micșorarea limfocitelor T, cu modularea limfocitelor T teofilinrezistente (helperi) și stimularea limfocitelor T teofilinsensibile (supresori). În același timp, preparatul entomologic a manifestat o acțiune modulatorie asupra imunității umorale, remarcată prin reducerea nivelului majorat al limfocitelor B. Deci, imupurinel a exercitat preponderent o acțiune imunomodulatoare asupra imunității celulare și umorale.

Cercetările experimentale *in vitro* au demonstrat că preparatul entomologic manifestă o acțiune imunomodulatoare asupra imunității celulare (majorarea T-helperilor, indicelui imunoreglator și imunomodulator) și umorale (diminuarea sau corecția limfocitelor B).

Comparând datele obținute prin două metode de cercetare (reacția de formare a rozetelor și metoda imunofluorescenței cu anticorpi monoclonali), s-au obținut date convingătoare referitor la acțiunea imunomodulatoare a preparatului. În cazul cantității limfocitelor în limite normale, preparatul manifesta o acțiune slabă sau în general nu modifica procentul celulelor. În caz de imunodepresie inițială, imupurinel majora procentul limfocitelor corespunzătoare și, paralel, micșora cantitatea limfocitelor în grupul cu un procent inițial crescut. Date asemănătoare

referitor la diverse imunomodulatoare cu spectru larg de acțiune, ca polioxidoniul, imunofanul, mielopidul ș. a., au obținut mai mulți autori [4, 5]. Acțiunea stimuloare a imupurinelor se aseamănă cu acțiunea polioxidoniului asupra activității celulelor sistemului fagocitar. Petrov R. V. și coaut. [6] explică activarea macrofagelor drept cauză a unei sinteze sporite a tuturor claselor de citokine, cu stimularea activității funcționale a factorilor imunității celulare și umorale.

Această asemănare presupune normalizarea raportului tuturor claselor de imunoglobuline, activarea sintezei IL-2 și recepționarea ei de către celulele sensibile cu acțiune de imunostimulare și imunomodulare asupra TNF-alfa [7]. Acțiunea diversă a imupurinelor asupra factorilor imuni ne permite să-l clasăm la preparatele cu acțiune imunotropă centripetă și centrifugă, adică cu acțiune atât asupra sistemului macrofagal, cât și asupra imunității celulare și umorale. Astfel conchidem, imupurina este un preparat imunotrop cu spectru larg de acțiune, care posedă proprietăți imunomodulatoare, exprimate prin normalizarea imunității celulare și umorale (normalizarea numărului absolut de limfocite, a indicelui de imunoreglare, normalizarea numărului de limfocite TFS și TFR și a subpopulațiilor de limfocite).

### **Bibliografie**

1. Ciuhrii, M. Actualități în patologia infecțioasă și parazitară. Conferința a VI-a a Infecționiștilor din Rep. Moldova, 5-6 octombrie 2006.
2. Ghicavii V., Bacinschi N., Ciuhrii M. et al. Revista farmaceutică a Moldovei, 2006, ediție specială, p. 26-34
3. Verget J. Effects du Biostim sur les elements de defense cellulaire broncho-pulmonaires. Resultats preliminaires d'une etude par lavage broncho-alveolaire. Sem.Hop.Paris, 59(36), p. 2571-2574.
4. Гришина Т.И., Жданов А.В., Хаев А.В. и соавт. Иммунологическая и клиническая эффективность применения полиоксидония в терапии сосудистых осложнений диабета. Russian J. of Immunol., 1999, том 4, Suppl.1, с. 261.
5. Гришина Т.И., Полякова И.Н., Рвачева А.В., Ларина В.Н. и соавт. Проблемы иммунотропной терапии новые перспективы. Фарматека-медицинский журнал. 2000, №4, с. 40 .
6. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В. и соавт. Полиоксидоний – препарат нового поколения иммуномодуляторов с известной структурой и механизмом действия. Иммунология, 2000, № 5, с. 24-28.
7. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления об иммуномодуляторах. Практический врач, 1999, № 2-3, с. 63-69.

## **EVOLUTIA MALADIEI HIV/ SIDA PE FONDAL DE TRATAMENT CU UN NOU PREPARAT ENTOMOLOGIC – IMUPURIN (caz clinic)**

**Elena Ivanova<sup>1</sup>, Ina Pogonea<sup>1</sup>, Victor Ghicavii<sup>1</sup>, Nicolae Bacinschi<sup>1</sup>, Svetlana Popovici<sup>2</sup>**

Catedra Farmacologie și Farmacologie clinica<sup>1</sup> USMF „Nicolae Testemițanu”,  
IMSP Dispensarul Dermatovenerologic Republican<sup>2</sup>

### **Summary**

#### ***Evolution of HIV/AIDS infection on the basis of treatment with the new entomologic drug - imupurin***

It was studied a new drug of entomologic origin – imupurin, obtained from Lepidoptera pupae, as a monotherapy for AIDS infected patient. The usage of this drug during 9 months leads to decrease of viral load (from 35 400 to < 400 ) – aspects that shows a direct and indirect antiretroviral action of the drug. CD<sub>4</sub> level did not decline that estimate the good immunotrop