

INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ ASUPRA PROCESELOR EXSUDATIVE ȘI PROLIFERATIVE ALE INFLAMAȚIEI

Ina GUȚU, Ianoș COREȚCHI,
Carolina CATCOV, Nicolae BACINSCHI,
IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
Nicolae Testemițanu

Rezumat

Preparatele de origine entomologică sunt utilizate pentru efectele lor imunomodulatoare, hepatoprotectoare, antibacteriene și antiinflamatorii. Scopul studiului a fost determinarea influenței preparatelor imuheptin și imupurin asupra evoluției inflamației subacute. Au fost selectați 38 de șobolani cu o greutate de 160-250 g, preparatele cercetate și de referință au fost administrate timp de șapte zile, după inducerea inflamației subacute prin plasarea sub pielea animalelor a două discuri de fetru sterilizate. La a 8-a zi după intervenție au fost extrase discurile împreună cu țesutul de granulare format, fiind cântărite și uscate la 60°C până la o masă constantă. Reacția proliferativă se apreciază după diferența dintre masa granulomului format și masa inițială a discului. De asemenea, a fost evaluat tabloul sângelui periferic și s-a determinat nivelul seric al citokinelor TNF-alfa, IL-1-beta, IL-6, IL-10. Dexametazona a prezentat o inhibiție de 51% a proceselor exsudative și de 26% a celor proliferative, a scăzut procentul limfocitelor și conținutul citokinelor TNF-alfa, IL-1-beta, IL-6. Imuheptinul nu a influențat semnificativ evoluția inflamației subacute. Imupurina a determinat o inhibiție nesemnificativă de 1-5% a proceselor exsudative și de 3-8% a celor proliferative, dar o micșorare a nivelului IL-6 și o majorare a IL-10 semnificative statistic ($p < 0,05$). Așadar, imupurina a demonstrat o tendință de reducere a proceselor exsudative și proliferative, mai slab pronunțate decât la dexametazonă, dar a micșorat conținutul citokinei proinflamatorii IL-6 și a majorat semnificativ IL-10 – citokină antiinflamatoare. Imuheptinul a redus nivelul IL-6.

Cuvinte-cheie: imupurin, imuheptin, inflamație, granulom, disc de fetru, IL-6, IL-10

Summary

The influence of entomological drugs on the exudative and proliferative processes of inflammation

Entomological preparations are used for their immunomodulatory, hepatoprotective, antibacterial and anti-inflammatory effects. The aim of the presented study was to determine the influence of imuheptin and imupurin on the evolution of subacute inflammation. 38 rats weighing 160-250 g were selected, the tested and reference preparations were administered for 7 days, after inducing subacute inflammation by implanting sterile felt pellets subcutaneously. On 8th day the pellets together with granulomatous tissues were removed, weighed and dried to a constant mass at 60°C. The proliferative reaction was estimated by the difference between the weight of the dry granuloma formed and the initial mass of the pellets. Similarly, complete blood count was performed and serum levels of TNF-alpha, IL-1-beta, IL-6, IL-10 cytokines were determined. Dexamethasone significantly decreased formation of the inflammatory exudates by 51% and weight of granulation tissue

by 26%, compared with control group, decreased lymphocyte number and TNF-alpha, IL-1-beta, IL-6 levels. Imuheptin did not significantly influence the evolution of subacute inflammation. Imupurin insignificantly inhibited inflammatory exudates by 1-5% and weight of granulation tissue by 3-8%, but importantly decreased IL-6 level and increase IL-10 level ($p < 0,05$). Imupurin has shown a tendency to reduce exudative and proliferative processes, which is less pronounced than dexamethasone, but decreased the pro-inflammatory cytokine IL-6 content and significantly increased anti-inflammatory IL-10. Imuheptin decreased IL-6 level.

Keywords: imupurin, imuheptin, inflammation, granuloma, felt pellets, IL-6, IL-10

Резюме

Влияние энтомологических препаратов на экссудативные и пролиферативные процессы воспаления

Энтомологические препараты обладают иммуномодулирующим, гепатозащитным, антибактериальным и противовоспалительным действием. Целью представленного исследования было определить влияние имугептина и имупурина на развитие подострого воспаления. Были отобраны 38 крыс весом 160-250 г, тестируемые и контрольные препараты вводили в течение семи дней после моделирования подострого воспаления путем подкожной имплантации стерильных фетровых дисков. На 8-й день гранулы вместе с гранулематозными тканями удаляли, взвешивали и высушивали до постоянной массы при 60°C. Проллиферативную реакцию оценивали по разнице между массой образовавшейся сухой гранулемы и начальной массой гранул. Аналогичным образом проводили полный анализ крови и определяли сывороточные уровни цитокинов TNF-альфа, IL-1-бета, IL-6, IL-10. Дексаметазон значительно уменьшил образование воспалительного экссудата на 51% и массу грануляционной ткани на 26% по сравнению с контрольной группой, а также уменьшил количество лимфоцитов и уровень TNF-альфа, IL-1-бета, IL-6 в сыворотке. Имугептин не оказал значительного влияния на развитие подострого воспаления. Имупурин вызывал незначительное снижение экссудативных (процент ингибирования 1-5%) и пролиферативных процессов (процент ингибирования 3-8%) со значительным снижением уровня IL-6 и повышением IL-10 ($p < 0,05$). Таким образом, имупурин показал тенденцию к снижению экссудативных и пролиферативных процессов, которые менее выражены, чем у дексаметазона, но снизил содержание про-воспалительного цитокина IL-6 и значительно увеличил содержание противовоспалительного IL-10. Имугептин снизил уровень IL-6.

Ключевые слова: имупурин, имугептин, воспаление, фетровая гранулема, IL-6, IL-10

Introducere

Arsenalul actual de preparate pentru tratamentul proceselor inflamatorii este constituit din medicamente nesteroidiene și medicamente steroidiene cu acțiune specifică și eficacitate bună, însă cerințele de inofensivitate impun necesitatea cercetării unor 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* al proprietăților antiinflamatoare ale substanțelor noi, ce permit determinarea influenței lor asupra proceselor inflamației, cu elucidarea mecanismelor și a particularităților de acțiune [7, 8, 14, 15].

Insectele au devenit un obiect de cercetare prin capacitatea lor de a supraviețui în condițiile nefavorabile ale mediului, inclusiv la acțiunea factorilor infecțioși și care provoacă procese inflamatorii. Compușii bioactivi, precum fenolii, flavonoidele, terpenele, saponinele, zaharurile, alcaloizii, glicozidele și acizii grași, identificați la o mare varietate de insecte, au demonstrat proprietăți biologice, inclusiv: antioxidantă, antiinflamatoare, antiproliferativă, citotoxică, analgezică, imunomodulatoare, antidiabetică, cardioprotectoare, antihipertensivă, antimicrobiană și insecticidă. Analiza datelor literaturii de specialitate a demonstrat că un șir de extracte, peptide și analogi sintetici manifestau proprietăți antiinflamatoare [2, 3, 4].

Scopul studiului a constat în determinarea influenței preparatelor de origine entomologică asupra proceselor exsudative și proliferative ale inflamației subacute.

Material și metode

În studiu au fost folosiți 49 de șobolani cu masa de 160-250 g, la care s-a modelat inflamația subcronică prin implantarea subcutanată a două discuri de fetru cu greutatea 26 ± 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.

Pentru aprecierea procesului inflamator a fost evaluat gradul de manifestare a reacției exsudative (diferența dintre masa granulomului umed și masa granulomului uscat, procentul de inhibiție a fazei exsudative) 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 exsudativă și proliferativă s-a utilizat formula:

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

unde: Pi – procentul de inhibiție; Mt – masa discului de fetru în lotul tratat; Mm – masa discului de fetru în lotul-martor [6, 7].

Concomitent a fost studiat tabloul sângelui periferic prin determinarea numărului eritrocitelor, leucocitelor, trombocitelor, a conținutului hemoglobinei, hematocritului și a procentului neutrofilelor, limfocitelor, monocitelor, bazofilelor, eozinofilelor și granulocitelor imature.

Rezultate și discuții

Datele prezentate în *tabelul 1* au demonstrat că masa inițială a discurilor de fetru și a celor infiltrate cu adjuvant Freund a fost practic identică în toate grupurile. După extragerea discurilor cu granulomul format în jurul lor, s-a constatat că masa acestora a crescut semnificativ, fapt ce demonstrează dezvoltarea procesului inflamator. Astfel, masa granulomului stâng umed în lotul-martor a constituit $274,8 \pm 69,8$ mg (masa inițială a discului = $26,3 \pm 1,3$), iar cea a granulomului drept umed – $495,0 \pm 138,0$ mg (masa inițială a discului = $26,0 \pm 1,0$). Date similare au fost raportate de Kuum M.G.M. și coaut. (2018), Nair V. și coaut. (2012), Lagishetty C.V. și coaut. (2008). Analiza masei granulomului stâng uscat a relevat că dexametazona a determinat o reacție inflamatorie semnificativ redusă comparativ cu lotul-martor, pe când 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 greutății granulomului uscat a arătat că în lotul-martor aceasta a constituit $73,2 \pm 23,6$ mg (masa inițială a discului = $26,3 \pm 1,3$), iar cea a granulomului drept (cu adjuvant Freund) – $154,3 \pm 41,9$ mg (masa inițială a discului = $26,0 \pm 1,0$).

Pentru aprecierea gradului de inflamație exsudativă și proliferativă, au fost determinate diferențele dintre masa granulomului umed și cea a granulomului uscat (*tabelul 2*). În lotul de control s-a constatat un grad mai exprimat al inflamației exsudative în jurul discurilor infiltrate cu adjuvant Freund. Astfel, diferența dintre granulomul stâng umed și cel uscat a constituit $201,6 \pm 51,4$ mg, iar

diferența dintre granulomul drept (cu adjuvant Freund) umed și cel uscat – $384,2 \pm 138,4$ mg. Dexametazona a determinat o reacție exsudativă 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 în stare uscată a constituit $149,0 \pm 20,9$ mg ($P < 0,05$), iar pentru cel drept (cu adjuvant Freund) – $151,0 \pm 22,29$ mg ($P < 0,05$). Preparatele entomologice practic n-au influențat faza exsudativă a inflamației în jurul discului stâng (fără adjuvant), iar în cazul inflamației exsudative induse de adjuvantul Freund, imupurinel manifesta o acțiune de micșorare a diferenței dintre masa granulomului umed și masa inițială a discului ($360,6 \pm 103,3$), comparativ cu lotul-

martor – $384,2 \pm 138,4$ mg ($P > 0,05$), iar imuheptinul prezenta o acțiune de creștere a acestei diferențe – $455,2 \pm 114,1$ mg față de lotul-martor ($P > 0,05$). Determinarea procentului de inhibiție a proceselor exsudative a demonstrat că dexametazona în cazul discului stâng diminuea exudația cu 26%, iar a celui drept cu adjuvant Freund – cu 51%. Imuheptinul a intensificat procesele exsudative cu 7% și, respectiv, 14%, iar imupurinel le-a redus cu 1% și, corespunzător, 5%. Studiile cu utilizarea antiinflamatoarelor nesteroidiene în condiții similare au demonstrat capacitatea diclofenacului de a diminua cu circa 50-60% gradul de manifestare a proceselor exsudative și proliferative, induse de implantarea discurilor de fetru [6, 12].

Tabelul 1

Influența preparatelor de origine entomologică asupra inflamației subacute

Loturile de animale	Masa (greutatea) discului/granulomului					
	Disc stâng inițial	Disc drept (cu adjuvant) inițial	Granulom umed stâng	Granulom umed drept (cu adjuvant)	Granulom uscat stâng	Granulom uscat drept (cu adjuvant)
Lot-martor, soluție fiziologică, 7 zile (n=9)	26,3±1,3	26,0±1,0	274,8±69,8	495,0±138,0	73,2±23,6	154,3±41,9
Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile (n=9)	26,8±0,6 $P_{1-2} > 0,05$	26,9±1,1 $P_{1-2} > 0,05$	203,7±24,6 $P_{1-2} < 0,05$	240,7±31,5 $P_{1-2} < 0,05$	54,7±8,1 $P_{1-2} < 0,05$	89,7±12,8 $P_{1-2} < 0,05$
Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	26,9±0,7 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	26,4±1,1 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	294,3±53,6 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	566,6±114,5 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	84,0±26,1 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	179,1±39,1 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$
Imupurin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	26,2±1,0 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} > 0,05$	26,4±1,2 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} > 0,05$	273,6±40,3 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	472,0±103,6 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	68,0±14,0 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} > 0,05$	150,4±41,3 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$

Tabelul 2

Influența preparatelor de origine entomologică asupra proceselor exsudative și proliferative ale inflamației subacute

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)
Lot-martor, soluție fiziologică 7 zile (n=9)	248,3±69,6	201,6±51,4	46,8±23,7	384,2±138,4	340,67±104,9	128,48±42,1
Dexametazonă 2,5 g/kg, 7 zile (n=9)	177,0±24,6 $P_{1-2} < 0,05$	149,0±20,9 $P_{1-2} < 0,05$	28,0±8,1 $P_{1-2} < 0,05$	128,7±31,7 $P_{1-2} < 0,05$	151,0±22,3 $P_{1-2} < 0,05$	62,7±13,0 $P_{1-2} < 0,05$
Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	267,4±53,4 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	210,3±33,6 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	57,1±25,9 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	455,2±114,1 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	387,5±80,4 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	152,7±38,9 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$
Imupurin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	247,4±40,4 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	205,6±32,6 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	41,8±13,5 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	360,6±103,3 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	321,6±70,1 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	124,0±41,0 $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$

Analiza diferențelor dintre masa granulomului uscat și masa inițială a discurilor a permis de a elucida intensitatea proceselor proliferative. Astfel, în lotul-martor, diferența dintre masa granulomului uscat stâng și masa inițială a discului a constituit $46,8 \pm 23,7$ mg, iar în cazul celui drept cu adjuvant Freud – $128,48 \pm 42,1$ mg, fapt ce demonstrează un grad mai marcat al inflamației, inclusiv proliferative, induse de adjuvant. Antiinflamatorul steroidian a inhibat pronunțat dezvoltarea proceselor proliferative cu valori de două ori mai mici ale diferenței dintre masa granulomului stâng și masa inițială a discurilor ($28,0 \pm 8,1$ mg versus $46,8 \pm 23,7$ mg în lotul-martor; $P < 0,05$) și ale diferenței dintre masa granulomului drept și masa inițială a discurilor ($62,7 \pm 13,0$ versus $128,48 \pm 42,1$ mg; $P < 0,05$). Imuheptinul a influențat nesemnificativ evoluția proceselor proliferative, cu o tendință de majorare a diferenței dintre masa granulomului uscat stâng și a celui drept cu adjuvantul Freund și masa inițială a discurilor (tabelul 2). Imupurinul a demonstrat o tendință de micșorare a diferenței dintre masa granulomului uscat stâng și masa inițială a discurilor respective ($41,8 \pm 13,5$ mg versus $46,8 \pm 23,7$ mg în lotul-martor; $P > 0,05$), precum și în cazul discului cu adjuvant Freund ($124,0 \pm 41,0$ mg vs $128,48 \pm 42,1$ mg; $P > 0,05$).

Intensitatea proceselor proliferative a fost evaluată și prin determinarea procentului de inhibiție comparativ cu lotul-martor. Dexametazona a inhibat

procesele proliferative cu 26% (masa granulomului uscat stâng fără adjuvant) și, respectiv, cu 42% (masa granulomului uscat drept cu adjuvant Freund). Imuheptinul a determinat o majorare a intensității proceselor proliferative cu 14% și, corespunzător, 16%. Imupurinul a redus intensitatea proceselor proliferative cu 8% și, respectiv, 3%.

Analiza tabloului sângelui periferic n-a relevat o modificare esențială a numărului de eritrocite în lotul-martor, cel cu dexametazonă și imuheptin. La animalele cărora li s-a administrat imupurin s-a constatat o tendință de micșorare a numărului de eritrocite. Nivelul hemoglobinei și cel al hematocritului practic nu au fost modificate de dexametazonă, pe când sub acțiunea imuheptinului și a imupurinului s-a observat o tendință de micșorare a acestora (tabelul 3). Antiinflamatorul steroidian a determinat o reducere a numărului leucocitelor față de lotul-martor ($3,9 \pm 1,8$ versus $6,7 \pm 1,8$; $P > 0,05$), iar imupurinul – o reducere mai puțin semnificativă ($6,2 \pm 1,7$ versus $6,7 \pm 1,8$; $P > 0,05$). Imuheptinul, în condițiile modelării inflamației subacute, a determinat o majorare a numărului de leucocite ($7,8 \pm 5,3$) comparativ cu lotul-martor ($P > 0,05$). Dexametazona, imuheptinul și imupurinul au redus nesemnificativ numărul trombocitelor. Antiinflamatorul steroidian a micșorat de două ori ($P > 0,05$) nivelul reticulocitelor, iar imuheptinul și imupurinul practic nu l-au influențat (tabelul 3).

Tabelul 3

Influența preparatelor de origine entomologică asupra tabloului sângelui periferic în inflamația subacută

Loturile de animale	Eritrocite, $10^{12}/L$	Hb, g/L	Hematocrit, %	Leucocite, $10^9/L$	Trombocite, $10^9/L$	Reticulocite, %
Lot-martor, soluție fiziologică, 7 zile (n=9)	$8,6 \pm 0,4$	$147,0 \pm 8,4$	$45,9 \pm 2,3$	$6,7 \pm 1,8$	$1016,8 \pm 294,6$	$4,8 \pm 1,7$
Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile (n=9)	$8,6 \pm 0,7$ $P_{1-2} > 0,05$	$146,5 \pm 8,7$ $P_{1-2} > 0,05$	$44,9 \pm 2,7$ $P_{1-2} > 0,05$	$3,9 \pm 1,8$ $P_{1-2} > 0,05$	$770,5 \pm 132,9$ $P_{1-2} > 0,05$	$2,4 \pm 1,0$ $P_{1-2} > 0,05$
Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	$8,6 \pm 1,0$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	$136,8 \pm 10,9$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	$43,1 \pm 2,7$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	$7,8 \pm 5,3$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	$897,7 \pm 325,2$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	$4,4 \pm 2,0$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$
Imupurin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	$8,2 \pm 0,5$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} > 0,05$	$134,2 \pm 9,9$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} > 0,05$	$41,36 \pm 2,7$ $P_{1-4} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	$6,2 \pm 1,7$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} > 0,05$	$938,5 \pm 217,2$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} > 0,05$	$4,5 \pm 1,3$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{2-4} > 0,05$

În cazul inflamației subacute, dexametazona a majorat procentul neutrofilelor și l-a micșorat pe cel al limfocitelor, monocitelor, eozinofilelor și granulocitelor imature. Imuheptinul și imupurinul au redus procentul neutrofilelor, monocitelor și granulocitelor imature, cu o creștere neesențială a procentului limfocitelor, bazofilelor și eozinofilelor (tabelul 4).

A fost determinat nivelul seric al citokinelor, cu includerea suplimentară a unui lot de cercetare intact, format din 11 șobolani, cărora li s-a injectat doar soluție fiziologică intraperitoneal, fără a se modela inflamația

subacută. Dexametazona a determinat o micșorare nesemnificativă a nivelului citokinelor proinflamatorii TNF-alfa, IL-1-beta, IL-6 și antiinflamatorii IL-10. Imuheptinul a avut un efect similar cu antiinflamatorul steroidian asupra nivelului de TNF-alfa, IL-1-beta și IL-10, dar a redus conținutul IL-6 de la $25,24 \pm 3,81$ pg/ml (lotul-martor) și $26,34 \pm 3,43$ pg/ml (lotul intact) până la $19,02 \pm 1,56$ pg/ml ($P < 0,05$). Imupurinul a micșorat semnificativ ($P < 0,05$) nivelul IL-6 ($19,21 \pm 6,38$ pg/ml) și l-a majorat pe cel al IL-10 ($157,05 \pm 41,27$ pg/ml), comparativ cu lotul-martor (tabelul 5).

Tabelul 4

Influența preparatelor de origine entomologică asupra formulei leucocitare a sângelui periferic în inflamația subacută

Loturile de animale	Neutrofile, %	Limfocite, %	Monocite, %	Eozinofile, %	Bazofile, %	Granulocite imature, %
Lot-martor, soluție fiziologică, 7 zile (n=9)	33,4±10,1	51,9±9,1	7,1±0,4	7,5±7,8	0,08±0,12	0,97±2,03
Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile (n=9)	84,7±4,8 P ₁₋₂ <0,05	12,2±2,9 P ₁₋₂ <0,05	2,1±1,3 P ₁₋₂ <0,05	1,9±2,9 P ₁₋₂ >0,05	0	0,4±0,57 P ₁₋₂ >0,05
Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	28,4±10,7 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ <0,05	59,8±8,7 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ <0,05	4,6±2,2 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	8,0±8,13 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	0,13±0,1 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ <0,05	0,63±0,61 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05
Imupurin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	32,2±10,5 P ₁₋₄ >0,05 P ₂₋₄ >0,05	54,5±11,3 P ₁₋₄ >0,05 P ₂₋₄ >0,05	5,5±2,5 P ₁₋₄ >0,05 P ₂₋₄ <0,05	7,7±6,6 P ₁₋₄ >0,05 P ₂₋₄ >0,05	0,15±0,1 P ₁₋₄ >0,05 P ₂₋₄ <0,05	0,75±1,2 P ₁₋₄ >0,05 P ₂₋₄ >0,05

Tabelul 5

Influența preparatelor de origine entomologică asupra nivelului citokinelor în inflamația subacută

Loturile de animale	TNF-alfa, pg/ml	IL-1-beta, pg/ml	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml
Lotul intact, soluție fiziologică (n=11)	70,55±8,19	48,73±20,77	26,34±3,43	165,25±42,98
Lotul-martor cu inflamație (n=9)	72,82±19,79 P ₁₋₂ >0,05	59,18±16,86 P ₁₋₂ >0,05	25,24±3,81 P ₁₋₂ >0,05	92,92±33,54 P ₁₋₂ <0,05
Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile (n=9)	68,57±15,12 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	50,45±12,73 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	19,88±4,56 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ >0,05	84,66±15,98 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ >0,05
Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	66,64±12,58 P ₂₋₄ >0,05 P ₃₋₄ >0,05	53,43±11,42 P ₂₋₄ >0,05 P ₃₋₄ >0,05	19,02±1,56 P ₂₋₄ <0,05 P ₁₋₄ <0,05	85,28±15,72 P ₂₋₄ >0,05 P ₃₋₄ >0,05
Imupurin 500 mg/kg, 7 zile (n=10)	84,07±12,72 P ₂₋₅ >0,05 P ₃₋₅ >0,05	63,07±15,61 P ₂₋₅ >0,05 P ₃₋₅ >0,05	19,21±6,38 P ₂₋₅ <0,05 P ₁₋₅ <0,05	157,05±41,27 P ₂₋₅ <0,05 P ₃₋₅ <0,05

Inflamația subacută și cronică constituie un răspuns la acțiunea prelungită a factorilor proinflamatori asupra țesuturilor și se caracterizează prin infiltrarea leucocitelor în locul inflamației, fibroză și formarea granulomului. Mecanismul inflamației cronice este atribuit, în parte, eliberării speciilor reactive de oxigen din neutrofilele și macrofagele activate, producerii excesive de citokine, dereglării semnalizării celulare și pierderii funcției de barieră. Această supraproducție provoacă peroxidarea lipidelor membranale, ceea ce duce la lezarea țesuturilor prin deteriorarea macromoleculilor. Speciile reactive ale oxigenului provoacă sau extind inflamația, stimulând eliberarea citokinelor (IL-1-beta, TNF-alfa, INF-alfa), care stimulează recrutarea neutrofilelor și a macrofagelor suplimentare [6].

Implantarea subcutanată a discurilor de fetru provoacă formarea țesutului granulomatos. Acest țesut este condiționat de acumularea macrofagelor, neutrofilelor și limfocitelor în jurul particulelor străine, urmată de proliferarea fibroblastelor. Discul de

fetru implantat stimulează sistemul imunitar pentru a produce interleukine și anticorpi ce stimulează proliferarea limfocitelor și acumularea celulelor în jurul acestora. Inițial se dezvoltă procesele exsudative prin transsudarea lichidului și creșterea marcată a greutății discurilor de fetru umede. Este demonstrat că antiinflamatoarele steroidiene și nesteroidiene reduc dimensiunea granulomului și cantitatea de transsudat prin inhibarea producției de mediatori proinflamatori (citokine inflamatorii, leucotriene și prostaglandine), inhibarea infiltrării cu celule (leucocite) și prevenirea proliferării fibroblastelor, producerea fibrelor de colagen și sintezei mucopolizaharidelor. Un efect similar a demonstrat și dexametazona în studiul nostru. Imupurinul a manifestat o capacitate mai redusă de a reduce procesele exsudative și proliferative, comparativ cu dexametazona. Posibil, spre deosebire de antiinflamatorul steroidian, preparatul de origine entomologică are un efect mai lent, datorită proprietăților imunotrope, asupra imunității celulare (modularea limfocitelor T) [6].

Adjuvantul Freund poate determina o acțiune modulatorie asupra hemopoiezei, Astfel, în studii experimentale și clinice, vaccinul BCG a demonstrat capacitatea de a crește apărarea organismului-gazdă în leucemie și în alte tumori prin sporirea repopulării măduvei osoase și leucopoiezei după chimioterapia mieloablativă. Pretratarea șoarecilor cu BCG sau cu adjuvant Freund a contribuit la recuperarea funcțiilor leucopoitice în urma unei injecții mielosupresoare ulterioare cu ciclofosamidă. Tratamentul cu BCG sau cu adjuvant a determinat creșterea unităților formatoare de colonii în măduva osoasă. În mod similar, s-a constatat că imunoadjuvanții cu micobacterii, de natură chimică definită, au efecte hemopoietice, precum și provoacă o creștere a nivelului activității de stimulare a coloniilor monocitelor-macrofage în ser și proliferarea celulelor stem multipotențiale în măduva osoasă [1].

În studii experimentale s-a constatat că adjuvantul Freund complet produce o majorare a nivelului citokinelor proinflamatoare (TNF-alfa, IL-1-beta, 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 [1].

Implantarea discurilor de fetru determină o reacție exsudativă și proliferativă și creșterea nivelului citokinelor proinflamatorii TNF-alfa, IL-1-beta și IL-6, produși ce caracterizează funcția macrofagelor (activare, infiltrare, agregare). Administrarea indometacinei, antiinflamator nesteroidian, provoacă o diminuare a masei granulomului și a nivelului de IL-6, cu o creștere a TNF-alfa, fără a-l modifica pe cel al IL-1-beta [10].

Incubarea macrofagelor cu dexametazonă timp de 24 de ore a provocat o reducere a nivelului IL-1-beta, ceea ce demonstrează o diminuare a activității macrofagelor implicate în procesul inflamator [13].

În studii in vitro s-a constatat că lipopolizaharidele intensifică activitatea macrofagelor, cu majorarea eliberării de citokine proinflamatorii, iar extractul din larvele de *Musca domestica*, ce conține molecule proteice cu masă moleculară mică, a determinat micșorarea producerii TNF-alfa și IL-6. S-a estimat că efectul antiinflamator poate fi provocat de diminuarea expresiei factorului nuclear de transcripție NF- κ B [2].

La pătrunderea corpilor străini, precum implantarea discurilor de fetru, are loc producția de oxid nitric sub acțiunea nitric oxid sintazei. Ulterior se activează cascada de mediatori proinflamatori și de citokine, care include ciclooxigenaza 2, interleukinele IL-1 β și IL-6, și TNF-alfa. Acești mediatori proinflamatori și citokinele determină activarea căii inflamatorii clasice, a factorului nuclear NF- κ B și a protein kinazei

activate de mitogeni (MAPK), cu declanșarea unui răspuns inflamator necontrolat. Utilizarea veninului de viespe a suprimat producția de oxid nitric și a redus expresia ARNm ale IL-1 β , IL-6 și TNF- α [11].

Extractul de hemocite de *Bombyx mori* (viermele de mătase) a redus inflamația indusă de lipopolizaharidele bacteriilor gramnegative prin inhibarea nitric oxid sintazei inductibile (iNOS) și expresia ciclooxigenazei (COX-2), precum și a citokinelor proinflamatorii IL-1 β , IL-6, IL-8 și TNF-alfa. S-a sugerat că aceste efecte pot fi cauzate de influența asupra căii factorului nuclear de transcripție NF- κ B, care mediază numeroase gene, inclusiv ale mediatorilor proinflamatori respectivi [5].

Concluzii

În baza rezultatelor prezentate, putem constata următoarele:

1. Adjuvantul Freund produce o inflamație marcată, relevantă prin procese exsudative (apreciate prin diferența dintre greutatea granulomului umed și a celui uscat) și proliferative (apreciate prin diferența dintre greutatea granulomului uscat și masa inițială a discurilor).

2. Dexametazona a manifestat un efect antiinflamator marcat, relevat prin diminuarea proceselor exsudative și proliferative, precum și printr-o micșorare a nivelului citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-1-beta și IL-6).

3. Imuheptinul nu a influențat procesele exsudative și proliferative, dar a micșorat nivelul citokinelor inflamatorii, îndeosebi al IL-6.

4. Imupurinul a demonstrat o acțiune de reducere a proceselor exsudative și proliferative, mai slab pronunțate decât la dexametazonă, dar a micșorat conținutul citokinei proinflamatorii IL-6 și a majorat semnificativ IL-10, citokină antiinflamatoare.

Bibliografie

1. Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. In: *Journal of Leukocyte Biology*. 2001, nr. 70, pp. 849-860.
2. Faast R., Weinstein P. Plant-derived medicinal entomochemicals: an integrated approach to biodiscovery in Australia. In: *Austral Entomology*. 2019, November. Disponibil pe: <https://doi.org/10.1111/aen.12433>
3. Kim S.R. et al. Antibacterial and anti-inflammatory activities of the immune-challenged silkworm (*Bombyx mori*) hemolymph with *Lactobacillus* cell wall extracts. In: *Entomological Research*. 2019, vol. 49(8), pp. 354-362.
4. 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- κ B signaling pathway. In: *Molecular Medicine Reports*. 2017, vol. 16(4).

5. 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*. 2018, vol. 3(9), pp. 2183-2194.
6. Lagishetty C.V., Naik S.R. Polyamines: Potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. In: *Indian J. Pharmacol.* 2008, nr. 40, pp. 121-125.
7. Vogel H. Gerhard, et al., eds. *Drug discovery and evaluation: safety and pharmacokinetic assays*. New York: Springer, 2006.
8. Leelaprakash G., Dass S.M. In vitro Anti-Inflammatory activity of Methanol extract of *Enicostemma axillare*. In: *International Journal of Drug Development & Research*. 2011, vol. 3(3), pp. 189-196.
9. 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, vol. 18(2), pp. 185-191.
10. 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 article 6978194.
11. Tatiya A.U., Saluja A.K. Further studies on membrane stabilizing, anti-inflammatory and FCA induced arthritic activity of various fractions of bark of *Machilus macrantha* in rats. In: *Rev. Bras. Farmacogn.* 2011, vol. 21(6).
12. 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 иммуноцитов голотурии *Eupentacta Fraudatrix*. В: *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014, № 1, с. 34-38.
13. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств* (под ред. Мироннова А.Н.). Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
14. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ* (под ред. Хабриева Р.У.). Второе изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с.

Nicolae Bacinschi, profesor universitar,
IP USMF *Nicolae Testemițanu*,
tel.: 079 104662,
e-mail: nicolae.bacinschi@usmf.md