

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINA ȘI FARMACIE
„NICOLAE 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

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Chișinău 2023

Teza a fost elaborată în cadrul Catedrei de farmacologie și farmacologie clinică și Laboratorului de biochimie a IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Conducător:

Bacinschi Nicolae, dr. hab. șt. med., conferențiar universitar

Consultant științific:

Gudumac Valentin, dr. hab. șt. med., profesor universitar

Referenți oficiali:

Parii Sergiu, dr. hab. șt. med., conferențiar cercetător

Gavriluță Vadim, dr. șt. med., conferențiar universitar, Universitatea de Studii Politice și Economice Europene "Constantin Stere"

Componența consiliului științific specializat:

Todiraș Mihail, președinte, dr. hab. șt. med., conferențiar cercetător

Stratu Ecaterina, secretar, dr. șt. med., conferențiar universitar

Gonciar Veaceslav, membru, dr. hab. șt. med., profesor universitar

Vișnevschi Anatolie, membru, dr. hab. șt. med., profesor universitar

Scutari Corina, membru, dr. șt. med., conferențiar universitar

Bumacov Ludmila, membru, dr. șt. med., conferențiar universitar

Sustinerea va avea loc la 12 decembrie 2023, ora 14⁰⁰ în ședința Consiliului științific specializat D 314.01-23-102 din cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie (bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 204).

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și pe pagina web a ANACEC.

Rezumatul a fost expediat la _____ 2023

Secretar științific al Consiliului științific specializat,

Stratu Ecaterina,

dr. șt. med., conferențiar universitar

Conducător:

Bacinschi Nicolae,

dr. hab. șt. med., conferențiar universitar

Consultant științific:

Gudumac Valentin,

dr. hab. șt. med., profesor universitar

Autor:

Guțu Ina

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....	4
CONȚINUTUL TEZEI.....	8
1. PREPARATE ENTOMOLOGICE – SINTEZE, SUGESTII ȘI PERSPECTIVE	8
2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE.....	9
3. SCREENING-UL PROPRIETĂȚILOR ANTIINFLAMATORII ȘI ANTIOXIDANTE ALE PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ.....	11
3.1. Cercetarea <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> a acțiunii antiinflamatoare a imuheptinului și imupurinului....	11
3.2 Influența imupurinului și imuheptinului asupra inflamației induse prin lipopolizaharide	14
4. INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ ASUPRA INFLAMAȚIEI SUBACUTE.....	17
4.1. Acțiunea imuheptinului și imupurinului asupra inflamației subacute induse de corp străin .	17
4.2. Influența preparatelor de origine entomologică asupra inflamației subacute induse de adjuvant Freund.	21
SINTEZA REZULTATELOR.....	23
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI.....	25
BIBLIOGRAFIE.....	27
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI	29
ADNOTARE.....	31

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța problemei abordate. Dezvoltarea procesului inflamator este o reacție de apărare pentru menținerea homeostaziei organismului, însă durata prelungită sau exprimarea exagerată poate induce o gamă variată de stări patologice. Utilizarea în practica medicală a antiinflamatoarelor steroidiene (AIS) și nesteroidiene (AINS) este argumentată și studiată multilateral, însă nu este lipsită de dezavantaje, determinate nu doar de reacțiile adverse, uneori periculoase, ci și de incapacitatea de a influența asupra unor căi patogenetice implicate în procesele inflamatorii sau de redirectionare cu formarea excesivă a unor autacoizi, citokine etc. Concomitent, tot mai elocvent se demonstrează implicarea în procesul inflamator a sistemului imun și stresului oxidativ. 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 [12, 26, 29].

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 (SBA) din insecte au demonstrat proprietăți: antioxidante, imunomodulatoare, antiinflamatoare, antibacteriene, antifungice, antivirale, antitumorale, hepatoprotectoare, antidiabetice, antihipertensive, hipolipemice și antitrombotice [2, 4, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 17, 21, 22, 31, 32]. 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 [3, 4, 5, 9, 10, 13, 22].

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. În proiectul dat s-a cercetat experimental influența preparatelor de origine entomologică autohtone 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 mecanismelor posibile ale acțiunii antiinflamatoare și perspectivelor 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 (LPS);
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 perspectivelor 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. 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.

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. Au fost determinate particularitățile acestora asupra diferitelor 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 a 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

peroxidării lipidice (DAM), enzimele antioxidante (SOD, catalază, GR, GPO, GST), starea sistemului tiol-disulfidic.

Problema științifică soluționată în teză. Rezultatele obținute au permis definirea aspectelor 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. 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 concomitent cu activitatea antioxidantă. În baza studiului realizat s-a concluzionat, că imuheptinul și imupurinul 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 componenței variate de substanțe biologice active și proprietăților imunotrope. Rezultatele obținute vor permite desfășurarea ulterioară a cercetărilor clinice.

Rezultatele științifice principale prezentate pentru a fi susținute

1. Imuheptinul și imupurinul posedă potențial antiinflamator grație efectului de protecție a hematiilor în testul hemolizei oxidative, creșterii activității antioxidante totale relevată în testul de reducere a radicalului ABTS, intensificării activității paraoxonazei/arilesterazei.
2. Pe model de inflamație acută preparatele de origine entomologică au redus edemul urechii la șoareci, fiind administrate preventiv.
3. La stimularea macrofagelor peritoneale cu LPS, imuheptinul și, îndeosebi, imupurinul au diminuat nivelul citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-6) cu menținerea sau majorarea citokinei antiinflamatoare IL-10. Preparatele cercetate au crescut activitatea glutatation reductazei (GR), glutatation peroxidazei (GPO), au redus stresul oxidativ prin intensificarea utilizării tiolilor și diminuarea statusului prooxidant.

4. În inflamația subacută prin implantarea discurilor de fetru, imuheptinul și imupurinul au determinat inhibarea moderată a proceselor exudative și proliferative, 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. În inflamația subacută, indusă prin adjuvantul Freund, imuheptinul și imupurinul, în comparație cu dexametazona au determinat o diminuare mai marcată a nivelului de citokine, 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.
5. Rezultatele obținute au conturat mecanismele posibile ale acțiunii antiinflamatoare ale imuheptinului și imupurinului: scăderea nivelului citokinelor pro-inflamatorii și majorarea celor antiinflamatorii; diminuarea stresului oxidativ în inflamație prin restabilirea raportului dintre sistemul pro- și antioxidant; acțiunea imunomodulatoare prin reglarea activității celulelor implicate în inflamație (macrofage).

Implementarea rezultatelor. Studiul a permis de a sistematiza proprietățile antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului 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 al IP USMF „Nicolae Testemițanu” (act de implementare nr. 94 din 13.06.2023).

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, Bacu - June 2 – 3, 2021; III Центральноазиатского 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 12 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, 4 articole

în culegeri științifice internaționale, 2 teze la forurile științifice naționale, un certificat de inovator (nr. 6060 din 29.05.2023). Din publicațiile la tema tezei, 3 sunt ca monoautor și 7 de prim autor.

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, include 30 tabele, 27 figuri, 200 surse bibliografice, 12 anexe.

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

CONȚINUTUL TEZEI

1. PREPARATE ENTOMOLOGICE – SINTEZE, SUGESTII ȘI PERSPECTIVE

Capitolul este dedicat analizei literaturii cu prezentarea insectelor ca sursă de substanțe biologic active cu variate efecte benefice asupra sănătății. Insectele, aparținând clasei, *Insecta*, încrengăturii *Arthropoda*, și regnului *Animalia* sunt cel mai mare grup de nevertebrate din regnul animal. 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 [17, 23].

Contribuțiile nutriționale ale insectelor sunt asigurate de: proteine (20-70%) cu un conținut de aminoacizi esențiali (46-96%); lipide (10-50%) ce includ 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, 18, 23].

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.

Insectele sunt capabile să producă o mulțime de substanțe biologic 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 [2, 7, 13, 22, 31].

În anii 2002-2003 au fost inițiată cercetarea produselor biologic 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). Analiza datelor expuse au demonstrat, că produsele entomologice din *Lepidoptera* au cel mai mare conținut de proteine la toate etapele de evoluție în comparație cu *Coleopterele*, *Dipterele*, ouăle de prepeliță și alooe. Concomitent, produsele din *lepidoptere* cedau celorlalte extrase după conținutul de lipide și glucide [3, 7, 8]. Cercetările experimentale și clinice ale produselor biologic active obținute din țesuturile de insecte din ordinul *Lepidoptera* au fost direcționate în studiul proprietăților antibacteriene, antifungice, antivirale, hepatoprotectoare, imunomodulatoare și mai puțin antiinflamatorii.

2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

În acest capitol 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.

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* au constatat în modelarea edemului urechii la șoricei prin aplicarea xilenei, precum și prin modelarea inflamației subacute și cronice cu elucidarea influenței asupra proceselor de exudație și proliferare prin utilizarea metodelor în baza recomandărilor contemporane [28, 34, 35]. Studiul *in vivo* a inclus 29 șoricei albi, femele și masculi și 96 de șobolani albi de laborator (*Rattus albicans*) femele și masculi.

Pentru studiul *in vitro* al proprietăților antiinflamatoare a preparatelor cercetate au fost aplicate metodele: testul de inhibare a hemolizei oxidative (OxHLIA) [24]; determinarea activității paraoxonazei-1 (PON1) [25]; determinarea activității antioxidante totale (AAT) prin testul de reducere a radicalului ABTS (acidul 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) [14, 20].

La fel, fiind bine cunoscut rolul macrofagelor în procesul inflamator a fost selectată o metodă *ex vivo* de cercetare, unde macrofagele recoltate din cavitatea peritoneală, fiind incubate cu substanțele testate, au fost stimulate cu LPS. Ulterior, valorile indicilor biochimici și citokinelor obținute la evaluarea probele cu LPS au fost comparate cu probele nestimulate (fără LPS) [19, 30].

Metodele sus-numite au fost realizate în timp diferit, astfel pentru evaluarea timpurie a potențialului antiinflamator a imuheptinului și imupurinului, cât și pentru a limita numărul de animale a fost realizat inițial un studiu screening, în care au fost utilizate metodele *in vitro* de cercetare, la fel substanțele testate au fost evaluate pe un model de inflamație acută (edemul urechii la șoareci indus de xilenă), urmat de studiul *ex vivo* pe macrofagi. Datele acumulate la această etapă au relevat potențial antiinflamator pentru substanțele cercetate, fiind inițiat prin urmare un studiu mai aprofundat al proprietăților antiinflamatorii a imuheptinului și imupurinului, și anume studiul influenței preparatelor entomologice asupra fazei exudative și proliferative a inflamației, modelând inflamația proliferativă și imună. Proiectarea generală a cercetării este prezentat în Figura 2.1.

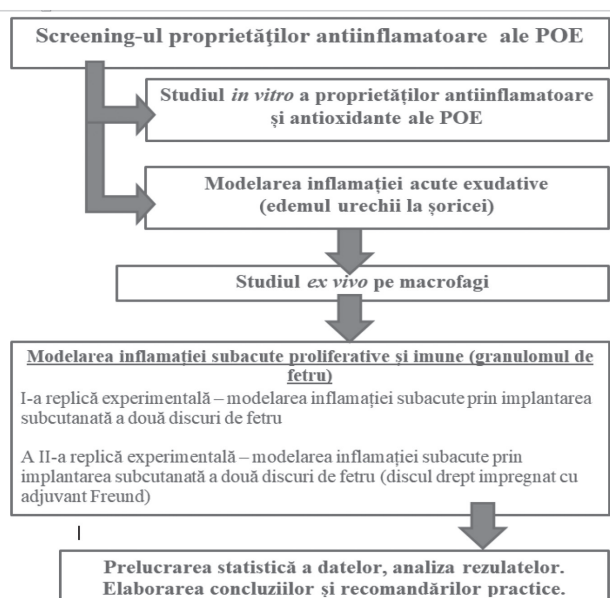


Figura 2.1. Design-ul cercetării

Indicii sanguini au fost determinați la analizatorul hematologic automat XT-2000i-5, producător SISMEX. S-a determinat numărul eritrocitelor, leucocitelor, trombocitelor, conținutul hemoglobinei, hematocritului și procentului neutrofililor, limfocitelor, monocitelor, bazofililor, eozinofililor și granulocitelor imature.

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

Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a efectuat utilizând pachetul software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versiunea 25.0. Au fost determinați indicatorii de bază ai statisticii descriptive – media, abaterea standard, mediana și abaterea intercuartilă. Diferențele între loturi, pentru diferite variabile cercetate, au fost studiate utilizând One-Way Anova și testul pentru datele non-parametrice Kruskal –Wallis în cazul distribuției neuniforme sau numărului redus de probe și aplicarea ulterioară a testelor *post-hoc* pentru comparații multiple: corecția Bonferroni pentru One-Way Anova și testul Kruskal –Wallis. Pragul de semnificație stabilit a fost pentru intervalul de încredere (Î) de 95%.

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

Acest capitol include rezultatele cercetărilor experimentale screening: metodelor *in vitro* și *in vivo* de testare a proprietăților antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului pe model de inflamație acută; studiul influenței imuheptinului și imupurinului asupra procesului inflamator indus de LPS prin determinarea profilului citokinic, evaluarea sistemului pro- și antioxidant.

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

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 (fig. 3.1.1).

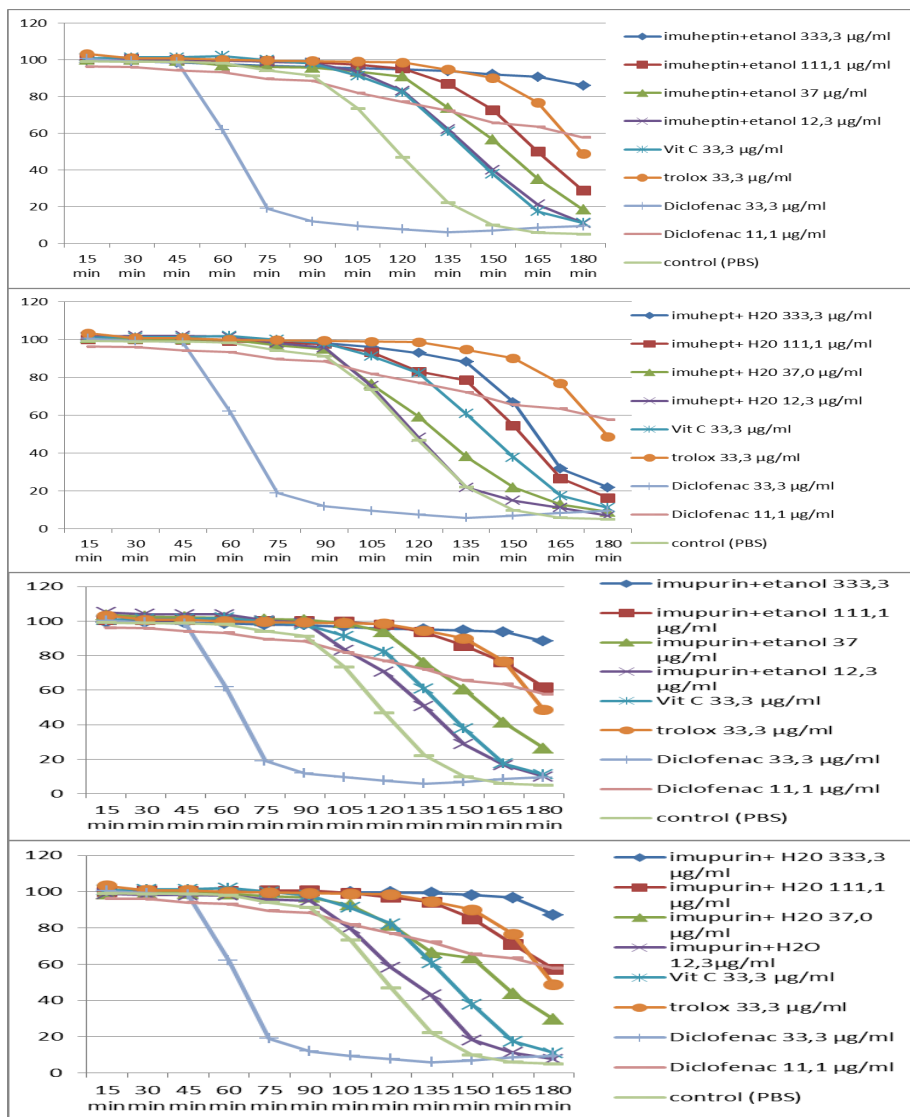
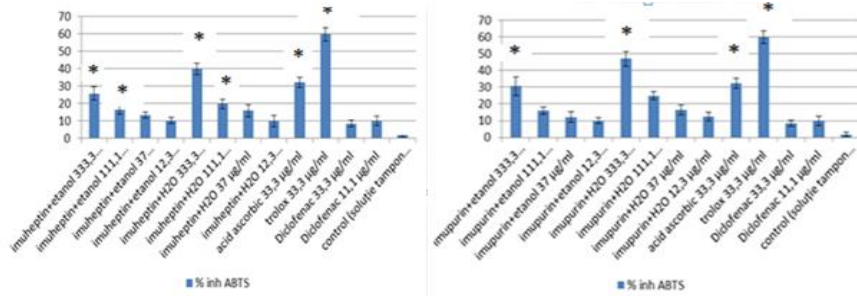


Figura 3.1.1. Influența imuheptinului și imupurinului asupra hemolizei oxidative

Valorile activității antioxidante totale (AAT) obținute au arătat că extractele imupurinului au manifestat un efect antioxidant prin reducerea radicalului ABTS mai pronunțat față de extractele imuheptinului; preparatele de origine entomologică au determinat o capacitate mai mare de reducere a radicalului ABTS comparativ cu antiinflamatorul nesteroidian, iar extractele hidrice

în concentrațiile 333,3 $\mu\text{g/ml}$ mai superioară față de acidul ascorbic. Acest efect s-ar putea datora conținutului de antioxidanți hidrosolubili din extractele imupurinelui și imuheptinului (fig. 3.1.2).

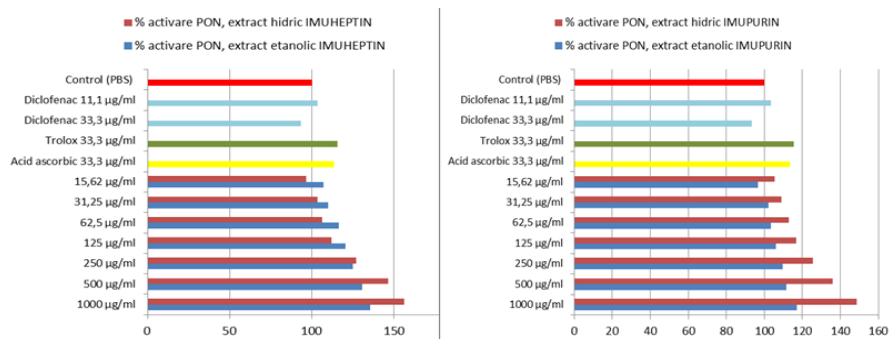


* diferențe statistice semnificative atestate față de lotul control (soluție PBS); $p < 0,05$;

p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni ($\hat{\Pi}=95\%$)

Figura 3.1.2. Influența imuheptinului și imupurinelui asupra AAT (testul ABTS)

Studiul influenței asupra activității paraoxonazei-1 (PON1) a demonstrat o creștere a acestora sub acțiunea acidului ascorbic, troloxului, imupurinelui și imuheptinului, diclofenacul nu a influențat semnificativ activitatea PON. Preparatele entomologice au prezentat un efect dozo-dependent, extractele hidrice manifestând activitate superioară față de cele etanolic, concentrațiile mari (îndeosebi a extractelor hidrice) fiind superioare substanțelor de referință. Analiza comparativă a demonstrat că, atât extractul etanolic, cât și cel hidric al imuheptinului a contribuit la o majorare mai accentuată a activității PON-1 față de extractele similare ale imupurinelui (fig.3.1.3).



Diferențele statistice semnificative atestate față de lotul control ($p < 0,05$):

Extract etanolic și hidric imuheptin 1000,0 $\mu\text{g/ml}$, 500,0 $\mu\text{g/ml}$, 250,0 $\mu\text{g/ml}$ (etanolic)

Extract etanolic și hidric imupurin 1000,0 $\mu\text{g/ml}$, 500,0 $\mu\text{g/ml}$ (hidric), 250,0 $\mu\text{g/ml}$ (hidric)

p – semnificația ajustată din testul Kruskal-Wallis cu corecția Bonferroni ($\hat{\Pi}=95\%$)

Figura 3.1.3. Influența imuheptinului și imupurinelui asupra hemolizei oxidative

Pe modelul inflamației acute – edemul urechii la șoareci indus de xilenă, imuheptinul și imupurinul au determinat o reducere a edemului, imupurinul a diminuat inflamația cu 45,8%, iar imuheptinul cu 49,7% (fig. 3.1.4).

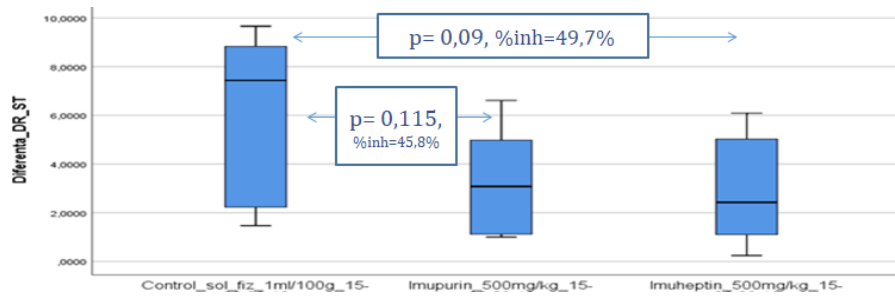


Figura 3.1.4. Influența imuheptinului și imupurinului asupra edemului urechii la șoareci

3.2 Influența imupurinului și imuheptinului asupra inflamației induse prin lipopolizaharide

În macrofagele stimulate de LPS (control LPS) s-a constatat o creștere 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).

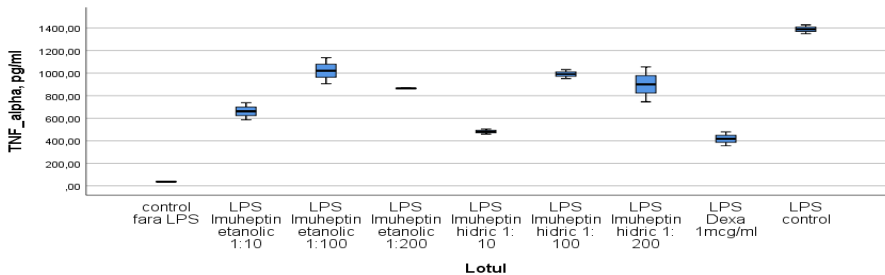


Figura 3.2.1 Influența imuheptinului asupra nivelului de TNF-alfa în macrofagele stimulate prin LPS

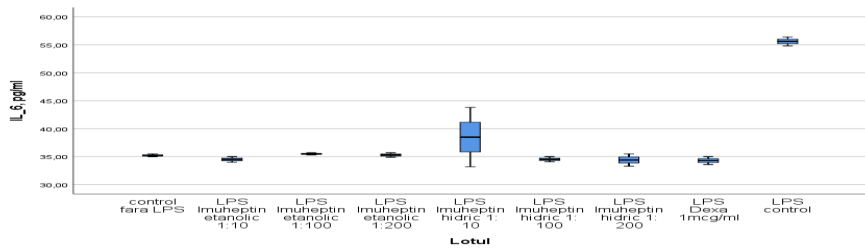


Figura 3.2.2 Influența imuheptinului asupra nivelului de IL-6 în macrofagele stimulate prin LPS

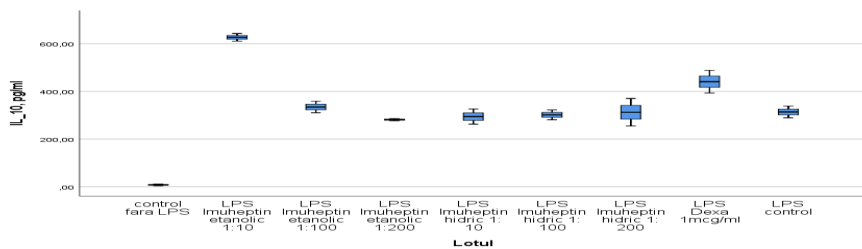


Figura 3.2.3 Influența imuheptinului asupra nivelului de IL-10 în macrofagele stimulate prin LPS

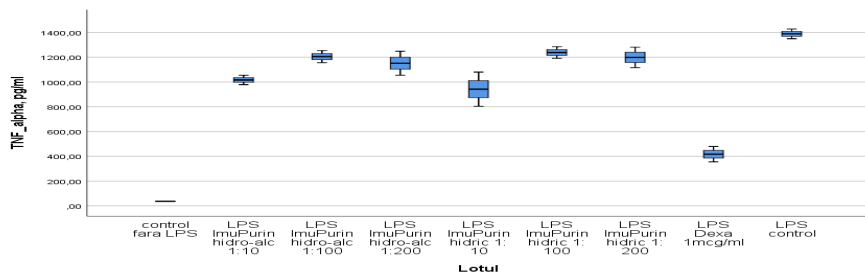


Figura 3.2.4 Influența imupurinului asupra nivelului de TNF-alfa în macrofagele stimulate prin LPS

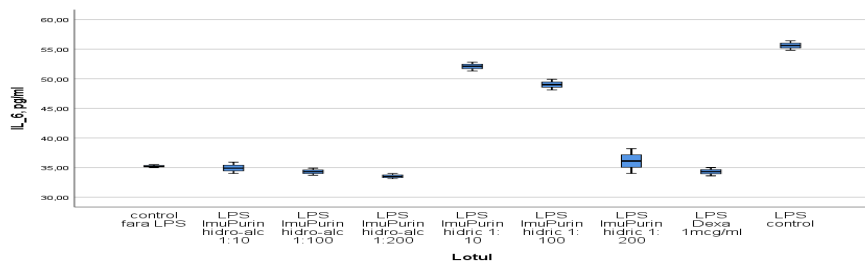


Figura 3.2.5 Influența imupurinului asupra nivelului de IL-6 în macrofagele stimulate prin LPS

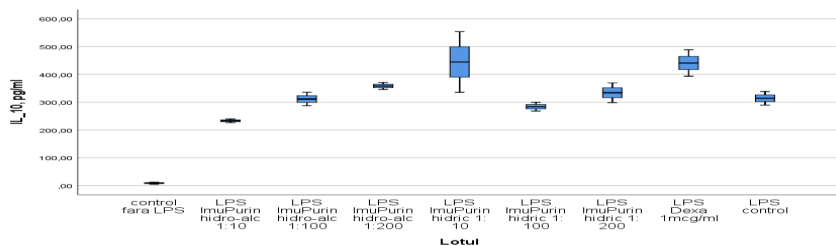


Figura 3.2.6 Influența imupurinului asupra nivelului de IL-10 în macrofagele stimulate prin LPS

Extractul etanolic și hidric de imuheptin a scăzut nivelurile de TNF-alfa (fig.3.2.1) și IL-6 (3.2.2) la macrofagele stimulate de LPS, pentru extractul hidric în diluția 1:10, valorile TNF-alfa fiind similare dexametazonei (fig.3.2.1). Extractul etanolic de imuheptin în diluția 1:10 a influențat considerabil conținutul IL-10 ($626,2 \pm 15,8$ pg/ml) în comparație cu dexametazona ($440,7 \pm 47,5$ pg/ml) și lotul control LPS ($313,9 \pm 24,4$ pg/ml), însă această superioritate nu a fost caracteristică altor concentrații a extractelor etanolice și hidrice ale imuheptinului (fig.3.2.3). La tratarea macrofagelor cu extract etanolic și hidric de imupurin, s-a observat o diminuare neesențială a TNF-alfa (fig.3.2.4), extractul etanolic a diminuat mai accentuat IL-6 (fig.3.2.5), iar nivelul IL-10 era similar dexametazonei pentru extractul hidric în diluția 1:10 (fig.3.2.6).

Influența preparatelor studiate asupra sistemului prooxidant s-a efectuat prin studierea nivelului dialdehidei malonice (DAM) în macrofagele peritoneale. La stimularea macrofagelor cu LPS s-a constatat o creștere a nivelului DAM de la $11,8 \pm 1,0$ μ M/L până la $17,0 \pm 1,7$ μ M/L ($P < 0,05$), preparatele entomologice au menținut valorile DAM la nivelul macrofagelor nestimulate.

Preparatele de origine entomologică în diluțiile cercetate nu au modificat semnificativ activitatea catalazei și superoxid dismutazei (SOD) în macrofagele nestimulate cu LPS. Stimularea macrofagelor peritoneale prin LPS a determinat o majorare nesemnificativă a activității catalazei ($17,1 \pm 1,5$ μ M/s.L în lotul control LPS și $16,4 \pm 1,5$ μ M/s.L în lotul fără stimulare LPS). Extractul etanolic de imuheptin, îndeosebi în diluția 1:100 la incubarea cu macrofagele stimulate prin LPS a crescut activitatea catalazei ($26,3 \pm 0,9$ μ M/s.L; $p > 0,05$). În condiții similare extractul hidric de imuheptin a diminuat activitatea catalazei în diluțiile 1:100 și 1:200 ($16,8 \pm 0,6$ μ M/s.L, respectiv $11,4 \pm 0,6$ μ M/s.L). Incubarea macrofagelor stimulate prin LPS cu extractul etanolic de imupurin în diluțiile 1:10 și 1:100 a determinat micșorarea activității catalazei ($13,7 \pm 0,4$ μ M/s.L, respectiv $11,2 \pm 0,4$ μ M/s.L), în timp ce, extractul hidric de imupurin în diluțiile cercetate nu a modificat esențial activitatea enzimei. Stimularea macrofagelor cu LPS a determinat o majorare a activității SOD de la $854,4 \pm 48,5$ u/c până la $1237,1 \pm 121,5$ u/c ($p < 0,05$). Ambele preparate entomologice la incubarea cu macrofagele stimulate LPS au diminuat nesemnificativ activitatea SOD în comparație cu lotul control LPS, cu excepția extractului hidric de imuheptin în diluția 1:10 unde valorile erau similare lotului control LPS ($1229,0 \pm 34,8$ u/c).

La stimularea macrofagelor prin LPS s-a constatat o micșorare a activității glutatyon reductazei (GR) de la $34,2 \pm 2,6$ nM/s.L până la $21,9 \pm 3,1$ nM/s.L în lotul control ($p < 0,05$). Dexametazona a determinat o anihilare a efectului LPS cu majorarea activității GR mai pronunțat la concentrația de 10 μ g/ml ($44,2 \pm 4,5$ nM/s.L, $p > 0,05$). Efect similar antiinflamatorului steroidian s-a determinat la incubarea macrofagelor cu extractul etanolic și hidric de imuheptin, îndeosebi în

diluția 1:200 ($42,7 \pm 2,8$ nM/s.L, $p > 0,05$; respectiv $44,7 \pm 2,9$ nM/s.L, $p > 0,05$). Extractul etanolic și hidric de imupurin a demonstrat o capacitate mai mare de intensificare a activității GR la stimularea macrofagelor cu LPS, valorile pentru extractul etanolic fiind de - $47,7 \pm 2,0$ nM/s.L (diluția 1:10); $53,3 \pm 1,7$ nM/s.L (1:100) $53,6 \pm 7,0$ nM/s.L (1:200), iar pentru extractul hidric - $51,7 \pm 2,0$ nM/s.L (1:10); $43,8 \pm 1,0$ nM/s.L (1:100); $43,6 \pm 2,1$ nM/s.L (1:200).

Stimularea macrofagelor prin LPS a determinat o reducere a activității glutathion peroxidazei (GPO) de la $448,6 \pm 27,9$ nM/s.L până la $206,0 \pm 21,6$ nM/s.L ($p < 0,05$). Extractul etanolic de imuheptin în diluțiile 1:10 și 1:100 a restabilit activitatea GPO la nivelul macrofagelor intacte ($480,9 \pm 6,2$ nM/s.L; respectiv $424,6 \pm 2,4$ nM/s.L, $p > 0,05$), iar extractul hidric a manifestat o tendință de creștere a activității enzimei în diluția de 1:10 ($313,6 \pm 11,3$ nM/s.L, $p > 0,05$). Extractele etanolic și hidric de imupurin în diluția 1:10 au anihilat efectul LPS de reducere a activității GPO în macrofazele peritoneale ($302,2 \pm 8,7$ nM/s.L; $312,3 \pm 20,0$ nM/s.L, $p > 0,05$).

La stimularea macrofagelor peritoneale cu LPS s-a determinat o majorare a activității glutathion-S-transferazei (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 $1 \mu\text{g/ml}$ ($7,6 \pm 0,9$ nM/s.L). La incubarea macrofagelor stimulate prin LPS cu extractul etanolic de imuheptin s-a constatat o tendință de majorare a activității GST în diluția de 1:10 ($14,0 \pm 1,6$ nM/s.L; $p > 0,05$) și de micșorarea în diluțiile 1:100 și 1:200 ($10,6 \pm 0,9$ nM/s.L; respectiv $9,1 \pm 0,8$ nM/s.L; $p > 0,05$). Extractul hidric de imuheptin a determinat o creștere a activității GST mai accentuată în diluția de 1:10 ($54,6 \pm 4,2$, $p > 0,05$). Imupurinul nu a influențat vădit activitatea GST.

4. INFLUENȚA PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ ASUPRA INFLAMAȚIEI SUBACUTE

Capitolul 4 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.

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

Implantarea discurilor de fetru a determinat o reacție inflamatoare exudativă și proliferativă marcată, determinată de formarea granulomului umed și uscat. Dexametazona a determinat o inhibiție a procesului exudativ cu 38%, imuheptinul cu 13%, iar imupurinul cu 15%, iar a celui proliferativ dexametazona cu 45%, imuheptinul - 19% și imupurinul - 20%. 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. (tab.4.1.1).

Tabelul 4.1.1 Influența imuheptinului și imupurinului asupra inflamației subacute

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

Modelarea inflamației subacute a indus 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 (P₁₋₂>0,05) în lotul 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 (P₁₋₂>0,05) în lotul 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 (P₁₋₂<0,05) în lotul control.

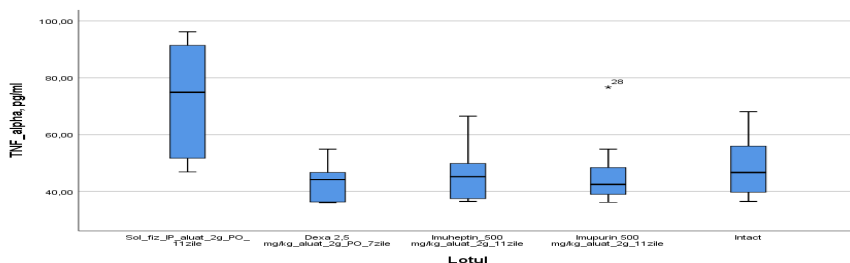


Figura 4.1.1 Nivelul de TNF-alfa în loturile cercetate

Dexametazona a determinat o diminuare marcată a nivelului TNF-alfa (fig.4.1.1) și IL-6 (fig.4.1.2) cu o creștere ușoară a IL-10 (fig.4.1.3) comparativ cu lotul control. Preparatele de origine entomologică, similar dexametazonei au scăzut esențial nivelul TNF-alfa (p<0,05) și IL-6 (p<0,05); imuheptinul, și îndeosebi imupurinul, au majorat conținutul IL-10 (p<0,05 pentru imupurin), citokină cu proprietăți antiinflamatorii, în comparație cu lotul control (fig.4.1.3). 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).

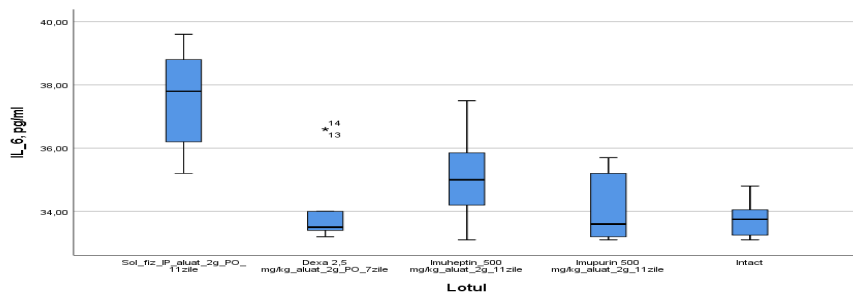


Figura 4.1.2. Nivelul de IL-6 în loturile cercetate

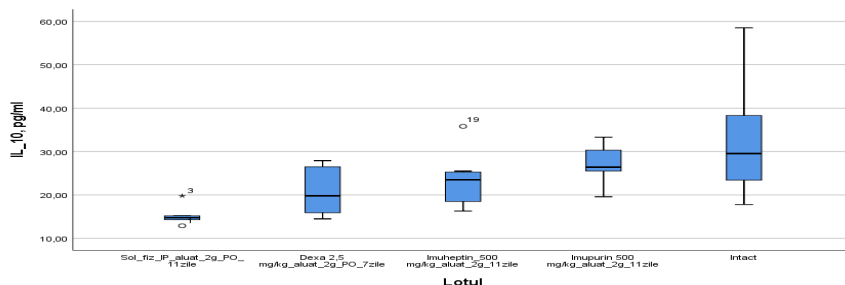


Figura 4.1.3. Nivelul de IL-10 loturile cercetate

În loturile cu inflamație 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 a restabilit activitatea catalazei și SOD la nivelul animalelor intacte și a majorat activitatea enzimelor sistemului glutationic (GR, GPO, GST). Imuheptinul, administrat la animalele cu inflamație, a redus activitatea SOD; a restabilit activitatea catalazei la nivelul lotului martor; a crescut activitatea GR, GPO și GST. Imupurinul, față de lotul control, a crescut activitatea catalazei, a micșorat-o pe cea a SOD și GST; a majorat activitatea GR și GPO (tab.4.1.2.).

În inflamația prin implantarea discurilor de fetru s-a constatat diminuarea nesemnificativă 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 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 nivelul PAB și MRO la nivelul

animalelor din lotul martor, iar cel al AAT (ABTS) și DAM la nivelul șobolanilor cu inflamație (tab.4.1.3.).

Tabelul 4.1.2. 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
	$\bar{X} \pm DS$ (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 ₁₋₂ =1,000	905,3±49,2 (910,1; 97,0) P ₁₋₂ =1,000	80,4±21,9 (89,3; 40,1) P ₁₋₂ =1,000	380,3±42,3 (389,7; 54,7) P ₁₋₂ =1,000	24,8±10,3 (27,5; 20,6) P ₁₋₂ =1,000
3.Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile	18,3±2,4 (18,5; 4,9) P ₁₋₃ =1,000 P ₂₋₃ =1,000	944,9±79,3 (962,3; 139,1) P ₁₋₃ =1,000 P ₂₋₃ =1,000	99,2±33,5 (107,2; 62,4) P ₁₋₃ =1,000 P ₂₋₃ =0,765	531,7±116,8 (568,4; 215,4) P ₁₋₃ =0,373 P ₂₋₃ =0,051	50,2±13,4 (52,4; 19,3) P ₁₋₃ =0,000 P ₂₋₃ =0,001
4.Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile	20,4±2,9 (21,3; 5,0) P ₁₋₄ =1,000 P ₂₋₄ =1,000 P ₃₋₄ =1,000	865,0±96,6 (834,8; 208,7) P ₁₋₄ =1,000 P ₂₋₄ =1,000 P ₃₋₄ =0,901	127,6±21,7 (142,9; 35,7) P ₁₋₄ =0,036 P ₂₋₄ =0,359 P ₃₋₄ =1,000	551,8±96,8 (519,7; 127,4) P ₁₋₄ =0,200 P ₂₋₄ =0,029 P ₃₋₄ =1,000	34,3±8,2 (33,1; 11,0) P ₁₋₄ =1,000 P ₂₋₄ =1,000 P ₃₋₄ =0,078
5.Imupurin 500 mg/kg,7 zile	31,8±9,5 (36,6; 19,2) P _{1,2,3-5} =0,000	888,9±135,9 (881,2; 118,8) P _{1,2,3-5} =1,000	150,8±65,7 (142,9; 107,2) P ₁₋₅ =0,001 P ₂₋₅ =0,015 P ₃₋₅ =0,08	535,5±100,6 (492,3; 162,4) P ₁₋₅ =0,311 P ₂₋₅ =0,042 P ₃₋₅ =1,000	21,1±9,6 (19,3; 13,8) P _{1,2,3-5} =1,000 P ₃₋₅ =0,000

Tabelul 4.1.3. 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
	$\bar{X} \pm DS$ (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 ₁₋₂ =1,000	6,6±4,6 (6,0; 9,8) P ₁₋₂ =1,000	15,4±2,6 (14,7; 3,4) P ₁₋₂ =1,000	317,2±39,1 (318,9; 67,6) P ₁₋₂ =1,000	766,3±52,3 (766,2; 103,7) P ₁₋₂ =1,000
3.Dexametazo nă 2,5 mg/kg, 7 zile	532,5±23,6 (541,3; 24,2) P ₁₋₃ =1,000 P ₂₋₃ =1,000	15,4±7,2 (14,3; 13,0) P ₁₋₂ =0,001 P ₂₋₃ =0,023	16,3±1,0 (16,5; 1,7) P ₁₋₃ =0,230 P ₂₋₃ =1,000	154,6±50,6 (137,1; 96,1) P ₁₋₃ =0,000 P ₂₋₃ =0,000	754,0±99,6 (771,7; 204,8) P ₁₋₃ =1,000 P ₂₋₃ =1,000
4.Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile	487,7±44,0 (502,1; 36,7) P ₁₋₄ =0,035 P ₂₋₄ =0,929 P ₃₋₄ =0,039	8,2±5,2 (8,3; 10,4) P ₁₋₄ =1,000 P ₂₋₄ =0,08 P ₃₋₄ =1,000	14,6±0,8 (14,5; 0,6) P ₁₋₄ =1,000 P ₂₋₄ =0,286 P ₃₋₄ =1,000	277,8±39,7 (289,2; 46,9) P ₁₋₄ =0,380 P ₂₋₄ =1,000 P ₃₋₄ =0,001	796,3±68,9 (771,7; 128,9) P _{1,2,3-4} =1,000
5.Imupurin 500 mg/kg,7 zile	518,9±29,3 (510,3; 54,3) P ₁₋₅ =1,000 P ₂₋₅ =1,000 P ₃₋₅ =1,000	8,0±3,4 (8,4; 4,7) P ₁₋₅ =1,000 P ₂₋₅ =0,036 P ₃₋₅ =1,000	15,8±1,2 (16,5; 1,8) P ₁₋₅ =0,969 P ₂₋₅ =1,000 P ₃₋₅ =1,000	344,1±64,5 (355,5; 103,3) P ₁₋₅ =1,000 P ₂₋₅ =1,000 P ₃₋₅ =0,000	801,0±60,3 (795,4; 117,7) P _{1,2,3-5} =1,000

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

În lotul control s-a constatat un grad mai exprimat al inflamației exudative în jurul discurilor infiltrate cu adjuvantul Freund. Dexametazona a determinat o reacție exudativă semnificativ redusă, atât în jurul discurilor fără adjuvant, cât și în jurul celor cu adjuvant Freund. Imuheptinul practic nu a influențat faza exudativă și proliferativă a inflamației; imupurinul a manifestat o tendință moderată de scăderea a intensității procesului exudativ și proliferativ (tab.4.2.1.).

Tabelul 4.2.1. Influența preparatelor de origine entomologică asupra inflamației subacute prin adjuvantul Freund

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)
1. Lotul control, sol. fiziologică, 7 zile	26,3±1,3	26,0±1,0	274,8±69,8	495,0±138,0	73,2±23,6	154,3±41,9
1. Dexametazonă 2,5 mg/kg, 7 zile	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
2. Imuheptin 500 mg/kg, 7 zile	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
3. Imupurin 500 mg/kg, 7 zile	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

La modelarea inflamației subacute prin implantarea adjuvantului Freund s-a constatat o majorare 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 nivelului citokinelor proinflamatorii - TNF-alfa, IL-1beta și IL-6, cât și celei antiinflamatorii - IL-10. Imuheptinul a diminuat nivelul citokinelor într-o manieră asemănătoare dexametazonei. 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); 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 în lotul control, dar a influențat mai puțin nivelul TNF-alfa și IL-1 beta comparativ cu antiinflamatorul steroidian și imuheptinul (tab.4.2.2.).

Tabelul 4.2.2. Influența imuheptinului și imupurinului asupra nivelului citokinelor în inflamația subacută prin adjuvantul Freund

Loturile de animale	TNF-alfa, pg/ml	IL-1beta, pg/ml	IL-6, pg/ml	IL-10, pg/ml
	$\bar{X} \pm DS$ (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 _{1,2} =1,000	59,2±16,9 (52,5; 30,9) P _{1,2} =1,000	25,2±3,8 (24,5; 4,6) P _{1,2} =1,000	92,9±33,5 (79,9; 61,4) P _{1,2} =0,000
3. Dexametazonă 2,5 mg/kg	68,6±15,1 (66,5; 19,3) P _{1,3} =1,000 P _{2,3} =1,000	50,4±12,7 (48,3; 15,5) P _{1,2,3} =1,000	19,9±4,6 (21,5; 7,6) P _{1,3} =0,015 P _{2,3} =0,101	84,7±15,9 (79,4; 26,8) P _{1,3} =0,000 P _{2,3} =1,000
4. Imuheptin 500 mg/kg	66,6±12,6 (66,3; 28,0) P _{1,2,3,4} =1,000	53,4±11,4 (51,4; 20,2) P _{1,2,3,4} =1,000	19,0±1,6 (19,2; 2,5) P _{1,4} =0,003 P _{2,4} =0,034 P _{3,4} =1,000	85,3±15,7 (86,2; 29,1) P _{1,4} =0,000 P _{2,4} =1,000 P _{3,4} =1,000
5. Imupurin 500 mg/kg	84,1±12,7 (86,9; 27,9) P _{1,5} =0,313 P _{2,5} =0,853 P _{3,5} >0,05	63,1±15,6 (63,8; 19,9) P _{1,5} =0,462 P _{2,5} =1,000 P _{3,5} =0,930	19,2±6,4 (19,3; 7,7) P _{1,5} =0,004 P _{2,5} =0,034 P _{3,5} =1,000	157,0±41,3 (168,0; 38,7) P _{1,5} =1,000 P _{2,5} =0,001 P _{3,5} =0,000

Tabelul 4.2.3. 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
	$\bar{X} \pm DS$ (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 _{1,2} =1,000	0,4±0,02 (0,4; 0,03) P _{1,2} =1,000	2,36±0,43 (2,42; 0,52) P _{1,2} =1,000	16,8±1,3 (16,5; 1,3) P _{1,2} =0,858	348,6±43,8 (364,8; 53,0) P _{1,2} =0,298
3. Dexametazonă 2,5mg/kg	1120,4±123,5 (1126,0; 210,1) P _{1,3} =1,000 P _{2,3} =0,755	0,4±0,01 (0,39; 0,02) P _{1,2,3} =1,000	2,06±0,28 (2,11; 0,35) P _{1,2,3} =1,000	16,1±1,0 (16,5; 1,9) P _{1,2,3} =1,000	216,9±28,5 (211,8; 41,0) P _{1,3} =0,001 P _{2,3} =0,000
4. Imuheptin 500 mg/kg	1033,6±171,4 (1016,8; 205,9) P _{1,2,3,4} =1,000	0,39±0,01 (0,38; 0,01) P _{1,2,3,4} =1,000	2,25±0,53 (2,39; 0,85) P _{1,2,3,4} =1,000	15,9±2,4 (15,8; 2,4) P _{1,2,3,4} =1,000	325,8±57,2 (327,2; 67,7) P _{1,2,4} =1,000 P _{3,4} =0,000
5. Imupurin 500 g/kg	1117,6±103,7 (1134,4; 126,0) P _{1,3,5} =1,000 P _{2,5} =0,748 P _{3,5} =0,082	0,41±0,02 (0,4; 0,02) P _{1,5} =0,004 P _{2,5} =0,045 P _{3,5} =0,082	2,38±0,52 (2,33; 0,66) P _{1,2,3,5} =1,000	14,6±2,0 (14,4; 1,8) P _{1,3,5} =1,000 P _{2,5} =0,184	340,1±37,1 (344,1; 56,8) P _{1,5} =0,672 P _{2,5} =1,000 P _{3,5} =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 modificarea AAT în testul ABTS. Dexametazona a restabilit activitatea SOD și a determinat micșorarea conținutului DAM. Preparatele entomologice au restabilit activitatea SOD, similar valorilor din lotul martor fără inflamație; au diminuat mai accentuat nivelul DAM; imupurinul a crescut AAT în testul ABTS (tab.4.2.3.).

SINTEZA REZULTATELOR

Compartimentul respectiv prezintă analiza rezultatelor obținute prin prisma datelor din literatură în vederea: argumentării proprietăților antiinflamatorii și antioxidante ale imuheptinului și imupurinului; analiza comparativă cu preparatele de referință (diclofenac, dexametazonă) pentru determinarea avantajelor și/sau dezavantajelor acțiunii antiinflamatoare; evidențierii posibilelor mecanisme ale acțiunii antiinflamatoare și antioxidante; stabilirii perspectivelor de cercetări clinice.

Proprietățile antiinflamatorii ale imuheptinului și imupurinului au fost testate *in vitro* prin determinarea acțiunii membranostabilizatoare (testul de hemoliză oxidativă), activității antioxidante totale (testul ABTS) și activității paraoxonazei-1(PON1). Testul de hemoliză oxidativă reprezintă o metodă *in vitro* de cercetare a activității antiinflamatoare și antioxidante; membrana eritocitară este similară celei lizomale, iar stabilizarea lizosomală este importantă în delimitarea răspunsului inflamator prin prevenirea eliberării conținutului din lizozomii neutrofilelor activate. Activitatea extracelulară a enzimelor lizomale este în corelație directă cu procesul inflamator acut și cronic [16, 24]. 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 acidului ascorbic, cât și antiinflamatorului nesteroidian diclofenac.

Cercetările recente au demonstrat, că PON1 este activă față de unele eicosanoide-δ-lactone naturale derivate din acidul arahidonic. Studiile referitor la activitatea antioxidantă au relevat, că PON1 poate hidroliza peroxidul de hidrogen, o formă activă a oxigenului produsă în procesul de aterogeneză. Extractele etanolic și hidric de imuheptin și imupurin în concentrațiile 125-1000 μg/ml au demonstrat capacitatea de a crește activitatea PON1, superioară diclofenacului și antioxidanților (trolox, acid ascorbic). În testul ABTS, preparatele de origine entomologică au determinat o capacitate mai mare de reducere a radicalului ABTS în comparație cu diclofenacul, iar în concentrațiile 333,3 μg/ml mai superioară față de acidul ascorbic. Acest efect s-ar putea datora conținutului de antioxidanți hidrosolubili din extractele imupurinului și imuheptinului.

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 [28]. Suprimarea edemului produs de xilen de către imuheptin și imupurin - un indiciu probabil al efectului antiflogistic (antiexudativ) a argumentat necesitatea cercetărilor mai aprofundate ale efectului antiinflamator al acestor preparate.

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- α , IL-6), dar și cele antiinflamatoare - IL-10 și declanșarea stresului oxidativ, relevat prin majorarea nivelului DAM și produselor proteice de oxidare avansată (PPOA) și micșorarea activității GR și GPO. Concomitent, s-a determinat o creștere compensatorie a nivelului ceruloplasminei 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 și modularea activității catalazei, SOD, GR, GPO și GST.

Analiza rezultatelor relatate sugerează, că antiinflamatorul steroidian și preparatele de origine entomologică restabilesc sau chiar cresc activitatea GR în macrofagele stimulate prin LPS, acțiune înțreptată spre menținerea nivelului adecvat de glutatation (GSH). Imuheptinul și imupurinul pot contribui, probabil, la sinteza GSH *de novo* prin aportul lor de aminoacizi.

Analiza activității enzimelor sistemului glutationic a demonstrat, că inflamația indusă prin LPS a micșorat activitatea GPO și GR cu o creștere nesemnificativă 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, dar și preparatele entomologice, au restabilit capacitatea de a normaliza nivelul GSH prin creșterea activității GR, de a intensifica neutralizarea peroxizilor prin majorare activității GPO. 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.

Implantarea subcutanată a discurilor de fetru provoacă formarea de țesut granulomatos, datorat concentrării macrofagelor, neutrofilelor și limfocitelor în jurul particulelor străine, urmată de proliferarea celulelor fibroblaste. Discul de fetru implantat stimulează sistemul imunitar pentru a produce citokine care stimulează proliferarea limfocitelor și cumulara de celule în jurul acestuia. Inițial, se dezvoltă procesele exudative prin transudarea lichidului și creșterea marcată a greutății 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, leucotriene și prostaglandine), inhibarea infiltrării cu celule (leucocite) și prevenirea proliferării fibroblastelor și a producerii fibrelor de collagen și sintezei mucopolizaharidelor [28, 34, 35]. Efect similar a demonstrat dexametazona și în studiul nostru. Imupurinul a manifestat o capacitate mai redusă față de dexametazonă, de a micșora procesle exudative și proliferative.

S-a observat formarea mai intensă de țesut granulos dacă peletele de bumbac au fost impregnate cu carrageenan. 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 [28]. La modelarea inflamației subacute prin implantarea discului cu adjuvant Freund s-a constatat dezvoltarea unui proces inflamator manifestat prin majorarea nivelului citokinelor proinflamatorii (TNF-alfa, IL-1beta) și micșorarea celei antiinflamatorii (IL-10). Concomitent, a crescut stresul oxidativ relevat prin majorarea nivelului DAM 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 au determinat o reducere a stresului oxidativ prin micșorarea nivelului DAM și creșterea activității SOD. Preparatele entomologice spre deosebire de dexametazonă nu au influențat semnificativ procesele exudative și proliferative în a II-a replica experimentală, probabil spre deosebire de antiinflamatorul steroidian, preparatele de origine entomologică dezvoltă un efect mai lent datorită proprietăților imunotrope asupra imunității celulare (modularea T-limfocitelor) și antioxidante.

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 protejare 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 glutatonei (normalizarea utilizării glutatonei), glutatonei peroxidazei (neutralizarea peroxidizilor) și au diminuat procesele de epuizare a glutatonei, 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 subcutată 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; au contribuit la echilibrarea statusului pro- și antioxidant cu creșterea utilizării compușilor tiolici.
4. În inflamația subcutată, indusă prin adjuvantul Freund, imuheptinul și imupurinul au determinat o diminuare a nivelului citokinelor, în special 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 genă.
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. BACINSCHI, N. *Hepatoprotectoare entomologice*. Chișinău. 2012. 312 p. ISBN 978-9975-4333-8-9
4. BACINSCHI, N. *Farmacologia preparatelor entomologice și utilizarea lor rațională*. Teza de doctor habilitat în științe medicale. Chișinău, 2013, 275p.
5. 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
6. BACINSCHI, N.; GUȚU, I.; GHICAVÎI, V.; POGONEA, I, CATCOV. C. Antiinflammatory action of the entomological drugs. In: *British Medical Bulletin*. 2016, 1, p.231-238. ISSN 0007-1420.
7. CIUHRÎI, 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.
8. CIUHRÎI, 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.
9. 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>
10. 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
11. 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>
12. 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
13. 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.
14. 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.
15. 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

16. 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
17. 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
18. ORDÓÑEZ-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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. ROS-BAROM, 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.
24. 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>.
25. ȘVEȚ I., PANTEA V., TAGADIUC O., GUDUMAC V., POPA V., ANDRONACHE L. *Metodă de apreciere a activității atero protectivă a substanțelor biologice active* Buletinul Oficial de Proprietate Intelectuală (BOPI), MD - BOPI 8/2019, pag. 54-55.
26. 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
27. 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.
28. VOGEL, H. GERHARD, et al., eds. *Drug discovery and evaluation: safety and pharmacokinetic assays*. New York: Springer, 2006.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. ЧЕРНЫШ, С.И., ГОРДЯ, Н.А. Иммунная система личинок *Callphora vicina* (Diptera, Callphoridae) как источник лекарственных веществ. В: *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2011, т.47, №6, с.444-452.
 33. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств* (под ред. МИРОНОВА А.Н.). Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
 34. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ* (под ред. ХАБРИЕВА Р.У.). Второе изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2005. - 832 с.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

1. Articole în reviste științifice

1.1. în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

- 1.1.1. BACINSCHI, N. et al. Antiinflammatory action of the entomological drugs. In: *British Medical Bulletin*. 2016, Issue 1(2), Volume 120, pp. 231-238. ISSN 0007-1420. IF 3,045.

1.2. în reviste din străinătate recunoscute:

- 1.2.1. GUȚU, I., BACINSCHI, N. Proprietățile antioxidante ale preparatelor de origine entomologică. În: *Farmacist.ro*. 2023, nr. 212(3), pp. 16-20. DOI: 10.26416/Farm.211.2.2023. ISSN 1584-6539; e-ISSN 2066-8228.
- 1.2.2. GUȚU, I., BACINSCHI, N. Insectele – surse de nutrient și substanțe biologice active. În: *Farmacist.ro*. 2023, nr. 212(3), pp. 21-26. DOI: 10.26416/Farm.211.2.2023. ISSN 1584-6539; e-ISSN 2066-8228.

1.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei:

- categoria B+

- 1.3.1. GUȚU, I. The influence of entomological preparations on oxidative stress in subacute inflammation. In: *Moldovan Medical Journal*. 2020, nr. 4(63), pp. 54-60. ISSN 2537-6373. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4016816>

- categoria B

- 1.3.2. GUȚU, I., COREȚCHI, I., CATCOV, C., BACINSCHI, N. Influența preparatelor de origine entomologică asupra proceselor exudative și proliferative ale inflamației. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2020, nr. 1(83), pp. 53-59. ISSN 1729-8687. <https://ibn.idsi.md/vizualizarearticol/102858>.

- categoria C

- 1.3.3. POGONEA, I. ș. a. Medicamentele entomologice: istorie și perspective.. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2021, nr. 3(71), pp. 128-131. ISSN 1857-0011. DOI: <https://doi.org/10.52692/1857-0011.2021.3-71.43>.

2. Articole în culegeri științifice

2.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale

- 2.1.1. GUTU, I. et al. Entomological preparations – a potential source of antiviral peptides. In: *The Second Eurasian Conference The Coronavirus Pandemic: Diagnosis, Treatment and Consequences*. Baku, Azerbaijan, 2021, pp. 60-65, ISBN: 978-9952-37-060-7, DOI: <https://www.doi.org/10.36719/2663-4619/2021/01>.
- 2.1.2. GUTU, I., BACINSCHI, N. The anti-inflammatory properties of entomological preparations in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages. В: *Сборник материалов III Центральноазиатского Конгресса клинической фармакологии*

«Современное состояние и перспективы развития клинической фармакологии». Бишкек, Кыргызская Республика: изд-во КРСУ, 2022, с. 42-53. ISBN 978-9967-19-923-1.

3. Teze în culegeri științifice

3.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

- 3.1.1. ГУЦУ, И., БАЧИНСКИЙ, Н., ПОГОНЯ, И., ГИКАВЫЙ., В. Препараты энтомологического происхождения и возможности их клинического применения. В: *Материалы конференции Вопросы организации и информатизации здравоохранения*. Минск, Республика Беларусь, 2015, с. 24–26.
- 3.1.2. ГУЦУ, И., БАЧИНСКИ, Н. Методологические аспекты изучения средств с противовоспалительным действием. В.: *Материалы Научно-практической конференции «Актуальные вопросы фармакологии и биохимии, посвященной 100-летию профессора А.А.Столяруча»*. Винница, Украина, 2020, с. 19-22.

3.2. în lucrările conferințelor științifice naționale

- 3.2.1. GUȚU, I. Influența preparatelor de origine entomologică asupra stresului oxidativ în inflamația subcutată. În: *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: CEP Medicina, 2020, p. 51. ISBN 978-9975-82-198-8.

4. Certificat de inovator.

- 4.1. GUȚU, I., ANDRONACHE, L., BACINSCHI, N., PANTEA, V., CATCOV, C. *Determinarea activității paraoxonazei/arilesterazei ca metodă de screening a proprietăților antiinflamatoare a preparatelor bioactive*. Certificat de inovator nr. 6064 din 29.05.2023

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 perspectivelor 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 perspectivelor 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 citochinelor 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 27 figures, 30 tables, 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 local 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.

GUȚU INA

**PROPRIETĂȚILE ANTIINFLAMATOARE ALE
PREPARATELOR DE ORIGINE ENTOMOLOGICĂ**

314.01 – FARMACOLOGIE ȘI FARMACOLOGIE CLINICĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 08.11.23

Formatul hârtiei: 60x84 1/16

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Tiraj: 50 ex.

Coli de tipar: 2,25

Comanda nr. 9

Tipărit la "Tipografia Nr.1" SRL
MD-2001, Chișinău, str. 31 August 1989, 46
Tel: (+373) 069 104 435

