

Descriere:

Prezenta invenție se referă la tratamentul fotodinamic al glandei mamare cu celule tumorale, cum se procedează în cazul tratamentului fotodinamic al cancerului.

Este bine cunoscut procedeele de introducere a derivatului de hematoporfirină sau a amestecului de porfirine, care sunt derivați ai acestui compus, de exemplu, introducerea preparatului "Fotofrin II" în celulele tumorale ale glandei mamare cu acționare ulterioară asupra acestor celule cu iradiere cu lumină de o anumită lungime de undă în scopul distrugerii celulelor. Acestei metode de terapie fotodinamică îi este consacrată o serie de articole aî. În ele se specifică că terapia fotodinamică și-a găsit o largă aplicare în tratamentul diferitelor forme de boli canceroase (inclusiv cancerul bronșic, al vezicii urinare, esofagului, plămânilor, pielii, organelor capului și gâtului, creierului, intestinului gros, precum și bolile canceroase intraoculare și ginecologice). Se afirmă că efectele biochimice ale fotosensibilizării cu porfirină menționate includ formarea legăturilor transversale între proteine în membrane, peroxidarea lipidelor, inhibarea transferului unor importanți metaboliți, lizisul membranelor lizosomale și mitocondriale, inhibarea activității unui șir de enzime și sporirea asimilării porfirinelor de către celule. Preparatul de porfirină este introdus, de regulă, pe calea injectării (de exemplu, intravenoase sau în cavitatea abdominală), doza tipică constituie 2 mg de preparat "Fotofrin" la 1 kg de masă a corpului.

Mai mult, preparatul de porfirină se poate include în liposomă și poate fi introdus printr-o injecție (de exemplu, în cavitatea abdominală).

Este cunoscut că introducerea fotoporfirinei în astfel de celule ca eritrocitele omului, sau celulele murine în caz de leucemie, dă un efect vizibil de fotosensibilizare. Însă când s-a injectat fotoporfirină animalelor în tumori nu a fost depistată o cantitate apreciabilă de fotoporfirină, ceea ce vorbește despre o posibilă scurgere rapidă a fotoporfirinei, introduse în organism în acest fel, ca urmare a circulației sângelui.

La fel de bine cunoscută este utilizarea derivatului hematoporfirinei și a preparatelor analogice pentru diagnosticarea și localizarea tumorilor, cum sunt cele de cancer al vezicii urinare sau al plămânilor.

Compusul activ utilizat conform unuia dintre aspectele prezentei invenții pentru tratamentul celulelor în terapia fotodinamică examinată sau în metodele cunoscute de diagnosticare și localizare a tumorilor nu este porfirina sau nu este numai porfirina.

Spre deosebire de porfirina simplă, acest compus inhibă transformarea enzimatică a fotoporfirinogenului în structura hemului celulelor menționate, provocând astfel formarea fotoporfirinei IX endogene în aceste celule. Autorii au stabilit că astfel de reagenți, cum sunt unele tipuri de compuși erbicizi, care reprimă transformarea enzimatică a porfirinogenelor în clorofilă în celulele vegetale, reprimă, de asemenea, transformarea enzimatică în structura hemului a celulelor glandei mamare. Autorii consideră că inhibarea menționată cu acești reagenți influențează, probabil, asupra stadiului de transformare a fotoporfirinogenului în fotoporfirină IX sub acțiunea enzimei astfel încât fotoporfirinogenul nu mai suportă transformarea enzimatică în fotoporfirină IX pe cale normală, dar în schimb suportă o oxidare intracelulară (de exemplu, în plasmă) în afara procesului enzimatic normal (de exemplu, toate membranele organelor), în consecință fotoporfirină IX se acumulează în regiunile, în care este inaccesibilă pentru o transformare normală în hem, și ca rezultat al iradierii celulelor cu lumină fotoporfirină IX, care s-a acumulat în acest fel, provoacă un efect de distrugere a celulelor asemănător cu cel care se observă în cazul descris mai sus al terapiei fotodinamice.

Compușii activi reprimatori de enzime, ce corespund acestei invenții, sunt inhibitori specifici ai fotoporfirinogen-oxidazei în sensul că nu acționează ca otrăvurile enzimatiche obișnuite asemeni reagenților care provoacă denaturarea sau formarea legăturilor transversale (de exemplu, asemănător reagenților pe bază de sulfhidril); ei nu au, mai întâi de toate, o influență atât de mare asupra condițiilor de oxidare cu preparate ca acceptorii de electroni și, prin urmare, compușii activi, preferențiali conform prezentei invenții, dispun de un potențial de oxidoreducere mult mai negativ decât -500 mV, și anume, egal cu -800 mV (măsurat, de exemplu, prin metoda obișnuită într-un dizolvant potrivit pentru acest compus: metoda ciclovoltamperometrică sau prin metoda polarografică). Este preferabil, de asemenea, ca compusul activ să nu reprezinte tetrapirrol și ca indicele său I_{50} pentru fotoporfirinogen-oxidază să fie mai mic de 1 μM , de exemplu, mai mic de 0,3 μM ; în particular, indicatorul I_{50} constituie aproximativ 0,1, 0,03 sau 0,01 μM sau chiar mai puțin.

Este preferabil un astfel de compus activ inhibitor de enzime care se caracterizează printr-o capacitate sporită de distrugere a plasmalemei (Plasmalemma) preparatelor vegetale. Conform încercării descrise mai detaliat în anexa A, reagenții preferați indică cel puțin o spălare comună de 50% la un nivel de prelucrare de 100 μM , însă este de preferat un nivel de prelucrare de 1 μM și mai puțin, de exemplu, la 100 nM. Preparatele cu activitate mare, cum sunt 1-(4-clor-2-fluor-5-proparhioxifenil)-3-metil-4-difluormetil- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-onul sau lactofenul (vezi în continuare) indică o spălare comună de mai mult de 90% la concentrația de 100 nM.

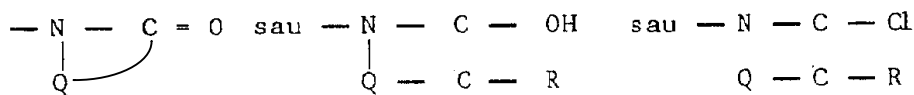
Altă metodă de determinare a capacității preparatului de a distruge plasmalema substanței vegetale este așa-numita "Experiență de inhibare a înverzirii, provocată de iradierea cu lumină" descrisă mai detaliat în Anexa B. Această metodă este menită să stabilească capacitatea preparatului de a reprima înverzirea culturii de microorganisme *Clamydomonas reinhardi*, y-1 înălbite în întuneric (varietate de microorganisme *algae*, care cresc în întuneric, fără a forma clorofilă). Se are în vedere că masa *algae* se înălbește datorită faptului că ea mai conține celule proaspete, neînverzite, dar formează din nou clorofilă la lumină. Mulți din compușii activi preferabili, care se folosesc conform prezentei invenții, sunt capabili să reprime înverzirea provocată de iradierea cu lumină cu cel puțin 50% la o concentrație de 10^{-5} M a compusului utilizat, de preferință la 10^{-6} M și mai puțin, de exemplu, la o concentrație de 10^{-7} M. În plus, acest compus trebuie să fie de așa natură ca pe parcursul menționatei încercări în vederea inhibării înverzirii să formeze un produs care iese la suprafață, cu maximul absorbției de lumină la 405 nM, ceea ce depășește maximul pentru clorofilă, care, în acest sistem, este de 669 nM; de exemplu, produsul care iese la suprafață indică la 405 nM un maxim care este de 2, 3 sau 4 ori mai înalt decât cel obținut la 668 nM.

Printre compușii activi inhibitori de enzime, care se pot utiliza la realizarea prezentei invenții, sunt erbicide de următoarele tipuri (A-D).

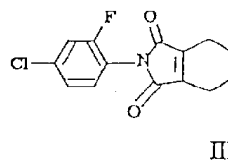
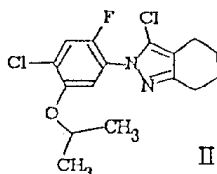
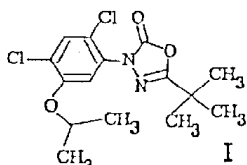
A. Erbicide aril-eterociclice cu formula generală:

Ph-NHet,

în care Ph reprezintă fenil substituit, de preferință fenil 2,4-disubstituit, și mai preferabil fenil 2,4,5-trisubstituit, iar NHet reprezintă eterociclu cu 5 sau 6 membri (cu 1-4 atomi pe azot în ciclu) cu formula:



în care Q indică grupa care încheie inelul eterociclic, iar R reprezintă hidrogenul sau grupa care-l substituie. Această clasă de compuși include, de asemenea, preparatele care sunt definite drept clasă de erbicide pe bază de imide ciclice ăzi, fiind prezentați următorii compuși:



Compusul I reprezintă un erbicid pe bază de aril-oxidiazol, și anume 2-butil-terțiar-4-(2,4-diclor-5-izopropoxifenil)-Δ²-1,3,4-oxidiazolin-5-on. Există și alte 2-alkil-4-(2,4,5-fenil trisubstituit)-Δ²-1,3,4-oxidiazolin-5-one, care se pot utiliza în conformitate cu prezenta invenție.

Compusul II reprezintă un erbicid pe bază de aril-tetrahidroindazol, și anume, 3-clor-3-(4-clor-2-fluor-5-izopropoxifenil)-4,5,6,7-tetrahidro-2H-indazol.

Compușii III, IV și V reprezintă niște erbicide pe bază de aril-tetrahidroftalimidă. Există și alte aril-tetrahidroftalimide, care pot fi utilizate în conformitate cu prezenta invenție. Pe lângă aceasta, sunt descrise alte cicluri NHet, utilizarea cărora este, de asemenea, posibilă.

Alte erbicide potrivite de tip P-NHet sunt:

aril-trialinonele;
aril-tetrazolinonele;
aril-triazindionele;
aril-hidantoinenele;
aril-urazolele și
aril-hexahidropiridazinele.

B. Uretane aril-eterociclice.

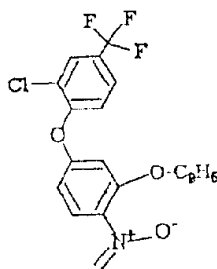
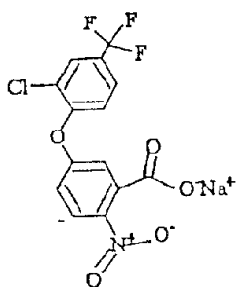
C. Erbicide pe bază de eter fenilic dintre cele ce au o structură para-halo- sau para-nitro-fenoxifenilică, și anume, de tipul următoarelor preparate care sunt în vânzare:

5-(2-clor-4-(trifluormetil)-fenoxi)-2-nitro-N-metansulfonilbenzamidă ("Fomesafen")

Sodiu-5-(2-clor-4-(trifluormetil)-fenoxi)-2-nitrobenzoat ("Acifluorfen")

Metil-5-(2,4-diclorfenoxi)-2-nitrobenzoat ("Bifenox")

2-clor-1-(3-etoxi-4-nitro-fenoxi)-4-trifluormetilbenzen ("Oxifluorfen")



Alte erbicide pe bază de eteri difenilici potrivite și care sunt în vânzare reprezintă următorii compuși:

"Lactofen": 1-(carboetoxi)-etil-5-(2-clor-4-trifluormetilfenoxi)-2-nitrobenzoat;

"Fluorglucofen": (carboetoxi)-metil-5-(2-clor-4-trifluormetilfenoxi)-2-nitrobenzoat;

"Fromesofen": 5-(2-clor-4-(trifluormetil)-fenoxi)-N-metilsulfonil-2-nitrobenzamidă;

"Clornitrofen": 2,4,6-triclor-(4-nitrofenoxi)-benzen;

"Clordifen": 2-nitro-1-(4-nitrofenoxi)-4-trifluormetilbenzen;

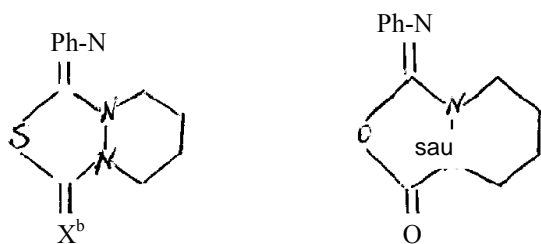
"Nitrofen": 2,4-diclor-1-(4-nitrofenoxi)-benzen;

"Clormetoxifen": 4-(2,4-diclorfenoxi)-2-metoxi-1-nitrobenzen.

În afară de acestea, încă un eter difenilic potrivit este oxim-O-acetatul de 5-(2-clor-4-trifluormetilfenoxi)-2-nitroacetofenonă.

D. Erbicide pe bază de aril-pirazoli.

E. Compuși cu formula:



în care x^b reprezintă oxigen sau sulf, iar Ph are valoarea indicată mai sus.

Tratamentul cu compuși activi, care corespund prezentei invenției, se poate realiza prin injecție atât pe cale intravenoasă, cât și pe cale intraabdominală. Compusul activ se poate utiliza sub forma unei compoziții sterile, care reprezintă un reagent dizolvat sau dispersat într-un purtător acceptabil farmaceutic, de exemplu, în soluție apoasă izotonică, cum este apa sărată (0,9% NaCl) sau soluție-tampon sărată Dulbecco cu o concentrație de aproximativ 2,5 mg/ml. Compusul chimic poate fi, de asemenea, inclus în sistemul lipozomal, care se poate obține într-un mediu fosfolipid. Pot fi dizolvate 51,5 mg de dipalmitoildifosfatidilholină în 10 ml de soluție de 1 mM de reagent în amestec de clorform cu alcool metilic (raportul volumetric 9:1) cu înlăturarea ulterioară a dizolvantului (după o amestecare preliminară minuțioasă) în condiții de vacuum la 30°C, obținând, ca rezultat, o substanță solidă care se poate aduce din nou în stare de suspensie în 10 ml soluție de 0,01 M soluție-tampon de fosfat cu mărimea pH egală cu 7,4, conținând 150 mM NaCl, cu o prelucrare ulterioară cu ultrasunet a soluției tulburate la 50°C în decurs de 30 min.

Reagenții inhibitori de enzime, care pot fi utilizați la realizarea prezentei invenției, pot fi uniți sau fixați cu anticorpi monoclonali potriviți, cu acțiune specifică asupra tumorilor (MAB), utilizând tehnica de fixare care este bine cunoscută specialiștilor din acest domeniu în calitate de mijloc de transportare a reagentului inhibitor de enzime la porțiunea concretă afectată de tumoare.

Compușii activi inhibitori de enzime care se utilizează în conformitate cu prezenta invenție pot fi introduși, de asemenea, prin înghițire, de preferință sub formă diluată împreună cu un purtător acceptabil farmaceutic, de asemenea, prin adăugarea lor în alimente, după cum se arată în exemplul 6.

Este de dorit, mai ales în cazul prescrierii preparatului prin înghițire, să se folosească reagenți inhibitori de enzime, care reprezintă niște săruri dizolvate în apă sau compuși acizi, ce formează săruri de sodiu și potasiu solubile în apă sau sare solubilă în apă, de exemplu, sarea de sodiu, cunoscută sub denumirea de "Acifluorfen".

Este admisibilă includerea compușilor activi inhibitori de enzime, utilizați în conformitate cu prezenta invenție, în preparate farmaceutice obișnuite, cum sunt pastilele (de exemplu, pastilele presate pe care se poate aplica pastă de zahăr și/sau sirop), supozitoarele, capsulele (de exemplu, capsulele solide gelatinoase), suspensiile, soluțiile, prafurile sau fiolele. În astfel de preparate componentul activ se poate afla în amestec cu un purtător solid sau lichid acceptabil farmaceutic, care, la dorință, poate fi un produs alimentar. De exemplu, acesta poate fi un produs solid, cum ar fi amidonul de porumb, sau diluant lichid, cum ar fi apa sau uleiul comestibil sau mineral, sau dizolvant: dimetilsulfoxid etc. Se pot utiliza amestecuri de componente active inhibitoare de enzime, de exemplu, amestecul componentului activ 6c, prezentat în exemplul 6, cu "Acifluorfen" în cantități aproximativ egale. Doza prescrisă se poate stabili pe cale experimentală obișnuită, după metoda experimentului descris pentru preparatul "Fotofrin" ("Photofrin").

În continuare, în scopul ilustrării prezentei invenției, sunt date câteva exemple.

Exemplul 1

Celulele HeLa (linia celulelor tumorale umane folosite, de regulă, în cercetarea tumorilor, extrasă din colecția de culturi American Type Culture Collection), care sunt în stadiul de creștere logaritmică (cultivate la 37°C timp de 5 zile în retorte falconice de 1 l pentru culturile țesuturilor), au fost supuse spălării în soluție-tampon de sare de fosfat (STSF). În continuare la ele s-a adăugat soluție de tripsină cu concentrația de 0,25% la 2 ml de STSF. Peste câteva minute preparatul a fost extras cu atenție din retortă și pus într-un pahar ce conținea 100 ml de soluție HEPES de 25 mM într-un mediu esențial minimal adăugând la MEM ser neactivat de bovine cu concentrația de 10% (parte de volum), 1,1 ml soluție de glutamină de 200 mM în soluție de sare cu concentrația de 0,85%, precum și 11000 unități de penicilină la 11000 μg de streptomycină.

Cultura de celule obținută, transferată din nou în stare de suspensie, a fost pusă în porțiuni a câte 5,0 ml în retorte falconice pentru culturile de țesut cu capacitatea de 50 ml și (cu excepția probei de control) s-a amestecat cu compusul medicamentos activ. Porțiunile indicate au fost, în continuare, ținute în întuneric la 37°C timp de 3 zile. După aceasta cultura de celule s-a extras și s-a supus extracției la lumină verde în felul următor.

Celulele au fost ridicate de pe fundul retortelor prin adăugarea a câte 0,8 ml de soluție de tripsină cu concentrația de 0,25% în STSF. După cultivarea de incubație în întuneric timp de o oră celulele și mediul au fost scoase din retorte, puse în eprubete cu fundul rotund pentru centrifugare și supuse la două cicluri de înghețare-dezghetare în scopul distrugerii celulelor și asigurării posibilității extragerii.

Cercetarea suspensiilor celulare după această operațiune de distrugere nu a scos la iveală celule nevătămate. În fiecare eprubetă s-au adăugat câte 10 ml de acetonă cu proprietăți de bază (90% acetonă:10% 0,1M NH₄ OH), apoi eprubetele au fost supuse centrifugării pentru a înlătura proteina și bucățelele de celule. În substanța ieșită la suprafață s-au adăugat câte 50 ml de apă, iar după aceea câte 0,5 ml de soluție de apă saturată de NaCl. În continuare s-a reglat pH-ul până la valoarea 6,8 prin introducerea în picături a soluției 2 M de KH₂PO₄. După aceea s-a umplut coloana de tip C8 Baker Prep. cu extract apos de acetonă. Coloanele s-au uscat și s-au spălat fiecare cu 2 ml de apă. Tetrapirolii au fost spălați cu amestecul NH₄OH:H₂O în proporția de 90:10, în raport volumetric de 2x1,5 ml. După aceea extractele au fost supuse determinării cantitative la spectrofluorimetru.

În experimentul analizat s-au folosit următorii compuși activi medicamentoși:

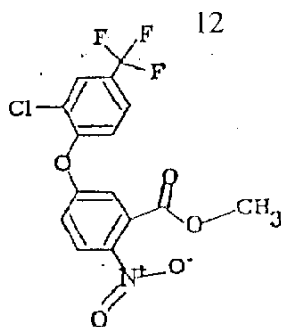
A. Acid 5-aminolevulinic, cunoscut ca produs intermediar în procesul sintezei tetrapirolilor.

Compusul activ A a fost pus sub formă sterilizată prin filtrare a soluției de 250 mM de apă (pH egal cu 6,5). Compușii activi B,C,D și E au fost puși sub formă soluției de 50 mM de acetonă. Acetonă s-a adăugat, de asemenea, în proba de control, pentru ca concentrația ei să constituie 0,2% (parte de volum). În culturile de celule s-au introdus așa cantități de compuși activi indicați, care ar asigura concentrațiile prezentate în tabelul 1. În același tabel sunt prezentate cantitățile de protoporfirină IX de tetrapirol (Proto IX) obținută.

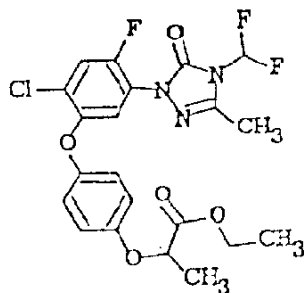
Tabelul 1
Acumularea tetrapirolului în celulele HeLa tratate

Component activ	Concentrația agentului activ, μM	Emisie fluore 400/630 s	Cantitatea de Proto IX, picomoli
A	5000	41842	4,2
B	100	12921	1,3
C	100	33477	3,5
D	100	10551	1,1
E	100	8967	0,9
Proba de control		2795	0,3

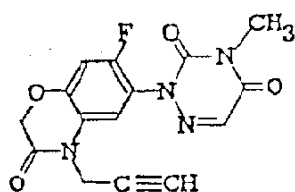
B. Erbicide cu formula:



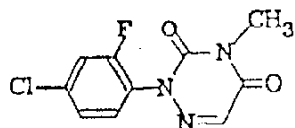
C. Erbicide cu formula:



D. Erbicide cu formula:



E. Erbicide cu formula:



Exemplul 2

Celulele HeLa în faza de creștere logaritmică au fost cultivate timp de 6 zile în șase retorte falconice de câte un litru pentru culturile de țesut la 37°C, apoi au fost spălate cu soluție-tampon de sare de fosfat (STSF). În continuare s-a adăugat soluție de tripsină cu concentrația de 0,25% în STSF și peste câteva minute celulele au fost scoase cu grijă și puse în pahare, care conțineau câte 110 ml de soluție HEPES de 25 mM în mediu eteric minimal (MEM) cu adăugarea a 10% (parte de volum) de ser neactivat de bovină, 1,1 ml de soluție de 200 mM de glutamină în soluție de sare cu concentrația de 0,85%, precum și 11000 unități de penicilină la 11000 μg de streptomicină.

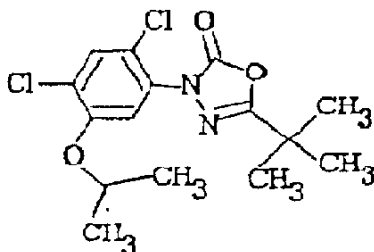
Cultura celulară, transferată din nou în stare de suspensie, s-a plasat în porțiuni egale a câte 5,0 ml fiecare în retorte falconice pentru culturile de țesut cu capacitatea de 50 ml, care conțineau sau nu conțineau erbicide, și s-a efectuat tratarea de incubare în

întuneric la 37°C timp de 4 zile, în care, analogic Exemplului 1, erbicidele s-au introdus în soluție diluată de acetonă. Acetona s-a adăugat, de asemenea, și în probele de control pentru a asigura concentrația de acetonă de 0,2% (parte de volum). Cantitatea de erbicide era pe măsură să asigure concentrația indicată în tabelul 2.

Pentru tratare s-au folosit următoarele componente active:

- B. Ca în Exemplul 1.
- C. Ca în Exemplul 1.
- F. Erbicid cu formula :

6d.



Extragerea s-a realizat în felul următor. Mediul din fiecare retortă s-a pus în eprubete de sticlă cu fundul rotund, celulele care s-au lipit de fundurile retortelor falconice fiind eliberate prin adăugarea a 0,5 ml de soluție de tripsină cu concentrația de 0,25% în STSF, și după maturarea timp de câteva minute la o temperatură de 37°C această cultură de celule s-a vărsat din retorte și s-a reunit cu mediul celular.

În continuare de la fiecare suspensie celulară s-au luat porțiuni egale a câte 100 μl în scopul determinării densității culturii de celule. Cei 5,4 ml de suspensie de cultură celulară care au mai rămas au fost supuși tratării cu ultrasunet timp de 30 min pentru distrugerea celulelor.

În fiecare eprubetă s-au introdus câte 10 ml de acetonă cu reacție de bază (90% acetonă:10% NH₄OH), apoi eprubetele au fost supuse centrifugării pentru a înlătura proteina și bucățelele de țesut celular. În substanța ieșită la suprafață s-au adăugat 5 ml de apă, apoi 0,5 ml de soluție saturată de apă de NaCl. După aceea valoarea pH-ului s-a ridicat până la 6,8, adăugând în picături soluție de 2 M de KH₂PO₄.

În continuare produsul s-a extras din mediul apă/acetonă, încărcând în coloana C8 Baker Prep. Coloana la început a fost uscată, iar după aceea s-au adăugat 3 ml de amestec de alcool metilic cu apă (90:10). Analogic Exemplului 1, toate operațiunile menționate de extragere s-au efectuat în condiții, care în esență exclud cu desăvârșire excitarea protoporfirinei IX sub acțiunea luminii, și anume, la lumină verde sau în întuneric, de exemplu, în vase cu acoperire albă. După aceea la spectrofluorimetrul CPEX s-au determinat parametrii fluorescenței extractelor. Indicatorii cantitativi ai acumulării protoporfirinei (Proto IX) s-au stabilit cu ajutorul coeficienților de stingere determinați anterior. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Indicatorii medii de încetinire a creșterii și acumulării Proto IX

Compusul activ	Concentrația componentului activ	Încetinirea creșterii, %	Cantitatea de Proto IX, picomoli	Conținutul relativ de Proto IX
B	100	99	5,20	2364
F	100	106	2,71	1232
C	100	52	4,41	2005
(continuare)				
C	10	-15*	0,57	259
C	1	-26*	0,19	86

Note: * Valoarea negativă a indicatorului "încetinirea creșterii" arată că creșterea are, totuși, loc.

** Valoarea medie pentru 10 celule.

*** În % în raport cu proba de control.

Alt aspect al prezentei invenții se referă la obținerea protoporfirinei IX (în continuare Proto IX). În conformitate cu aceasta s-a realizat cultivarea eterotrofică a microorganismelor *algae*, care sunt din clasa eucariotelor, în întuneric (sau la o lumină care nu provoacă excitarea Proto IX) într-un mediu, ce conține compusul activ descris mai sus, care inhibă transformarea enzimatică a protoporfirinogenului în Proto IX. Mediul sau microorganismele *algae*, sau ambele luate împreună, în continuare s-au tratat în scopul extragerii Proto IX și separării ei de clorofilă, carotinoide, bucăți de țesuturi celulare etc. Separarea se poate realiza prin orice metodă cunoscută, de exemplu, cromatografie în fază lichidă, inclusiv cromatografie lichidă cu inversarea fazelor sau prin dizolvare cu solvent, precum și prin precipitarea Proto IX prin trecerea ei în stare de compus chelatic cu un metal, de exemplu, fier, zinc sau mangan cu regenerarea ulterioară (la dorință) a Proto IX, așa cum se face acest lucru conform metodicii cunoscute de tratare a chelatului cu acid diluat.

Operațiunile la toate etapele separării se efectuează la o lumină care nu excită Proto IX, de exemplu, la lumină verde, așa cum se descrie în Anexa A, cu titlul "Tratarea la întuneric", sau în întuneric complet. Chelatul de fier nu este sensibil la lumină, de aceea lucrul la lumină în cazul utilizării acestui compus este, în mare măsură, admisibil.

Microorganismele *algae* este de dorit să se cultive sub formă de suspensie a culturii celulare la temperatura de 15-30°C. Concentrația compusului activ inhibitor poate, de exemplu, constitui de la 10⁻⁵ până la 10⁻⁷ M. Exemple de microorganisme *algae* acceptabile sunt: *Scenedesmus sp.*, *Chlamydomonas reinhardi*, *Euglena sp.*, *Bumilleriopsis filiformis*.

Exemplul 3

Cultura microorganismului *Clamydomonas reinhardi* (varietate sălbatică) a fost cultivată într-un rezervor din oțel inoxidabil cu capacitatea, de exemplu, de 300 l, cu utilizarea mediului de cultivare descris mai jos. La cultură s-a adăugat soluție de 1-(carboetoxi)-etil-5-(2-clor-4-trifluorometilfenoxi)-2-nitrobenzoat (așa-numitul "Lactofen", erbicid feniletic tehnic) în acetona în scopul asigurării concentrației componentului activ de 10^{-5} M și a concentrației finale a acetonei egale cu 0,1%. Amestecul a fost menținut pentru creșterea microorganismelor în el la temperatura de 25°C timp de 4-7 zile, amestecând mecanic atent și/sau aerisind. Continuând efectuarea operațiunilor în întuneric, conținutul rezervorului s-a filtrat; filtratul a fost supus analizei în vederea depistării în el a protoporfirinei IX.

Una din metodele de analiză în scopul depistării fotoporfirinei IX constă în filtrarea conținutului rezervorului de reacție (care în timpul acesta este la întuneric) și în adăugarea acetonei la filtrat. Amestecul a fost supus ulterior extracției cu eter de petrol. După aceea mediul apos de acetona a fost supus extracției cu eter dietilic, care mai târziu a fost înlăturat din precipitat prin evaporare. Acest precipitat a fost dizolvat în alcool metilic și a fost supus cromatografiei cu inversarea fazei în scopul obținerii fotoporfirinei IX. În plus, este posibilă și utilizarea metodei de depistare a acestui compus care este descrisă în exemplele 1 și 2.

Compoziția mediului Săruri	Concentrația molară, x10 M	Concentrat, %	ml de concentrat în 1 l
(Citrat Na) 6H ₂ O	1,7	10	5
Urme de metale	ca și mai jos	ca și mai jos	10
FeCl ₂ ·6H ₂ O	0,37	1	1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,36	5,3	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2	10	3
NH ₄ NO ₃	3,7	10	3
KH ₂ PO ₄	2,2	10	3
K ₂ HPO ₄	1,7	10	3
CH CO Na	7,5	10	10

Concentratul amestecului ce conține urme de metal:

	mg/l
H ₃ BO ₃	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100
MnSO ₄ ·4H ₂ O	40
CoCl ₂ ·6H ₂ O	20
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	20
CuSO ₄	4

O alternativă a utilizării microorganismelor *Clamydomonas reinhardi* este utilizarea culturii *Scendesmus sp.* cultivată în mediul descris mai sus, în care acetatul de sodiu este înlocuit cu glucoză.

Exemplul 4

Acest exemplu este analogic Exemplului 3, cu excepția faptului că în loc de "Lactofen" se utilizează 1-(4-clor-2-fluor-5-proparhiloxifenil)-3-metil-4-difluorometil- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-onul.

Exemplul 5

Determinarea indicelui I₅₀

Protoporfirinogen IX (Protogen IX)

Furnizorul preparatului Proto IX a fost firma "Porphyrin Products". Protogenul IX proaspăt s-a obținut prin restabilirea Proto IX cu utilizarea amalgamului de Na/H.

Materialul vegetativ

Răsadul de castraveți (*Cacumis sativus L.*, soiul Wisconsin SMR 18) a fost cultivat într-o cameră întunecoasă pentru răsad pe vermiculit umezit cu îngrășământ lichid comercial (9-45-15). Răsadul a fost crescut la temperatura de 25°C la umiditatea relativă a aerului de 80-90%. Răsadul a fost iluminat cu lumină discontinuă cu intensitatea dozată de 25 μ E/m² cu (PAR) de la o sursă de lumină Bright Stick, dirijată printr-un taimer electronic, calculată astfel: 1 min de iluminare într-un ciclu de 60 min. Astfel s-a obținut un țesut vegetativ, care are capacitatea de a sintetiza accelerat clorofilă în cazul reducerii la minim a cantităților de amidon de rezervă și a nivelurilor de clorofilă incipientă.

Izolarea cloroplastelor

Cloroplastele care se elimină au fost izolate prin metoda descrisă de T.P.Fuesler și colaboratorii săi, cu excepția faptului că în faza finală a curățirii plasticidele au fost centrifugate printr-o garnitură de 40% (parte de volum) din materialul Perco II, și nu prin una de 45%. După aceea cloroplastele au fost transferate din nou în starea de suspensie în soluție-tampon pentru probe, care conținea 0,5 M manitol, 20 μ M TES, 10 μ M HEPES, 1 μ M acid etilendiamintetraacetic, 1 μ M MgCl₂, 1% (masă/volum) albumină de ser de bovină și 1 μ M ditioeritritol cu pH egal cu 7,7 și un conținut total de proteină de 2 mg/l.

Probele protoporfirinogen-oxidazei

Probele au fost efectuate așa cum au fost descrise de către J.M.Jacobs și N.J.Jacobs. Modele (a câte 0,2 ml) de suspensie de cloroplaste au fost supuse unei tratări de incubare preliminară în întuneric timp de 15 min, la diferite concentrații de aciofluorfen-

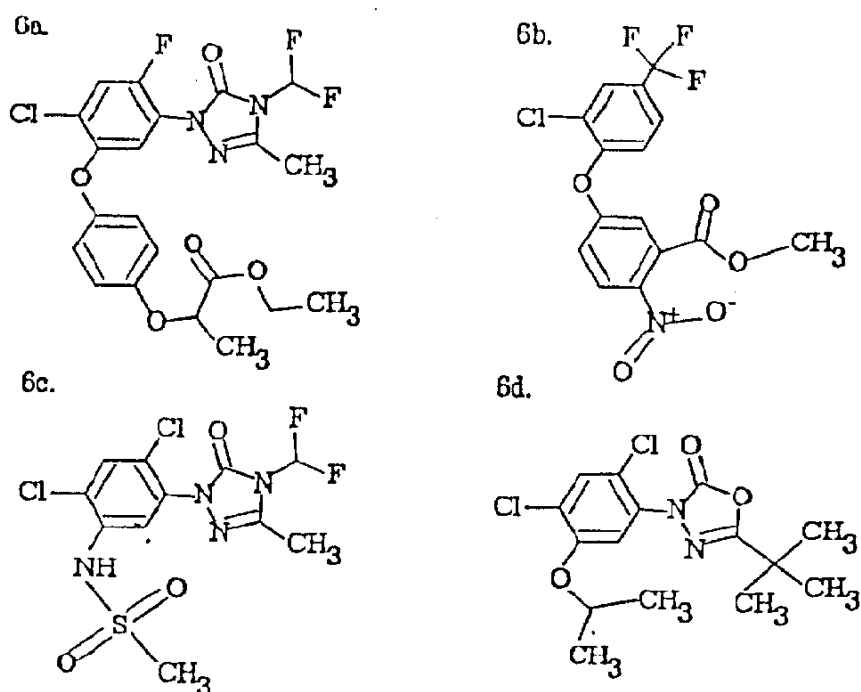
metil (AFM) sau la concentrația de 0,2% (parte de volum) a acetonei în cazul probei de control. După aceea 50 μ l de preparat Protogen proaspăt pregătit cu concentrația de circa 15 nM s-au introdus în suspensie în scopul inițierii reacției. Pregătirea probelor s-a finalizat cu introducerea a 2,75 ml de substanță fluorometrică care a fost propusă de către J.M.Jacobs și N.J.Jacobs, care conținea 1% (parte de volum) de TWIN-20 (monolaurat de polioxietilensorbitan), 50 mM tris-HCl și 1 mM acid etilendiamintetraacetic cu pH egal cu 8,5, totodată 1 mM ditioeritritol fiind substituit prin 5 mM glutation. După aceea suspensiile au fost analizate prin metoda afisajului direct la spectrofluorimetrul SPEX Fluorolog-2, dotat cu un indicator frontal de fluorescență pentru modelele biologice turburi. Cantitatea formată de Proto IX s-a stabilit după curba standard a graficului dependenței dintre emisiunea cantitativă de Proto IX la 630 nm și excitarea la 400 nm, această curbă fiind obținută pentru Proto IX pur în mediu fluorometric.

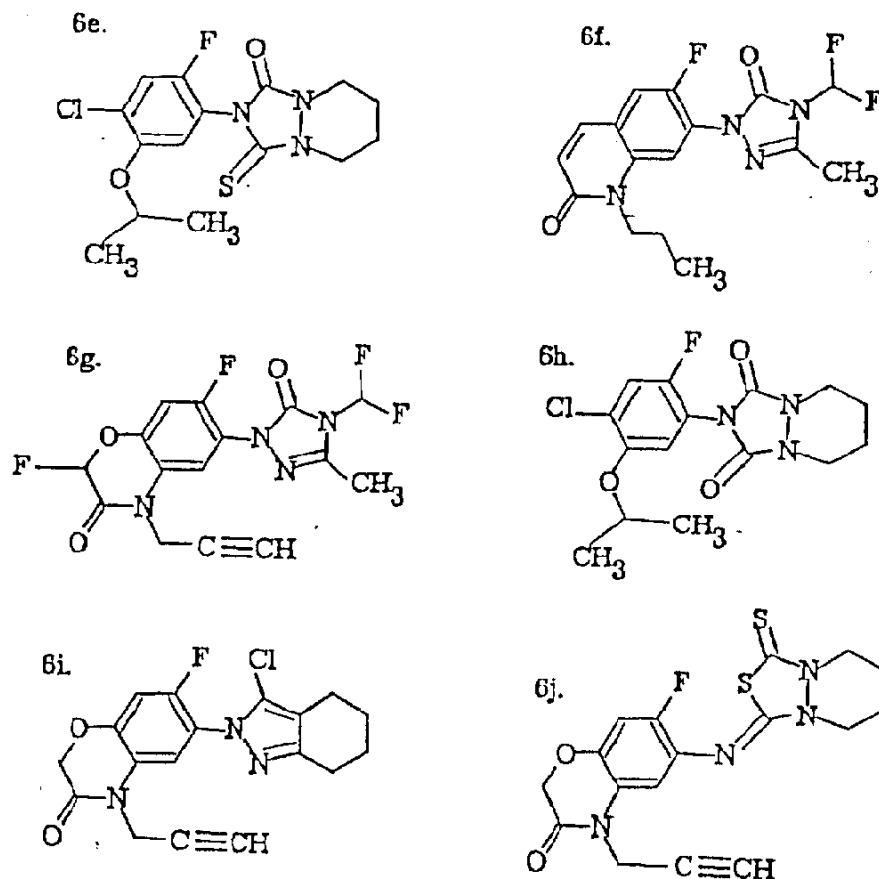
Pentru determinarea cantitativă a gradului de oxidare neenzimatică până la Proto IX în proba descrisă mai sus s-a pregătit o probă identică cu deosebirea că în locul suspensiei de cloroplaste active s-a folosit o suspensie, în care cloroplastele au fost aduse în stare inactivă prin încălzire la 85°C timp de 15 min. Scăderea cantității de Proto IX astfel obținută din cantitatea obținută în prezența cloroplastelor active dă anume cantitatea de Proto IX formată pe cale enzimatică. Rezultatele sunt prezentate grafic în fig. 1, în care LSD reprezintă diferența valorică minimă (notare obișnuită). Fig. 1 arată că indicatorul I_{50} (concentrație care asigură o inhibare de 50%) constituie mai puțin de 0,1 μ M, spre exemplu, circa 0,03 μ M.

Încercarea în vederea influenței a 10 μ M de AFM asupra transformării enzimatică a Proto IX în Proto IX magnezial în suspensie de cloroplaste (în prezența ATR) nu a indicat nici un fel de influență inhibitoare a AFM asupra acestei transformări.

Exemplul 6

Conform acestui exemplu, componentele active inhibitoare de enzime au fost adăugate în hrana pentru șoarecii purtători de tumori, în timp ce în hrana altor șoareci, de control, nu s-a adăugat nici un fel de preparat. După aceea șoarecii au fost sacrificați și li s-au extras rinichii, intestinalele, glandele suprarenale, ficatul și tumorile, care au fost supuse analizei în vederea conținutului de Proto IX. S-au utilizat următorii compuși activi inhibitori de enzime:





În special, probele s-au efectuat asupra șoarecilor liniei DBA/2Ha, cărora în ziua zero în umărul drept li s-a introdus subcutanat preparatul tumoral SMT-F prin injectare. În continuare, în prima zi șoarecii au primit o hrană specială pentru rozătoare: Purina Rodent Chow 5001 Mash fără adaosuri. Din ziua a doua până la a zecea zi șoarecii au primit aceeași hrană, dar cu adaos de compus activ inhibitor de enzime de încercare în cantitate de 2 promile (animalele de control primeau aceeași hrană, dar fără adaosuri). Adaosul a fost introdus în hrană prin amestecarea cu o mică cantitate de soluție de compus activ de încercare în acetonă. Mai departe, în ziua a zecea șoarecii au fost sacrificați, cu excepția șoarecelui tratat cu compus activ marcat ca 6j: acest șoarece a fost sacrificat în ziua a șaptea. Țesuturile șoarecilor au fost lăsate pe noapte să se răcească la 4°C, apoi s-a înlăturat umezeala cu hârtie absorbantă și a fost determinată masa fiecărei mostre de țesut. În continuare din țesuturi s-a preparat o suspensie omogenă în 5 ml (în cazul intestinelor și ficatului 10 ml) de amestec de acetonă și 0,1 ml de HNH_4OH , luate în raport volumetric de 9:1. Preparatele omogene au fost supuse centrifugării la 1500 g și substanțele ieșite la suprafață au fost supuse analizei la spectrofluorometrul SPEX FA 112. Pentru Proto IX optime sunt excitarea la 400 nm și emisiunea la lungimea de undă de 630 nm. Acumularea de Proto IX se determină după numărul de scintilații fluorescente pe secundă la 1 g de țesut. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3 (pentru fiecare preparat valorile sunt medii pentru o pereche de șoareci, cu excepția încercărilor cu utilizarea compușilor activi 6f, 6h, 6i și 6j, când pentru probe s-a luat doar un șoarece).

Tabelul 3

Numărul de scintilații fluorescente ($\times 10^3 \times \text{s}^{-1}$) la 1 g de țesut pentru preparatul Proto IX

Compusul activ	Tumoarea	Ficatul	Rinichii	Glande-le supra-renale	Intes-tinul	Masa tumorii care a reacționat la acțiune, mg
6a	1203	4291	10817	6572	5870**	143
6b	1520	1261	2441	2529	5577**	90
6c	14336	2739	16186	13790	9937**	157
6d	2006	1581	12865	443	5565**	294
6e	837	876	915	1331	2069**	165
6f	449	1170	661	5611	1157	69
6g	166	803	606	1984	466	250
6h	298	914	585	2259	584	192
6i	932	1510	4014	36940	3454	20
6j	1251	538	315	491	572	11
Control	239	536	494	1504	233	200
De control					424**	

Note: *Datele din tabel se citesc cu coeficientul $\times 10$.

**Măsurările s-au făcut pe mostrele dizolvate în 3 părți de acetonă cu proprietăți de bază la o parte de mostră.

Datele numerice indicate în tabelul 4 corespund concentrațiilor de Proto IX în țesuturile respective. Unitatea de măsură este ultragramul (ug) de Proto IX la 1 g de țesut.

Compusul activ	Tumoarea	Ficatul	Rinichii	Glandele suprarenale	Intestinul
6a	11	39	99	60	54
6b	14	12	22	23	51
6c	131	25	148	126	91
6d	18	14	117	4	51
6e	8	8	8	12	19
6f	4	11	6	51	11
6g	2	7	6	18	4
6h	3	8	5	21	5
6i	9	14	37	337	32
6j	11	5	3	4	5
Control	2	5	5	14	2

Mai sus este dată valoarea 3,6 ug/g pentru concentrația porfirinei în tumoarea de același tip SMT-F după o injecție de 10 mg/kg de hematoporfirină șoarecilor din aceeași linie DBA/2Ha. Este cunoscut că în cazul tumorilor de tip CH/Tif concentrația porfirinei de aproximativ 12 ug/g, administrată printr-o injecție în cavitatea abdominală șoarecilor din linia DBA/H2 de fotofrin II (Photofrin II) în cantitate de 25 mg/kg, este utilizată pe larg pentru atribuirea sensibilității la lumină în cazul tratamentului fotodinamic și la diagnosticarea bolilor canceroase.

Șoarecilor li se dădea următoarea cantitate sumară de alimente cu conținut de compus activ: 6a) 22 și 35 g; 6b) 37 și 35 g; 6c) 25 și 22 g; 6d) 41 și 32 g; 6e) 40 și 44 g; 6f) 27 g; 6g) 33 și 40 g; 6h) 36 g; 6i) 10 g; 6j) 20 g.

La efectuarea experiențelor descrise în Exemplul 6 asupra animalelor, care nu erau purtătoare de tumori, se efectuau operațiunile în următoarea consecutivitate cu utilizarea (dacă nu este indicat altceva) compusului activ care în acest exemplu este marcat cu 6c.

a) Ca urmare a stabilirii indicelui LD_{50} al compusului activ, el s-a dovedit a fi mai mare de 2600 mg/kg (adică 1 mg de compus activ la 1 kg de masă a corpului) pentru șobolani, atunci când acest indicator se determina peste 14 zile după ce animalele au mâncat o singură dată o porție de ulei de porumb ce conținea 15% de compus activ, și peste 700 mg/kg pentru șoareci, atunci când indicatorul dat se determina peste 14 zile după ce animalele au mâncat o singură dată o porție de ulei de porumb ce conținea 5% de compus activ.

b) În cazul încercării compozițiilor pentru injecții în cavitatea abdominală, care nu conțineau compusul activ, a fost constatată capacitatea șoarecilor de a suporta injecții la doza de 0,5 ml de amestec de părți egale ale dimetilsulfoxidului și apei.

c) În cazul încercărilor compusului activ, introdus prin injecție în cavitatea abdominală în componența amestecului ce conținea 60% de ulei de porumb și 40% de dimetilsulfoxid, s-a stabilit că șoarecii pot suporta o doză de 100 mg/kg.

d) Asupra șoarecilor s-au efectuat următoarele experiențe:

1) Hrănirea zilnică cu o doză de 50 mg/kg (utilizând soluție cu concentrația de 1% a compusului activ în acetonă) timp de 8 zile;

2) Injecția zilnică a unei doze de 50 mg/kg în cavitatea abdominală timp de 8 zile, cu utilizarea unei dispersii de 1% a compusului activ în ulei mineral, pregătită prin dizolvarea compusului activ într-o picătură de dimetilsulfoxid și prin amestecarea soluției obținute cu ulei mineral;

3) Aplicarea locală zilnică a unei doze de 50 mg/kg pe piele timp de 8 zile cu utilizarea unei soluții de 1% în dimetilsulfoxid;

4) Hrănirea timp de 8 zile cu hrană standard cu adaos de 2 promile de compus activ din masa hranei;

5) Injecția zilnică intravenoasă a unei doze de 50 mg/kg timp de 4 zile, cu utilizarea unei soluții de 2% în dimetilsulfoxid.

Apoi șoarecii luați pentru experiențe au fost sacrificați și s-a determinat acumularea de Proto IX în țesuturile lor.

În altă experiență un șobolan mascul din linia Fisher 344 a fost hrănit timp de 24 de zile cu hrană conținând 5 promile de compus activ 6c, apoi animalul a fost sacrificat. În țesuturile acestui șobolan s-a constatat creșterea nivelului de Proto IX în comparație cu animalul de control, o creștere semnificativă a acestor niveluri fiind observată în țesuturile rinichiului, intestinelor, stomacului și encefalului, în timp ce în țesuturile musculare s-a observat doar o mică creștere a nivelului.

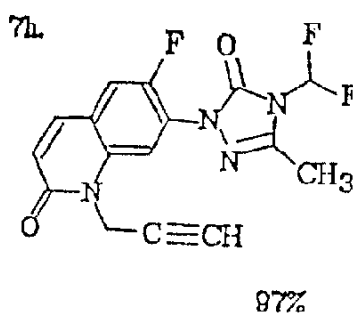
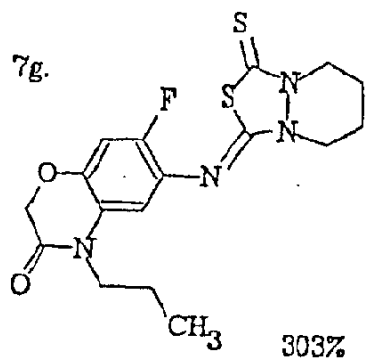
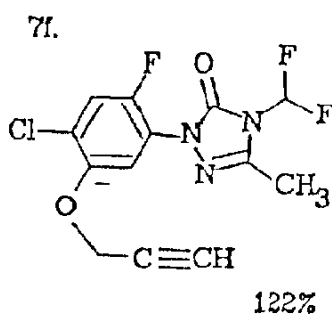
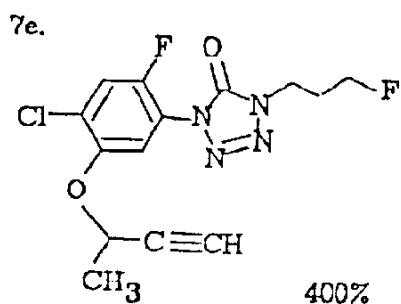
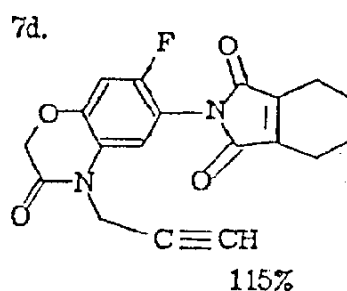
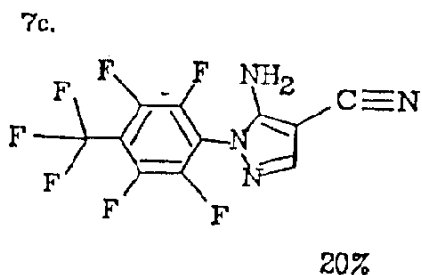
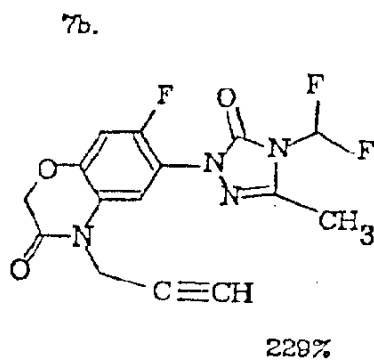
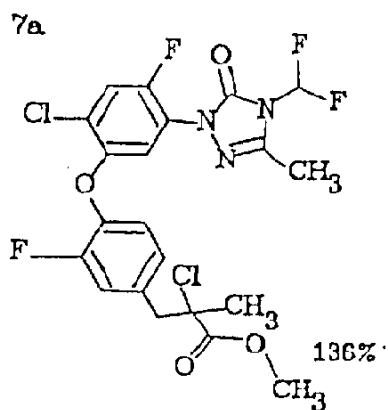
În timpul executării experiențelor descrise asupra șobolanilor și șoarecilor animalele au fost ținute într-un regim standard de iluminare: 12 ore de lumină și 12 ore de întuneric.

Exemplul 7

În timpul executării seriei de experiențe conform Exemplelor 1 și 2 culturile celulare HeLa au fost incubate în prezența compușilor activi medicinali enumerați mai jos cu concentrația de 100 uM. Indicii în % prezentați după fiecare marcă a compusului activ medicinal indică mărirea cantității de Proto IX care se formează în prezența acestui compus activ medicinal în raport cu aceeași cantitate care se formează în mostra de control în aceeași experiență.

Compușii activi utilizați din Exemplul 6 au arătat următoarele valori:

6a) 337%; 6b) 366%; 6c) 297%; 6d) 1200%; 6e) 1210%; 6f) 280%; 6g) 326%; 6h) 431%; 6i) 544%; 6j) 469%; formulele altor compuși activi și valorile procentuale corespunzătoare pentru ele sunt date mai jos.



Exemplul 8

În acest exemplu compusul activ inhibitor de enzime 6c din Exemplul 6 li s-a dat ca hrană șobolanilor vaccinați de tumori, după ce zona tumorală s-a iradiat cu lumină, provocând astfel resorbția tumorii.

În particular, pentru trei șobolani din linia Sprague-Dawley cu masa medie a câte 120 g s-a prescris, pe o perioadă de 6 zile, o rație alimentară cu adaos de 2 promile compus activ. În ziua a treia pe extremitatea posterioară dreaptă a fiecărui șobolan s-a implantat un condrosarcom prin injectarea a 0,3 ml de suspensie de celule tumorale (1 milion de celule tumorale). În ziua a șasea extremitatea posterioară dreaptă a fiecărui șobolan s-a ras pentru înlăturarea învelișului părș și s-au măsurat dimensiunile fiecărei tumori. În continuare, partea afectată de tumoare și pielea din jurul acesteia s-a iradiat cu doze de lumină fără căldură cu lungimea de undă de 630 nm la o densitate a fluxului de energie de 270 J/cm². În ziua următoare s-a constatat că doi șobolani s-au debarșat în mare măsură de tumori (adică masa tumorii nu mai era palpabilă), iar la al treilea șobolan a avut loc resorbția aproape completă a tumorii. Pielea și țesutul muscular din jurul tumorii la toți șobolanii s-au înălbit puțin și păreau umflașe, dar într-o măsură considerabil mai mică decât în cazul terapiei fotodinamice cu utilizarea preparatului Photofrin II.

Încercarea în vederea determinării indicatorului procentual al spălării

Pe parcursul încercării în vederea determinării indicatorului procentual al spălării s-au utilizat cotiledoane, adunate din răsadul de castraveți crescut la întuneric. În stadiul întâi masa de cotiledoane a fost tratată în întuneric cu soluție apoasă (în prezența compusului-tampon), conținând zahăr cu atomi radioactivi marcați. În continuare s-a măsurat cantitatea de zahăr asimilată de cotiledoane după metoda de calcul descrisă mai jos. După aceasta întreaga masă de cotiledoane a fost împărțită în două. Una din aceste părți a fost tratată la întuneric cu soluție apoasă (în prezența compusului-tampon), care conținea compusul de încercare, iar cealaltă parte a fost tratată tot la întuneric și cu aceeași soluție, dar fără compusul de încercare (proba de control). Cotiledoanele înmuiate în soluțiile apoase indicate au fost, în continuare, iradiate cu lumină timp de 16 ore, apoi au fost separate de soluțiile apoase, în care, prin metoda măsurării și calculării, s-a determinat conținutul de substanță cu atomi radioactivi marcați. Rezultatele obținute au fost apoi prezentate sub formă de indicator procentual de spălare (I.P.S.), calculat după formula:

$$I.P.S. = (S_t - S_c) / S_c$$

În care S_t , S_c și S_0 reprezintă, respectiv, cantitățile de dezagregare (la un cotiledon) a substanței cu atomi radioactivi marcați: a) în această substanță, asimilată de cotiledoane în timpul tratării primare a acestora, b) în soluția apoasă ce conține compusul de încercare după ce a fost iradiat cu lumină și c) în soluția apoasă de control, după iradiere cu lumină.

Mai detaliat materialele utilizate, precum și condițiile de efectuare a încercărilor în vederea determinării indicatorului procentual de spălare sunt caracterizate mai jos.

Materialul vegetativ

În vermiculitul umezit cu îngrășământul comercial 9-45-15, au fost cultivate semințe de castraveți *Cocumis salivus L.*, soiul Wisconsin SMR 18, din care într-o cameră de incubare la 25°C și la umiditatea relativă a aerului de 80-90% a fost crescut, în întuneric, răsadul. Peste 5 zile de la momentul însămânțării de sub colții palizi ai rásadului crescuți la întuneric s-au strâns cotiledoanele și s-au spălat în 1,0 mM soluție de $CaCl_2$. Toate aceste operațiuni s-au executat la lumină verde.

Soluția-tampon

Soluția conține 1 mM KCl, 1 mM de $CaCl_2$, 2,0 mM de fosfat de potasiu și este reglată până la pH egal cu 6,5 (ca și în cazul utilizării NaOH).

Zahărul cu atomi radioactivi marcați

Acest fel de zahăr reprezintă 3-O-metil-3-(U- ^{14}C)-glucoză cu o activitate specifică de 10,9 GBk/mM.

Prelucrarea primară

180-230 de bucăți de cotiledoane spălate s-au introdus într-un balon Erlenmayer cu gura largă, cu capacitatea de 250 ml cu dop din poliuretan spongios, care conține 50 ml de soluție-tampon, în care s-a mai adăugat și zahăr cu atomi radioactivi marcați într-o cantitate care asigură concentrația lui în soluție egală cu 600 nM. Retorta a fost supusă scuturării la întuneric într-un dispozitiv rotativ timp de 24 ore la 125 min^{-1} . După aceea cotiledoanele au fost scoase pe o sită din neilon și au fost supuse unei spălări triple cu porțiuni de soluție de 1 mM $CaCl_2$ a câte 20 ml fiecare. Asimilarea zahărului cu atomi radioactivi marcați s-a determinat dizolvând 3 mostre a câte 5 bucăți de cotiledoane fiecare în dizolvant de țesuturi (marca NCS, produs al firmei "Amersham Corp.") și s-a calculat epuizarea totală la spectrometrul de scintilație în lichid.

S-a stabilit că aceste experiențe în vederea epuizării sunt echivalente cu determinarea analogică realizată prin arderea probelor selectate de cotiledoane în autooxidant.

Prelucrarea cu utilizarea compusului de încercare, precum și tratarea de control

Cinci bucăți de cotiledoane au fost lăsate să plutească cu partea neaxială în sus pe suprafața soluției-tampon, turnate în cantitate de 3 ml într-o cutie Petri din masă plastică cu diametrul de 35 mm și capac. Apoi în ea s-a introdus compusul de încercare (sub formă de soluția lui în acetonă) în cantitatea care asigură concentrația dată (despre care s-a vorbit mai sus) a compusului de încercare în soluția-tampon. Conținutul de acetonă în soluția-tampon constituia 0,1% (parte de volum) atât în proba de control, cât și în soluția ce conținea compusul de încercare. În continuare cotiledoanele care pluteau au efectuat timp de 16 ore o mișcare de rotație într-un vârtej care s-a format ca rezultat al scuturării cutiilor cu o frecvență de 90 min^{-1} pe suprafața dispozitivului de scuturare.

Iradierea cu lumină

Cutiile Petri cu cotiledoanele plutind pe suprafața soluțiilor au fost iradiate timp de 16 ore cu lumina a patru lămpi fluorescente GE F20T12-CW la o intensitate programată de 150 $\mu E/m^2s$ în partea spectrală a fotosintezei (PSFS), intensitatea menționată fiind măsurată la suprafața cotiledoanelor, în timp ce cutiile erau supuse continuu scuturării.

Măsurarea cantității de substanță cu atomi radioactivi marcați care se află în lichid

Tot lichidul s-a separat de cotiledoane și după aceea s-a determinat numărul de dezagregări la spectrometrul scintilației de lichid.

Întunericul

Toate tipurile de tratare de până la stadiul de iradiere cu lumină s-au efectuat în întuneric sau la lumina verde a sursei fluorescente, adică la lumina trecută printr-un filtru de lumină verde din masă plastică, dispersant de lumină, care lasă să treacă doar lumina cu lungimea de undă de 450-600 nm.

Anexa B

Tabelul 5

Mediu pentru culturi

Mediu M

Săruri

Moli

Concentrat

ml de
concentrat la 1 l

Citrat	Urme de metale	Vezi mai jos	
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1,2x10 ⁻³ M	10%	3
NH ₄ NO ₃	3,7x10 ⁻³ M	10%	3
KH ₂ PO ₄	2,2x10 ⁻³ M	10%	3
K ₂ HPO ₄	1,7x10 ⁻³ M	10%	3

Concentratul amestecului ce conține urme de metal

H ₃ BO ₃	100 mg/l
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	100 mg/l
MnSO ₄ × 4H ₂ O	40 mg/l
COCl ₂ × 6H ₂ O	20 mg/l
NaMoO ₄ × 2H ₂ O	20 mg/l
CuSO ₄	4 mg/l

Mediul A pentru culturi a fost pregătit adăugând la mediul M soluție hidrică de acetat de sodiu cu concentrația de 7,5x10⁻³ M în cantitate de 10 ml/l.

Toate componentele s-au introdus în apă distilată în ordinea indicată mai sus, după ce s-a realizat tratarea lor în autoclavă sub presiunea de 15 funți/ol² timp de 15 min.

Rezervă de preparat conservat pentru creșterea culturilor sub acțiunea luminii

Culturile celulare u-1 conservate s-au transferat ascenic în culturi lichide în mediu A sau M, de preferință în mediul A, în baloane Erlenmayer închise cu dopuri din poliuretan, la 25°C în condițiile următorului ciclu: 14 ore de iluminare și 10 ore de întuneric. Culturile conservate au fost supuse incubării (fără aerare suplimentară) la dispozitive de rotire-scurtare, care funcționează la o frecvență de 125 min⁻¹. Intensitatea iluminării la nivelul stratului de cultură constituia 120 μE/m²s (PSFS). În aceste condiții culturile sunt într-un regim de creștere semisincronă până când vor trece în faza staționară ce conține (2-4)x10⁶ celule în 1 ml.

Creșterea culturilor în lipsa luminii (culturi crescute la întuneric)

Celulele aflate în faza staționară de cultivare din cultura conservată, crescute la lumină în cantitate de 7,5 ml, s-au transferat într-un balon Erlenmayer, ce conținea 750 ml de mediu A. Celulele au fost supuse incubării în întuneric la aerare printr-un tub adâncit de aerare la temperatura de 25°C timp de 3-4 zile. Pe parcursul acestui timp cultura celulară u-1 trebuia să suporte 7-8 diviziuni celulare, pierzând toată clorofila vizibilă, la concentrația celulelor de (2-3)x10⁶ buc./ml.

Pregătirea celulelor pentru utilizare în încercările de probă

Celulele s-au luat dintr-o cultură proaspăt pregătită în cantitate de 750 ml, crescută la întuneric, prin centrifugare la rotații mici (în jur de 2000 min⁻¹) la 20°C în decurs de aproximativ 5 min. Aceste celule au fost din nou transferate, cu grijă, în stare de suspensie în 50 ml de mediu A. În proba acestei suspensii (circa 0,25 ml) s-a determinat mobilitatea celulelor, iar după fixare cu soluție apoasă având concentrația de 1% de gluteraldehidă se numărau celulele din 1 ml. De regulă, numărul de celule este de 5x10⁷ buc./ml. Porțiunile de cultură celulară a câte 1 ml ce conțin câte 10⁷ celule s-au pus în vase experimentale, de exemplu, în talgere falconice cu 24 de alveole predestinate culturilor celulare. În acest stadiu celulele sunt foarte mobile și colorate în galben.

Compusul experimental s-a dizolvat într-un solvent respectiv, de exemplu, în acetonă, alcool etilic, dimetilsulfoxid sau în apă (de preferință în acetonă) pentru asigurarea concentrației de 1000 de ori mai mari decât cea finală. În fiecare pereche de alveole cu ajutorul unei microseringi cu capacitatea de 5 sau 10 μl s-a introdus câte 1 μl de această soluție de încercare. Pe fiecare talger pentru culturi celulare s-au pregătit 4 alveole de control analogice cu cele descrise mai sus, dar fără compusul de încercare. Talgerele pentru culturi celulare s-au acoperit cu capace transparente de masă plastică și s-au plasat pentru 13-16 ore în camera de creștere la temperatura de 25°C și intensitatea iluminării de 70-90 μE/m²s. Dacă conținutul alveolelor de încercare s-a îngălbenit, el se scoate în modul descris în pct. "Estimarea rezultatelor". Dacă însă conținutul alveolelor de încercare s-a dovedit a fi străveziu sau verde-pal, înainte de a fi scos el se plasează în dispozitivul de rotire-scurtare, care funcționează cu frecvența de 125 min⁻¹, și timp de 2 ore se iradiază cu lumină având intensitatea de circa 600 μE/m²s.

Estimarea rezultatelor

În fiecare alveolă de încercare s-au introdus câte 250 μl de soluție apoasă de dodecilsulfat de sodiu cu concentrația de 10% și 1 ml de alcool metilic, apoi conținutul alveolei s-a amestecat intens. Amestecurile obținute s-au ținut la întuneric timp de 3-4 ore. Talgerele cu culturile celulare s-au supus centrifugării la turație joasă (circa 2000 min⁻¹) la temperatura de cameră în decurs de 5 min. Soluția ieșită la suprafață s-a luat și s-a analizat la spectrofotometrul "Beckman", modelul 35, în intervalul lungimilor de undă de 350-500 nm (pentru depistarea protoporfirinei IX, pentru care în sistemul cu dizolvantul menționat este caracteristic maximul absorbției de clorofilă la 668 nm), precum și la 720 nm pentru a folosi indicația de fond a tulburării.

Analiza datelor

Pentru fiecare alveolă prin scăderea valorii la 720 nm din valoarea la 668 nm s-a obținut indicatorul înverzirii. Valorile respective sunt medii pentru fiecare concentrație a compusului de încercare, precum și pentru proba de control. Indicatorul procentual al inhibării se află după formula: $Q \text{ \& } 100x(1-k)$, în care k reprezintă raportul dintre valoarea medie a indicatorului înverzirii pentru concentrația concretă dată și valoarea medie a indicatorului înverzirii probei de control.