

Descriere:

Invenția se referă la medicina umană și veterinară, în special, la substanțele biologic active imunomodulatoare.

Sunt cunoscute unele substanțe chimice care posedă acțiune antivirală și imunomodulatoare [1].

La moment numărul substanțelor chimice ce vor îmbina în același timp activitatea antivirală și imunomodulatoare este foarte redus. În practica medicală din această grupă se utilizează interferonul [2]. Dar aplicarea largă a acestei substanțe chimice este limitată din motivele prețului ridicat (o probă de interferon cu activitatea de 1000000 UI costă până la 5,0 \$ US).

Problema invenției constă în extinderea spectrului de substanțe biologic active cu acțiune imunomodulatoare.

Problema se rezolvă în urma utilizării 5a-furostan-3b, 22, 26-triol-3-[O-b-galactopiranozil(1®2)-b-D-gluco-piranozil(1®4)-b-D-galactopiranozil]-26-O-b-D-gluco-piranozil- saponinei furostanolice din semințe de tomate.

Este cunoscută aplicarea 5a-furostan-3b, 22, 26-triol-3-[O-b-galactopiranozil(1®2)-b-D-gluco-piranozil(1®4)-b-D-galactopiranozil]-26-O-b-D-gluco-piranozidului - EKOSTIM în calitate de imunizator al plantelor de tutun [3].

Această substanță a fost obținută în urma unei extracții speciale din semințe de tomate [4].

Preparatul este de proveniență naturală, ieftin și larg accesibil, deoarece este extras din semințe de tomate. El manifestă acțiune atât imunomodulatoare, cât și antivirală.

Exemple de realizare a invenției.

Activitatea saponinei furostanolice a fost apreciată în următoarele teste *in vitro*:

Exemplul 1.

Studierea acțiunii de stimulare a răspunsului proliferativ al limfocitelor în reacția de transformare blastică a limfocitelor T.

În acest scop limfocitele $0,25-0,5 \cdot 10^6$ celule/ml au fost incubate în 1 ml de mediu 199, ce conține 10% ser de grupa AB și 5 μ g de Fitohemaglutinină-P (Difco). În prealabil în tuburi erau introduse probe din substanța examinată în concentrație de la 0,01 până la 100,0 μ g/ml. Răspunsul proliferativ era apreciat peste 72 ore. Cu 4 ore înainte de expirarea termenului de cultivare celulele au fost marcate cu timidină tritiată ($^3\text{H-Td}$) în concentrație de 0,004 MBq. Radioactivitatea a fost apreciată la contorul pentru citirea dezintegreărilor β de felul MARK-2. Rezultatele au fost exprimate în indicele de stimulare, determinat după formula:

$$IS = \frac{\text{nr. impulsuri / min } \ln \text{ culturi experimentale}}{\text{nr. impulsuri / min } \ln \text{ culturi - martor}}$$

Exemplul 2.

Evidențierea și aprecierea acțiunii tomatozidului asupra killerilor spontani (NK).

Experiențele s-au efectuat pe linia celulară continuă mieloidă K_{562} umană, considerată cea mai sensibilă în testul citotoxic. Celulele testate la activitatea celulelor NK au fost obținute de la donatori sănătoși. Testul citotoxic a fost efectuat după procedeul tradițional [5]. Eliberarea specifică a ^{51}Cr din celulele-țintă s-a efectuat la un aparat care detectează radiațiile γ ale radioactivității din supernatant, exprimată ca număr de impulsuri. Eliberarea spontană a ^{51}Cr din mediu constituia 31%.

Exemplul 3.

Evidențierea și aprecierea activității antioxidantului de natură vegetală asupra generației de T-limfocite supresoare induse de Conavalina A. (Con A).

Limfocitele donatorului erau supuse incubării într-un ml mediu RPMI₁₆₄₀ în lipsa (martor 1-supresori spontani) sau în prezența a 60 μ g/ml Con A (martor II-T-supresori induși) timp de 48 ore la temperatura de 37°C. Apoi celulele erau tratate cu mitomicină C, pentru inhibarea sintezei ADN-ului. La $0,5 \cdot 10^6$ celule incubate cu Con A sau fără s-au

adăugat $0,5 \cdot 10^6$ limfocite alogene (celule-test) și 5 μ g/ml PHA, cu incubare ulterioară timp de 72 ore. ^3H -timidina era introdusă cu 4 ore înainte de terminarea cultivării. Rezultatele au fost apreciate după formula:

$$\frac{P}{K} \times 100\%$$

în care P este numărul impulsurilor/min în culturile cu Con A, K este numărul impulsurilor/min în culturile fără Con A. Substanța examinată a fost introdusă în mediile cu Con A în doze de 0,1; 1,0; 10,0 și 100,0 μ g/ml și incubată timp de 48 ore la temperatura de 37°C pentru aprecierea acțiunii antioxidantului asupra generației de limfocite T-supresoare, induse de Con A.

Toate experiențele au fost repetate în 3-5 serii paralele.

În urma studierii acțiunii de stimulare a răspunsului proliferativ la limfocite s-a determinat, că acțiunea imunomodulatoare a unor reprezentanți de substanțe biologice active din clasa glicozidelor steroide depinde direct de concentrația lor, determinând supresiunea sau stimularea proliferației limfocitelor în urma stimulării mitogene cu PHA (Tabelul 1).

Tabelul 1
Influența asupra blastotransformării limfocitelor, indusă de PHA (fitohemaglutinină)

Preparatele	Doza în $\mu\text{g/ml}$	Includerea ^3H -timidinei imp/min	Indicele de stimulare	Efectul
Controlul limfocitelor induse spontan (în lipsa PHA) $2,5 \cdot 10^5$ CMN (celule mononucleare)		505		
Controlul limfocitelor stimulate cu PHA ($2,5 \cdot 10^5 + 5 \mu\text{g/ml}$ PHA)		5716	11	
Saponină furostanolică	0,01	9311	18	Stimulare Stimulare/ lipsa efectului Supresiune Supresiune Inhibiție totală
	0,1	6496	13	
	1,0	3225	7	
	10,0	3268	7	
	100,0	677	0-1	
Ciclosporin-A	0,1	804	1,5	Inhibiție Inhibiție totală Inhibiție totală
	1,0	460	0	
	10,0	488	0	

Astfel, rezultatele obținute demonstrează, că proba de substanță biologic activă saponină furostanolică stimulează răspunsul proliferativ al limfocitelor *in vitro* numai în doza de 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Este necesar de menționat, că saponina furostanolică în concentrație de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ nu are nici un efect asupra imunogenezei, pe când în doză mai mare preparatul provoacă supresiunea răspunsului proliferativ al limfocitelor induse de PHA până la inhibarea totală a reacției. La rândul său, ciclosporina, utilizată în calitate de substanță- test cu efect imunosupresiv marcat, în aceleași doze provoacă inhibarea totală a funcțiilor T-limfocitelor.

Apreciind acțiunea saponinei furostanolice de origine vegetală asupra celulelor NK, s-a demonstrat, că nivelul activității acestora în control era de $55 \pm 2\%$. Indicii medii ai activității celulelor NK după tratare cu saponină furostanolică în doze de 0,1; 1,0 și 10,0 $\mu\text{g/ml}$ erau identici cu cei din control. Saponina furostanolică nu posedă efect toxic asupra celulelor-țintă. Liza celulelor K_{562} , tratate cu diferite doze de preparat, nu depășește nivelul lizei spontane (Tabelul 2).

Tabelul 2
Acțiunea asupra killerilor spontani (NK)

Preparatul	Doza $\mu\text{g/ml}$	Activitatea litică, %
Controlul lizei spontane (liza celulelor-truta- K_{562})		31
Controlul (K_{562} +limfocitele donatorului)		55
Saponina furostanolică	0,1	52
	1,0	45
	10,0	54
Ciclosporin-A	0,1	51
	1,0	53

Rezultatele studiului influenței substanței biologice active asupra populației de limfocite în scopul evidențierii acțiunii asupra generației de limfocite T-supresoare sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3
Influența preparatelor asupra limfocitelor T-supresoare, induse de Con A

nr. experi- ențelor	Preparatele și regimul de incubare	Doza $\mu\text{g/ml}$	Includerea ^3H -timidinei	
			imp/min	%
I	$0,5 \cdot 10^6$ CMN 48 ore - 37°C	-	9750 ± 345	80
II	$0,5 \cdot 10^6$ CMN+60 γ /ml Con- A 48 ore - 37°C	-	2516 ± 283	20
III	$0,5 \cdot 10^6$ CMN+60 γ /ml Con A+saponină furo- stanolică 48 ore - 37°C	0,1	380	3
		1,0	330	3
		10,0	500	4
		100,0	550	4
IV	$0,5 \cdot 10^6$ CMN 72 ore - 37°C · celule- test	-	560	4
V	$0,5 \cdot 10^6$ CMN+5 $\mu\text{g/ml}$ PHA 72 ore - 37°C	-	12251	100

Din cele prezentate în tabelul 3 rezultă, că nivelul blastotransformării celulelor-test la introducerea limfocitelor, incubate fără Con A, reprezintă 80% din controlul, stimulat cu PHA, ce era considerată ca 100%, pe contul inducerii T-supresorilor spontani.

Introducerea în sistem-test a celulelor incubate cu Con A a dus la scăderea includerii ³H-timidinei până la 20%, pe contul activității inhibitoare a T-supresorilor induși de Con A. Cultivarea celulelor în prezența saponinei furostanolice și Con A timp de 48 ore, cu introducerea lor după înlăturarea substanțelor biologice active din sistemul-test, a provocat inhibarea blastotransformării limfocitelor practic până la nivel spontan.

Această circumstanță poate fi explicată prin creșterea numărului de limfocite T-supresoare induse de Con A în baza efectului stimulator al substanței studiate asupra generării lor.

Concluzii:

1. Reacția de blastotransformare indusă pe PHA poate servi drept model de activare a T-helperilor. Substanța biologică activă cercetată exercită dependent de doză efect imunomodulator (stimulator sau inhibitor) asupra activității T-helperilor în testul de blastotransformare indusă de PHA.

2. Studiarea acțiunii imunomodulatoare a saponinei furostanolice în diapazonul dozelor de la 0,1 până la 10,0 μg/ml nu influențează activitatea celulelor NK.

3. Substanța examinată posedă efect stimulator asupra generării limfocitelor T-supresoare induse de Con A.

4. Astfel, în cele 3 teste de apreciere a imunității celulare *in vitro* este demonstrată acțiunea imunomodulatoare în dependență de doza antioxidantului natural de origine vegetală din clasa glicozidelor steroide asupra diferitor subpopulații de T-limfocite.