Invenţia se referă la medicină, la imunologia clinică, şi anume la un procedeu de obţinere din materie primă vegetală a unui remediu ce posedă activitate imunomodulatoare.

Este cunoscut procedeul de obţinere a substanţei, ce posedă activitate imunostimulatoare, în conformitate cu care pentru mărirea activităţii produsului finit iarba de *Gentiana Lutea L.* este extrasă cu etanol de 25-40% având raportul materie primă : extract de 1:(13…20), totodată extragerea se efectuează la temperatura de 60-65°C, în decurs de la 1 oră 45 min până la 2 ore 30 min [1]. Utilizarea etanolului în calitate de extragent necesită purificarea ulterioară a produsului finit de el, ceea ce majorează pierderile de timp pentru prepararea lui şi micşorează activitatea stimulatoare.

Este cunoscut de asemenea procedeul de obţinere a unui remediu ce posedă activitate imunostimulatoare pe calea omogenizării colţilor de cartofi, extracţiei cu apă fierbândă în raport de 1:1…1,5 cu răcirea, filtrarea şi centrifugarea ulterioară, aducerea la fierbere, centrifugarea repetată, dializa supernatantului faţă de apă, liofilizarea şi gelfiltrarea pe Sephadex G-200 [2]. Extracţia în apă fierbândă nu necesită înlăturarea etanolului, însă utilizarea colţilor de cartofi în calitate de materie primă vegetală necesită atât extracţie dublă, cât şi purificare triplă (centrifugare dublă şi gelfiltrare) cu utilizarea unui utilaj compus şi costisitor.

Problema pe care o rezolvă invenţia este obţinerea un remediu cu activitate imunomodulatoare înaltă utilizând pentru extracţie utilaj simplu.

Procedeul, conform invenţiei, înlătură dezavantajele menţionate mai sus prin aceea că substanţele active se extrag în procesul fierberii din materie primă vegetal-terapeutică, care include în % de masă: iarbă de coada-şoricelului (*Achillea millefolium)* 5…15, flori de filimică (*Calendula officinalis)* 5…15, frunze de urzică (*Urtica dioica)* - restul, având raportul materie primă vegetal-terapeutică : apă de 1:50. Fierberea se efectuează timp de 2…3 min, apoi extractul obţinut se răceşte până la temperatura de 35…37°C şi se filtrează. Filtratul se diluează cu apă distilată 1:10 respectiv, se filtrează prin caolin, suplimentar se filtrează şi se sterilizează.

Problema pusă este soluţionată datorită faptului că în procedeul de preparare a imunomodulatorului pe calea hidroextracţiei substanţelor active din materie primă vegetal-terapeutică (MPVT) în procesul fierberii cu răcire şi filtrare ulterioară, substanţele active se extrag din MPVT, care include (în % de masă) iarbă de coada-şoricelului (*Achillea millefolium)* 5…15, flori de filimică (*Calendula officinalis)* 5…15, frunze de urzică (*Urtica dioica)* - restul, în raportul materie primă vegetal-terapeutică : apă de 1:50, fierberea se efectuează în decurs de 2-3 min, răcirea până la temperatura de 35-37°C, iar filtratul se diluează cu apă distilată în raport filtrat : apă de 1:10 şi se filtrează prin caolin. Utilizarea în calitate de MPVT a speciilor de plante indicate permite de a efectua extracţia timp de numai 2-3 min folosind utilaj simplu, o cratiţă, în care extractul se şi răceşte. Pentru filtrare sunt utilizate de asemenea filtre simple, de exemplu tifon, etc. Toate acestea fac procedeul mai simplu, necesitând un număr mai mic de operaţii, iar produsul finit având puritate ecologică mai înaltă. Suplimentar utilizarea MPVT în special în raportul menţionat comunică remediului finit activitate de modulare a macrofagilor, proliferare a limfocitelor B şi T, contribuie la procesul de eliminare a reziduurilor.

Utilizarea MPVT ce include iarbă de coada şoricelului *(Achillea millefolium)*, flori de filimică (*Calendula officinalis),* frunze de urzică (*Urtica dioica*) şi alte plante este cunoscută, de exemplu, din amestecul Semnele Zodiacului [Cererea Federaţiei Ruse nr. 92012754/04]. Însă în amestecurile cunoscute plantele menţionate se utilizează conform menirii lor: iarba de coada şoricelului - în calitate de vasodilatator, remediu analgetic, precum şi ca remediu ce normalizează procesele motoare - de secreţie; florile de filimică - în calitate de remedii bactericide şi sedative, precum şi ca remediu ce micşorează excitabilitatea reflexă; frunzele de urzică se folosesc în calitate de remediu hemostatic, tonifiant şi stimulant, iar împreună cu alte plante - având acţiune tonică generală, însă fără activitate imunomodulatoare. Astfel, utilizarea MPVT în ansamblu şi în raportul menţionat mai sus comunică remediului finit alte proprietăţi, neprognozate.

Suplimentar, după sterilizarea extractului este posibilă păstrarea lui de lungă durată, de exemplu, la temperatură scăzută, precum şi înfiolarea lui, iar în consecinţă producerea industrială şi livrarea lui la utilizatori, de exemplu în clinici.

Rezultatul constă în obţinerea unui remediu de modulare a activităţii macrofagilor şi proliferare a limfocitelor B şi T.

Pentru prepararea MPVT este folosit amestecul de plante bine uscate în încăperi bine aerisite, care include flori de filimică (*Calendula officinalis),* iarbă de coada şoricelului *(Achillea millefolium)* şi frunze de urzică (*Urtica dioica*) la un raport al % de masă respectiv de 5…15 : 5…15 : restul.

Pentru obţinerea remediului solicitat cu greutatea de 100 g, de exemplu, se iau 5 g flori de filimică (*Calendula officinalis),* 10 g iarbă de coada şoricelului *(Achillea millefolium)* şi 85 g de frunze de urzică (*Urtica dioica)* şi se introduc în apă distilată fierbândă turnată într-un recipient. Cantitatea de apă este de 5000 ml, ceea ce corespunde raportului MPVT: apă de 1:50. După ce se introduce materia primă vegetal-terapeutică, apa fierbândă se amestecă timp de 2…3 min, până la formarea spumei, apoi încălzirea se întrerupe, recipientul se închide cu un capac şi decoctul se menţine la temperatura camerei până când temperatura lui va coborî până la 35…37°C. Apoi decoctul se filtrează. După aceasta filtratul se diluează cu apă distilată în exemplul dat la un raport filtrat : apă de 1:10, adică peste 5 l de filtrat se toarnă 50 l de apă, se purifică prin adsorbant, de exemplu prin caolin. După purificare extractul se filtrează fin [Diug E., Trigubenco I. Tehnologia medicamentelor în farmacie. Chişinău, Universitas, 1992, p. 126-130]. Totodată filtrarea fină se poate realiza cu ajutorul unui filtru cu membrană "Milipor" [Barbăroşie S., Diug E., Ciobanu N. Tehnologia medicamentelor industriale. Chişinău, Ştiinţa, 1993, p. 617-623]. Apoi extractul se sterilizează, ceea ce

asigură o păstrare îndelungată a acestuia şi face posibilă înfiolarea lui, deci şi producerea industrială şi livrarea la utilizator, de exemplu în clinici.

Remediul obţinut conform procedeului descris reprezintă o soluţie transparentă, incoloră, fără miros şi gust, cu o componentă biologic activă termostabilă, având densitatea de 1,17-1,22, pH 7,0-8,0, pierderea de masă la uscare nu mai mică de 0,13-0,17%. Soluţia nu este toxică.

Activitatea biologică a remediului a fost cercetată în Laboratorul Central de Testare a Medicamentelor (LCTM) de pe lângă Universitatea de Medicină şi Farmacie din Iaşi, precum şi în Spitalul Clinic Republican nr. 1 al Ministerului Sănătăţii din Republica Moldova (secţia de imunologie).

Cercetările în LCTM de pe lângă Universitatea de Medicină şi Farmacie din laşi au fost efectuate pe 36 şobolani albi de ambele sexe cu masa 190-200 g, divizaţi în 3 grupe a câte 12 animale. Primul grup (control alb) primea soluţie salină izotonă în doză zilnică de 5 ml/kg în decurs de 14 zile. Al doilea grup (control pozitiv) primea levamisol în doză de 10 mg/kg în decurs de 14 zile. Al treilea grup (control pozitiv) primea remediu conform invenţiei prezente în doză de 0,25 ml/kg în decurs de 14 zile. Preparatele se administrau *per oral* cu ajutorul sondei gastrice.

S-a determinat acţiunea celor trei substanţe cercetate asupra următorilor parametri ai sistemului imun: capacitatea la fagocitoză a leucocitelor polimorfonucleare (LPMN) ale sângelui periferic şi activitatea complementului din ser. S-a stabilit că atât levamisolul, cât şi remediul conform invenţiei prezente, sporesc nivelul activităţii fagocitare (NTB) aproximativ de două ori, însă remediul solicitat (NTB până la 0,47) este mai activ decât imunostimulatorul bine cunoscut levamisol (NTB până la 0,33).

În Spitalul Clinic Republican nr. 1 al Ministerului Sănătăţii din Republica Moldova au fost supuse analizei 120 mostre luate de la purtătorii de HIV. Drept material pentru cercetări au servit limfocitele izolate din sângele purtătorilor de HIV tranzitorie din secţiile de hepatologie, reumatologie, chirurgie purulentă.

Cercetările imunologice efectuate în scopul determinării limfocitelor T şi B au fost efectuate prin metoda formării de rozete utilizând respectiv eritrocite de berbec [Fondal M., Holm G., Wigzell H. Surface markers on human Tand B-lymphocytes forming immune rosettes with sheep red blood cells. J. Experimental Med., 1972, vol. 136, p. 207-215] şi C3 ale componentei complementului [Оценка иммунологического статуса человека. Методические рекомендации (под редакцией Петрова Р.В., Чередеевой А.Н.). Москва, 1980].

Celulele mononucleare au fost izolate din sângele heparinizat prin centrifugare în gradientul densităţii verografinficolului (d=1.076).

Activitatea stimulatoare a fost apreciată într-un test de sarcină [Оценка иммунологического статуса человека. Методические рекомендации (под редакцией Петрова Р.В., Чередеевой А.Н.). Москва, 1980].

Datele referitoare la acţiunea preparatelor asupra imunităţii celulare T (în %) sunt date în tabelul 1, iar cele referitoare la acţiunea preparatelor asupra imunităţii B (în %) sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 1

Distribuţia mostrelor în raport cu numărul de rozete	Control	Remediul conform invenţiei	Levamisol	Nucleinat de sodiu
58-56		11	66	16
52-50	32	34	20	33
49-42		35	6	33
40-38		16	6	9
<32		4	-	9

Tabelul 2

Distribuţia mostrelor în raport cu numărul de rozete	Control	Remediul conform invenţiei	Levamisol	Nucleinat de sodiu
30-25		58	11.7	23.3
24-20	12	23	16.6	23.3
19-15		17	20	25
<12		2	51.6	28.4

După cum reiese din aceste tabele, remediul conform invenţiei prezente posedă activitate imunomodulatoare atât asupra sectorului imunităţii celulare B, cât şi asupra sectorului imunităţii celulare T, adică este unicul imunomodulator cunoscut care manifestă efect concomitent asupra componentelor B şi T ale imunităţii.

Acţiunea remediului solicitat a fost cercetată în diferite organizaţii terapeutice ale Republicii Moldova şi Federaţiei Ruse.

În Institutul de Cercetări Ştiinţifice de Medicină Profilactică şi Clinică al Ministerului Sănătăţii din Republica Moldova observaţiile au fost efectuate pe 13 bolnavi de tuberculoză cu forme răspândite şi 21 bolnavi cu pneumonii acute şi astm bronşic. Toleranţa preparatului a fost bună la toţi bolnavii. Efecte secundare nu s-au observat.

Datele investigaţiilor pe bolnavii de pneumonie acută au arătat că remediul solicitat în combinaţie cu antibiotice, preparate antibacteriene, remedii simptomatice a favorizat normalizarea datelor subiective în medie în decurs de 2 săptămâni. La momentul externării tusea şi ralurile au dispărut complet la 52 bolnavi, la restul ele erau rare, cu o cantitate mică de spută uşor expectorată.

La toţi bolnavii cu simptome de endobronşită nespecifică la momentul externării tabloul endoscopic era normal. La toţi bolnavii s-a mai observat reducerea numărului de leucocite nucleare segmentate şi mărirea de 1.5-2.0 ori a numărului de limfocite.

La 21 bolnavi cu patologie pulmonară nespecifică s-au efectuat cercetări imunologice în dinamică, precum şi probe de sarcină cu remediu, obţinut conform invenţiei. S-a stabilit că remediul solicitat *in vitro* creşte numărul celulelor B la 11 bolnavi din 21 şi al celulelor T la 5 bolnavi din 21. S-a constatat de asemenea că la bolnavii care reacţionează la remediu se normalizează numărul celulelor B şi starea funcţională a celulelor T.

În toate cazurile de tratament remediul era administrat câte 2.0 ml intramuscular lent, la intervale de 48 ore, 7 injecţii la o cură.

În Clinica Institutului Central de Cercetări Ştiinţifice din Sankt Petersburg remediul solicitat a fost administrat la 12 bolnavi oncologici. Stimularea a fost realizată prin introducerea intramusculară a 2 ml de preparat o dată la 4 zile, 3-4 injecţii în total. Ca rezultat al tratamentului a fost stabilită acţiunea imunomodulatoare a preparatului referitor la următorii parametri:

- majorarea numărului total de leucocite;
- majorarea numărului total de leucocite nucleare segmentate, ameliorarea proprietăţilor lor funcţionale;
- creşterea numărului total de limfocite,
- tendinţa de micşorare a nivelului maselor moleculare medii,
- tendinţa de micşorare a conţinutului complexelor imune circulante.

La Centrul Regional de Profilaxie şi Combatere SIDA din Rostov-pe-Don acţiunea remediului a fost cercetată pe 3 grupe de bolnavi:

prima - copii cu diagnosticul SIDA - 5 persoane;

a doua - adulţi cu diagnosticul SIDA - 2 persoane;

a treia - bolnavi somatici adulţi - 7 persoane.

S-a stabilit că asupra celulelor T ale sistemului imun al copiilor acţiunea era pozitivă în 100% din cazuri; la adulţii cu diagnosticul SIDA - la 50% cazuri şi la bolnavii somatici (bolnavi cardiologici, bolnavi cu stare bronhologică şi stare imunodeficitară) în 83% cazuri.

Lipsa efectului stimulator asupra celulelor T ale sistemului imun la 50% din adulţi cu diagnosticul SIDA se explică prin numărul mic de bolnavi, precum şi prin deteriorarea profundă a imunităţii lor, în timp ce copiii cu diagnosticul SIDA şi bolnavii somatici adulţi posedă o rezervă de posibilităţi compensatorii ale sistemului imun.