



MD 1301 Y 2019.01.31

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **1301** (13) **Y**  
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)  
*G01N 21/33* (2006.01)  
*G01N 33/15* (2006.01)  
*C01B 21/24* (2006.01)(12) BREVET DE INVENȚIE  
DE SCURTĂ DURATĂ

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2018 0036 (22) Data depozit: 2018.04.11	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.01.31, BOPI nr. 1/2019
(71) Solicitanți: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD	
(72) Inventatori: PANTEA Valeriana, MD; COREȚCHI Ianoș, MD; GHINDA Sergiu, MD; GUDUMAC Valentin, MD; TAGADIUC Elena, MD	
(73) Titulari: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD	
(74) Mandatar autorizat: COȘNEANU Elena	

## (54) Metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active

## (57) Rezumat:

1

Invenția se referă la medicină, biochimie și farmacologie, în special la o metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active prin determinarea activității de inhibare a producerii de oxid nitric de către celulele macrofage.

Esența invenției constă în obținerea exudatului peritoneal cu conținut de macrofage peritoneale prin injectarea intraperitoneală unui animal de laborator a soluției de lectină din *Phytolacta americana*, peste 72 ore se obțin celulele, care se spală și se suspendă într-un mediu pentru culturi celulare ce conține suplimentar ser fetal bovin, gentamicină și fluconazol, apoi suspensia se transferă pe o placă cu godeuri și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 2...4 ore, după care celulele non-aderente se înlătură, iar în fiecare godeu a probelor de cercetat se adaugă un mediu pentru culturi celulare ce conține

2

suplimentar ser fetal bovin, gentamicină, fluconazol, lipopolizaharidă, metavanadat de amoniu și diluții diferite ale compușilor cercetați, se pregătesc probele de control și de referință, apoi probele se amestecă și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 24...48 ore, după care se transferă în godeurile plăcii fotometrice supernatant, soluție de HgCl<sub>2</sub>, de clorură de vanadiu și reactivul Griess, se amestecă, se lasă la întuneric la 25°C, timp de 30 min, după care se masoară absorbanta la lungimile de undă de 540 nm și 630 nm, apoi se determină activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric. Activitatea antiinflamatoare a substanțelor biologice active este apreciată în raport cu proba de referință, cu cât este mai mare activitatea de inhibiție a producerii oxidului nitric, cu atât activitatea

MD 1301 Y 2019.01.31

antiinflamatoare a substanțelor biologice active este mai mare.

Revendicări: 1

#### **(54) Method for assessing the anti-inflammatory activity of biologically active substances**

##### **(57) Abstract:**

1

The invention relates to medicine, biochemistry and pharmacology, in particular to a method for assessing the anti-inflammatory activity of biologically active substances by determining the activity of inhibiting the production of nitric oxide by macrophage cells.

Summary of the invention consists in obtaining the peritoneal exudate comprising peritoneal macrophages by intraperitoneally administering to a laboratory animal a solution of lectin from *Phytolacta americana*, after 72 hours cells are obtained, which are washed and suspended in a cell culture medium, additionally comprising fetal bovine serum, gentamicin and fluconazole, then the suspension is transferred to a plate with wells and incubated in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C, for 2...4 hours, after which the non-adherent cells are removed, and in each well in the test samples is added a cell culture medium, additionally comprising fetal bovine serum,

2

gentamicin, fluconazole, lipopolysaccharide, ammonium metavanadate and test compounds in various dilutions, are prepared the control and comparative samples, then the samples are mixed and incubated in the CO<sub>2</sub> incubator at 37°C, for 24...48 hours, after which supernatant, HgCl<sub>2</sub>, vanadium chloride solution and Griss reagent are transferred into the wells of the photometric plate, are mixed, left in the dark at 25°C, for 30 min, after which is measured the optical absorption at a wavelength of 540 nm and 630 nm, then is determined the nitric oxide production inhibiting activity. The anti-inflammatory activity of biologically active substances is assessed in relation to the comparative sample, the greater the nitric oxide production inhibiting activity, the greater the anti-inflammatory activity of biologically active substances.

Claims: 1

#### **(54) Метод оценки противовоспалительной активности биологически активных веществ**

##### **(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к медицине, биохимии и фармакологии, в частности к методу оценки противовоспалительной активности биологически активных веществ путем определения активности ингибирования продуцирования оксида азота макрофагальными клетками.

Сущность изобретения состоит в получении перитонеального экссудата с содержанием перитонеальных макрофагов путем внутривентриального введения лабораторному животному раствора лектина из *Phytolacta americana*, через 72 часа получают клетки, которые промывают и суспензируют в среде для клеточных культур, содержащей дополнительно фетальную бычью сыворотку, гентамицин и флуконазол, затем суспензию переносят на планшет с лунками и инкубируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, в течение 2...4 часов, после чего неадерентные клетки удаляют, а в каждую лунку в исследуемых образцах добавляют среду для клеточных культур, содержащую дополнительно фетальную

2

бычью сыворотку, гентамицин, флуконазол, липополисахарид, метаванадат аммония и исследуемые соединения в различных разведениях, готовят контрольную и сравнительную пробы, затем пробы смешивают и инкубируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С, в течение 24...48 часов, после чего переносят в лунки фотометрического планшета супернатант, раствор HgCl<sub>2</sub>, хлорид ванадия и реагент Грисса, перемешивают, оставляют в темноте при 25°C, в течение 30 мин, после чего измеряют оптическое поглощение при длине волны 540 нм и 630 нм, затем определяют ингибиторную активность продуцирования оксида азота. Противовоспалительную активность биологически активных веществ оценивают в соотношении со сравнительной пробой, чем больше активность ингибирования продуцирования оксида азота, тем больше противовоспалительная активность биологически активных веществ.

П. формулы: 1

**Descriere:****(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la medicină, biochimie și farmacologie, în special la o metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active prin determinarea activității de inhibare a producerii de oxid nitric de către celulele macrofage.

10 In patogenia bolilor inflamatorii un rol important se atribuie oxidului nitric (NO) – molecule de semnalizare care joacă un rol-cheie în patogeneza inflamației. NO este considerat un mediator pro-inflamator puternic care induce inflamația, atunci când este produs în cantități excesive, iar inhibitorii producerii de oxid nitric manifestă un efect antiinflamator curativ semnificativ, prevenind dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare (Guzik T.J., Korb R., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2003 Dec., 54(4), p. 469-87; Ritz B.W., Alexander G.M., Nogusa S., Perreault M.J., Peterlin B.L., Grothusen B.L., Schwartzman R.J. Elevated blood levels of inflammatory monocytes (CD14+CD16+) in patients with complex regional pain syndrome. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011 Apr., 164(1), p. 108-117).

20 Majoritatea medicamentelor cu acțiune antiinflamatoare au limitări datorită efectelor lor adverse, toxice, de aceea sunt necesare cercetări pentru găsirea unor noi medicamente cu efecte puternice antiinflamatorii, dar fără efecte toxice pronunțate. Pentru a examina noi compuși potențiali antiinflamatori sunt necesare metode noi sensibile cu specificitate înaltă disponibile pentru selectarea substanțelor cu proprietăți antiinflamatoare.

25 Sunt cunoscute metodele de apreciere *in vitro* a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active (SBA), care se bazează pe aprecierea gradului de inhibiție a proteinazei sau pe determinarea capacității de inhibiție a denaturării termice a albuminei la concentrații diferite [1].

30 Dezavantajul acestor metode constă în faptul că activitatea antiinflamatoare a SBA se apreciază prin metode indirecte, *in vitro*, fără studierea influenței lor asupra celulelor implicate în procesele inflamatorii, în special, celulelor imunității primare – celulelor macrofagale, fapt ce nu permite de a aprecia obiectiv activitatea antiinflamatoare a SBA testate din cauza specificității și preciziei joase a metodelor indicate.

35 Cea mai apropiată după esență și rezultatul obținut este metoda de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active, care se bazează pe determinarea activității lor de inhibare a producerii de oxid nitric de către macrofagele peritoneale ale animalelor de laborator și care constă în obținerea exudatului peritoneal ce conține celule macrofage după administrarea BCG, spălarea și suspendarea lor ulterioară într-un mediu de cultură, transferarea celulelor pe o placă cu multe godeuri și incubarea într-un incubator cu CO<sub>2</sub>, apoi celulele non-aderente se înlătură prin spălări repetate, iar celulele macrofage aderente se cultivă în mediul de cultură ce conține lipopolizaharide (LPS) cu sau fără compușii testați, ulterior se determină cantitatea de NO sintetizat de către macrofagele peritoneale și se calculează procentul de inhibiție a producerii de NO [2].

40 Dezavantajele acestei metode sunt sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea nesatisfăcătoare a metodei, din aceste considerente metoda propusă nu asigură stimularea suficientă a activității de producere a oxidului nitric de către celulele macrofage. Un alt impediment al metodei constă în aceea că nu asigură determinarea tuturor derivaților oxidului nitric, care se formează la realizarea metodei, deoarece oxidul nitric este un compus instabil, fiind metabolizat în diverși derivați (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, nitrozotoli).

45 Problema pe care o rezolvă invenția constă în optimizarea condițiilor de efectuare a metodei care să asigure stimularea activității de producere a oxidului nitric de către celulele macrofage, fapt ce ar permite mărirea reproductibilității metodei și depistarea mai precisă a activității de inhibiție a producerii de oxid nitric la compușii testați la realizarea metodei. Un alt avantaj al metodei constă în aceea că asigură determinarea NO și a tuturor derivaților oxidului nitric care se formează la realizarea metodei (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, nitrozotolii), ceea ce permite depistarea mai precisă a activității de inhibiție a producerii de oxid nitric.

50 Esența invenției constă în aceea că se obține exudat peritoneal cu conținut de macrofage peritoneale prin injectarea intraperitoneală unui animal de laborator a soluției de lectină din *Phytolacta americana*, peste 72 ore cavitățile abdominale se spală cu o soluție caldă sterilă de tampon fosfat salin cu pH-ul 7,2...7,4 și se colectează celulele exudatului peritoneal, care se centrifughează la 450...500 rot./min, timp de 7...10 min, sedimentul obținut se suspendă într-un mediu pentru culturi celulare ce conține suplimentar 5...10% ser fetal bovin, 8μg/ml gentamicină și

2,5 µg/ml fluconazol, se aduce concentrația macrofagelor până la  $(5,0...10,0) \times 10^5$  macrofage/ml, apoi cultura celulară de macrofage se transferă pe o placă cu godeuri cu concentrația finală de  $(5,0... 10,0) \times 10^4$  macrofage/per godeu și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 2...4 ore, după care celulele non-aderente se înlătură prin spălări repetate cu soluție de tampon fosfat salin cu pH-ul 7,2...7,4, apoi în fiecare godeu al probelor de cercetat se adaugă câte 90 µl de mediu pentru culturi celulare ce conține suplimentar 5...10% ser fetal bovin, 8 µg/ml gentamicină, 2,5 µg/ml fluconazol, 10...15 µg/ml lipopolizaharidă, 4,0...16,0 µmol/ml metavanadat de amoniu și diluțiile compușilor cercetați, probele de control și de referință se montează la fel, având în loc de diluții ale compușilor cercetați o cantitate echivalentă de un diluant și, respectiv, un compus de referință, probele se amestecă și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 24...48 ore, după care se transferă în godeurile plăcii fotometrice câte 75 µl de supernatant, 20 µl de soluție 2,5...5,0 mmol/l de HgCl<sub>2</sub>, 75 µl soluție 45...65 mmol/l de clorură de vanadiu în 1 M HCl și câte 75 µl reactivul Griess, se amestecă, se lasă la întuneric la 25°C, timp de 30 min, după care se masoară absorbanta la lungimile de undă de 540 nm și 630 nm, apoi se determină activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, conform formulei:

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în % =  $[(\text{Abs. } 540 \text{ k} - \text{Abs. } 630 \text{ k}) - (\text{Abs. } 540 \text{ pr} - \text{Abs. } 630 \text{ pr})] / [(\text{Abs. } 540 \text{ k} - \text{Abs. } 630 \text{ k})] \times 100$ , unde:  
 Abs. 540 pr și Abs. 630 pr – absorbanta probelor de cercetat la 540 și, respectiv, 630 nm,  
 Abs. 540 k și Abs. 630 k – absorbanta probelor de control la 540 și, respectiv, 630 nm,  
 totodată activitatea antiinflamatoare a substanțelor biologice active este apreciată în raport cu proba de referință și cu cât este mai mare activitatea de inhibiție a producerii oxidului nitric, cu atât activitatea antiinflamatoare a substanțelor biologice active este mai mare.

La realizarea metodei de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologice active în baza determinării inhibiției producerii de oxid nitric de către macrofagele peritoneale se mărește sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea determinărilor, se micșorează cheltuielile de reagenți, crește productivitatea muncii. Metoda propusă permite de a depista mai precis modificările activității de inhibiție a producerii de oxid nitric la testarea compușilor biologici activi. Un alt avantaj al metodei constă în aceea că asigură determinarea NO și a tuturor derivaților oxidului nitric care se formează la realizarea metodei (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, nitrozotoli), ceea ce permite depistarea mai precisă a activității de inhibiție a producerii de oxid nitric.

Metoda se efectuează în modul următor și constă în obținerea exudatului peritoneal ce conține macrofage peritoneale de la animalele de laborator, atașarea macrofagelor peritoneale la godeurile plăcii pentru culturi celulare, activarea macrofagelor peritoneale și incubarea lor cu compușii biologici activi cercetați, după care se determină activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric. Pentru obținerea exudatului peritoneal ce conține macrofage peritoneale de la animalele de laborator - șobolanii albi, cărora li se injectează intraperitoneal câte 0,6...1,2 µg/g masă corporală lectină din *Phytolacta americana*, dizolvată în 2 ml soluție sterilă de tampon fosfat salin (PBS) cu pH-ul 7,2...7,4, peste 72 ore cavitatea abdominală se spală cu o soluție sterilă de tampon fosfat salin (PBS) cu pH-ul 7,2...7,4, încălzită în prealabil până la 37°C, se colectează celulele exudatului peritoneal într-un tub steril, după care conținutul tubului se centrifughează la 450...500, timp de 7...10 min, supernatantul se aruncă, iar sedimentul obținut se suspendă în mediul pentru culturi celulare (RPMI - 1640, DMEM) ce conține suplimentar 5...10% ser fetal bovin, 8 µg/ml gentamicină și 2,5 µg/ml fluconazol, se numără macrofagele și se aduce concentrația lor până la  $5,0...10,0 \times 10^5$  macrofage/ml de suspensie; apoi, pentru atașarea macrofagelor în godeurile plăcii sterile pentru culturi celulare cu 96 de godeuri se toarnă suspensia de macrofage peritoneale ce conține  $5,0...10,0 \times 10^5$  macrofage/ml până la concentrația finală de  $5,0... 10,0 \times 10^4$  macrofag/per godeu și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 2...4 ore într-o atmosferă de 2,5% CO<sub>2</sub>, după care celulele non-aderente se înlătură prin spălări repetate cu PBS cu pH-ul 7,2...7,4. Pentru activarea macrofagelor peritoneale și incubarea lor cu compușii biologici activi cercetați, în fiecare godeu ce conține celule aderente în probele de cercetat se adaugă câte 0,1 ml de mediu pentru culturi celulare (RPMI - 1640, DMEM) ce conține suplimentar 5...10% ser fetal bovin, 8 µg/ml gentamicină, 2,5 µg/ml fluconazol, 10...15 µg/ml lipopolizaharidă (LPS), 4,0...16,0 µmol/ml metavanadat de amoniu și diluțiile compușilor cercetați cu o anumită concentrație; probele de control se montează la fel, dar în loc de diluții ale compușilor cercetați se toarnă o cantitate echivalentă de diluant (soluție fiziologică, etanol, DMSO etc.), se amestecă și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 24...48 ore într-o atmosferă de 2,5 % CO<sub>2</sub>; după incubare, pentru determinarea activității de inhibiție a producerii de oxid nitric se transferă în godeurile plăcii fotometrice cu 96 de godeuri câte 75 µl de supernatant, se adaugă câte 20 µl de soluție

2,5...5,0 mmol/l de HgCl<sub>2</sub> (concentrația finală de 0,53...1,05 mmol/l), apoi câte 75 μl soluție 45...65 mmol/l de clorură de vanadiu în 1 M HCl (concentrația finală 19,85...28,50 mmol/l) și câte 75 μl reactiv Griess (1% sulfanil-amidă, 0,1% de N-(1-naftil)etilenediamină în 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), se amestecă, se lasă la întuneric la 25°C, timp de 30 min, după care se masoară absorbanta la lungimea de undă de 540 nm și 630 nm (filtrul de referință), apoi se determină activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în %, conform formulei:

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în % = [(Abs. 540 k – Abs. 630 k) - (Abs. 540pr – Abs. 630pr)] / [(Abs. 540 k – Abs. 630 k)] x 100, unde:

Abs. 540 pr și Abs. 630 pr – absorbanta probelor de cercetat la 540 și, respectiv, 630 nm.

Abs. 540 k și Abs. 630 k – absorbanta probelor de control la 540 și, respectiv, 630 nm.

Totodată activitatea antiinflamatoare a substanțelor biologice active este apreciată în raport cu proba de referință, cu cât este mai mare activitatea de inhibiție a producerii oxidului nitric, cu atât și activitatea antiinflamatoare a substanțelor biologice active este mai mare.

Rezultatul tehnic al metodei propuse constă în mărirea specificității, sensibilității, preciziei reproductibilității metodei pentru selectarea compușilor cu acțiune antiinflamatorie în baza determinării activității lor de inhibiție a producerii de oxid nitric. Rezultatul tehnic se obține datorită creării condițiilor ce asigură suplimentar stimularea activității de producere a oxidului nitric de către celulele macrofage și a faptului că metoda propusă asigură determinarea NO și a tuturor derivaților oxidului nitric care se formează la realizarea metodei (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, nitrozotoli).

#### Exemplul 1

Pentru obținerea macrofagilor peritoneali se injectează intraperitoneal *per* șobolan câte 0,6 μg/g masă corporală de lectină din *Phytolacta americana*, dizolvată în 2 ml de soluție de 10 mmol/l tampon fosfat salin, pH 7,2...7,4. Peste 72 ore duiă o anestezie cu izofuran cavitatea abdominală a șobolanului se spală de 2 ori cu 10...15 ml soluție sterilă încălzită până la 37°C de 10 mmol/l tampon fosfat salin (PBS) cu pH-ul 7,2...7,4 se colectează celulele exudatului peritoneal într-un tub steril de 50 ml. Conținutul tubului se centrifughează la 450...500 rot/min, timp de 7 min. Supernatantul se aruncă, iar sedimentul obținut se suspendă în mediul de cultură RPMI - 1640 ce conține 5% ser fetal bovin, 8 μg/ml gentamicină și 2,5 μg/ml fluconazol, se numără macrofagele și se aduce concentrația lor până la 5,0x10<sup>5</sup> macrofage/ml de suspensie; apoi pentru atașarea macrofagelor pe suprafața godeurilor plăcii sterile pentru culturi celulare cu 96 de godeuri se toarnă câte 100 μl de suspensie de macrofage peritoneale ce conține 5,0x10<sup>5</sup> macrofage/ml (concentrația finală fiind de 5,0x10<sup>4</sup> macrofage/*per* godeu) și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 2...4 ore într-o atmosferă de 2,5% CO<sub>2</sub>, după care celulele non-aderente se înlătură prin spălături repetate (cel puțin de 2 ori) cu soluție PBS cu pH-ul 7,2...7,4 încălzită până la 37°C. Apoi pentru activarea macrofagelor peritoneale în fiecare godeu ce conține celule aderente se adaugă câte 90 μl de mediu pentru culturi celulare RPMI-1640, ce conține suplimentar 5% ser fetal bovin, 8 μg/ml gentamicină și 2,5 μg/ml fluconazol, 10 μg/ml lipopolizaharidă (LPS) și 4,0 μmol/ml de metavanadat de amoniu. După aceasta în probele de cercetat se toarnă câte 10 μl diluții ale compusului VPM1 cu concentrația de 1000, 100, 10 mM/l (concentrația finală - 100, 10 și 1,0 mM/l), iar probele de control se montează la fel, dar în loc de soluții ale compusului VPM1 se toarnă o cantitate echivalentă de diluant - 10 μl soluție fiziologică, se amestecă și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 24 ore într-o atmosferă de 2,5% CO<sub>2</sub>. După incubare, pentru determinarea activității de inhibiție a producerii de oxid nitric, se transferă în godeurile plăcii fotometrice cu 96 de godeuri câte 75 μl de supernatant, se adaugă câte 20 μl soluție 2,5 mmol/l de HgCl<sub>2</sub> (concentrația finală de 0,53 mmol/l), se agită 15...20 s, apoi în toate godeurile se toarnă câte 75 μl soluție 45 mmol/l de clorură de vanadiu în 1 M HCl (concentrația finală 19,85 mmol/l) și câte 75 μl reactiv Griess (1% sulfanil-amidă, 0,1% de N-(1-naftil)etilenediamină în 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), se amestecă 15...20 s se lasă la întuneric la 25°C, timp de 30 min, după care se masoară absorbanta la lungimea de undă de 540 nm și 630 nm (filtrul de referință), apoi se determină activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în %, conform formulei:

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în % = [(Abs. 540 k – Abs. 630 k) - (Abs. 540pr – Abs. 630pr)] / [(Abs. 540 k – Abs. 630 k)] x 100, unde:

Abs. 540 pr și Abs. 630 pr – absorbanta probelor de cercetat la 540 și, respectiv, 630 nm.

Abs. 540 k și Abs. 630 k – absorbanta probelor de control la 540 și, respectiv, 630 nm.

La măsurarea absorbanței s-a obținut:

Absorbanța (A) la 540 nm*	Concentrațiile substanței testate VPM1 (μM/l)		
	1,0	10,0	100,0
Abs. probei de cercetat (Abs <sub>pr</sub> )	0,197	0,166	0,134
Abs. probei de control (Abs <sub>k</sub> )	0,254	0,265	0,273
Abs. probei de referință - indometacină	-	-	0,128
Absorbanța (A) la 630 nm*			
Abs. probei de cercetat (Abs <sub>pr</sub> )	0,038	0,044	0,059
Abs. probei de control (Abs <sub>k</sub> )	0,042	0,061	0,077
Abs. probei de referință - indometacină	-	-	0,036

Notă: \*- sunt prezentate valorile medii a 2 determinări paralele ale absorbantei.

Calculul se efectuează conform formulei:

- 5 Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în % = [(Abs. 540 k – Abs. 630 k) - (Abs. 540pr – Abs. 630pr)] / [(Abs. 540 k – Abs. 630 k)] x 100, unde:

Abs. 540 pr și Abs. 630 pr – absorbanta probelor de cercetat la 540 și, respectiv, 630 nm.

Abs. 540 k și Abs. 630 k – absorbanta probelor de control la 540 și, respectiv, 630 nm.

Astfel,

- 10 Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric (pentru concentrația 1,0 μM/l) = [(0,254 - 0,042) - (0,197 - 0,038)] / [(0,254 - 0,042)] x 100 = 25,0%.

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric (pentru concentrația 10,0 μM/l) = [(0,265 - 0,061) - (0,166 - 0,044)] / [(0,265 - 0,061)] x 100 = 40,2%.

- 15 Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric (pentru concentrația 100,0 μM/l) = [(0,273 - 0,077) - (0,134 - 0,059)] / [(0,273 - 0,077)] x 100 = 61,7%.

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric (pentru indometacină concentrația 100,0 μM/l) = [(0,273 - 0,077) - (0,128 - 0,036)] / [(0,273 - 0,077)] x 100 = 53,1%.

La testarea compusului VPM1 s-a stabilit că aceasta posedă o activitate antiinflamatorie moderată, manifestată prin inhibiția moderată a producerii de oxid nitric la diferite concentrații.

- 20 Procentul de inhibiție maximă la concentrația de 100,0 μM/l pentru compusul VPM1 constituie 61,7%, pe când indometacina la concentrația de 100 μM/l a prezentat o inhibiție maximă de 53,1%.

Exemplul 2

- 25 Pentru obținerea macrofagelor peritoneale se injectează intraperitoneal *per* sobolan câte 1,2 μg/g masă corporală de lectină din *Phytolacta americana*, dizolvată în 2 ml soluție de 10 mmol/l tampon fosfat salin, pH 7,2...7,4. Peste 72 ore după o anestezie cu izofuran cavitatea abdominală a șobolanului se spală de 2 ori cu 10...15 ml soluție sterilă încălzită până la 37°C de 10 mmol/l tampon fosfat salin (PBS) cu pH-ul 7,2...7,4 și se colectează celulele exudatului peritoneal într-un tub steril de 50 ml. Conținutul tubului se centrifughează la 450...500 rot./min, timp de 10 min.
- 30 Supernatantul se aruncă, iar sedimentul obținut se suspendă în mediul de cultură DMEM ce conține 10% ser fetal bovin, 8 μg/ml gentamicină și 2,5 μg/ml fluconazol, se numără macrofagele, se aduce concentrația lor până la 10,0x10<sup>5</sup> macrofage/ml de suspensie; după care pentru atașarea macrofagelor în godeurile plăcii sterile pentru culturi celulare se toarnă câte 100 μl suspensie de macrofage peritoneale ce conține 10,0x10<sup>5</sup> macrofage/ml (concentrația finală de 10,0x10<sup>4</sup> macrofage/*per* godeu) și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 4 ore într-o atmosferă de 2,5% CO<sub>2</sub>, după care celulele non-aderente se înlătură prin spălări repetate (cel puțin de 2 ori) cu soluție PBS cu pH-ul 7,2...7,4 încălzită până la 37°C. Apoi pentru activarea macrofagelor peritoneale în fiecare godeu ce conține celule aderente se adaugă câte 90 μl de mediu pentru culturi celulare DMEM, ce conține suplimentar 10% ser fetal bovin, 8 μg/ml gentamicină și
- 40 2,5 μg/ml fluconazol, 15 μg/ml lipopolizaharidă (LPS) și 16,0 μmol/ml metavanadat de amoniu. După aceasta în probele de cercetat se toarnă câte 10 μl diluții în DMSO ale compusului testat VPM2 cu concentrația de 1000,0; 100,0 și 10,0 mM/l (concentrația finală – 100,0; 10,0 și 1,0 mM/l), probele de control se montează la fel, dar în loc de diluții ale compusului VPM2 se toarnă o cantitate echivalentă de diluant - 10 μl DMSO, se amestecă și se incubează în incubatorul cu

# MD 1301 Y 2019.01.31

7

CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 48 ore într-o atmosferă de 2,5% CO<sub>2</sub>. După incubare pentru determinarea activității de inhibiție a producerii de oxid nitric se transferă în godeurile plăcii fotometrice cu 96 de godeuri câte 75 μl de supernatant, se adaugă câte 20 μl soluție 5,0 mmol/l de HgCl<sub>2</sub> (concentrația finală 1,05 mmol/l), se agită 15...20 s, apoi în toate godeurile se toarnă câte 75 μl soluție de 65 mmol/l de clorură de vanadiu în 1 M HCl (concentrația finală 28,50 mmol/l), câte 75 μl reactiv Griess (1% sulfanil-amidă, 0,1% de N-(1-naftil)etilenediamină în 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), se amestecă 15...20 s se lasă la întuneric la 25°C, timp de 30 min, după care se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 540 nm și 630 nm (filtrul de referință), apoi se determină activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în %, conform formulei:

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în % =  $[(\text{Abs. } 540 \text{ k} - \text{Abs. } 630 \text{ k}) - (\text{Abs. } 540 \text{ pr} - \text{Abs. } 630 \text{ pr})] / [(\text{Abs. } 540 \text{ k} - \text{Abs. } 630 \text{ k})] \times 100$ , unde:

Abs. 540 pr și Abs. 630 pr – absorbanta probelor de cercetat la 540 și, respectiv, 630 nm.

Abs. 540 k și Abs. 630 k – absorbanta probelor de control la 540 și, respectiv, 630 nm.

La măsurarea absorbantei s-a obținut:

Absorbanta (A) la 540 nm*	Concentrațiile substanței testate VPM2 (μM/l)		
	1,0	10,0	100,0
Abs. probei de cercetat (Abs <sub>pr</sub> )	0,173	0,108	0,099
Abs. probei de control (Abs <sub>k</sub> )	0,242	0,262	0,284
Abs. probei de referință - indometacină	-	-	0,123
Absorbanta (A) la 630 nm*			
Abs. probei de cercetat (Abs <sub>pr</sub> )	0,048	0,055	0,068
Abs. probei de control (Abs <sub>k</sub> )	0,052	0,064	0,081
Abs. probei de referință - indometacină	-	-	0,032

Notă: \*- sunt prezentate valorile medii a 2 determinări paralele ale absorbantei.

Calculul se efectuează conform formulei:

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în % =  $[(\text{Abs. } 540 \text{ k} - \text{Abs. } 630 \text{ k}) - (\text{Abs. } 540 \text{ pr} - \text{Abs. } 630 \text{ pr})] / [(\text{Abs. } 540 \text{ k} - \text{Abs. } 630 \text{ k})] \times 100$ , unde:

Abs. 540 pr și Abs. 630 pr – absorbanta probelor de cercetat la 540 și, respectiv, 630 nm.

Abs. 540 k și Abs. 630 k – absorbanta probelor de control la 540 și, respectiv, 630 nm.

Astfel,

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric (pentru concentrația 1,0 μM/l) =

$$[(0,242 - 0,052) - (0,173 - 0,048)] / [(0,242 - 0,052)] \times 100 = 34,2\%$$

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric (pentru concentrația 10,0 μM/l) =  $[(0,262 - 0,064) - (0,108 - 0,055)] / [(0,262 - 0,064)] \times 100 = 73,2\%$ .

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric (pentru concentrația 100,0 μM/l) =  $[(0,284 - 0,081) - (0,099 - 0,068)] / [(0,284 - 0,081)] \times 100 = 84,7\%$ .

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric (pentru indometacină concentrația 100,0 μM/l) =  $[(0,284 - 0,081) - (0,123 - 0,032)] / [(0,284 - 0,081)] \times 100 = 55,2\%$ .

La testarea compusului VPM2 s-a stabilit că acesta posedă o activitate antiinflamatorie puternică manifestată prin inhibiția considerabilă a producerii de oxid nitric la diferite concentrații. Procentul de inhibiție maximă la concentrația de 100,0 μM/l pentru compusul VPM2 constituie 84,7%, pe când substanța de referință - indometacina a prezentat o inhibiție maximă de 55,2% la concentrația de 100,0 μM/l. Astfel, cu cât procentul de inhibiție a oxidului nitric este mai mare, cu atât activitatea antiinflamatorie a substanțelor testate este mai înaltă. Analogic exemplurilor de mai sus au fost cercetate și alte concentrații ale soluției de lectină din *Phytolacta americana* (0,4...4,0 μg/g masă corporală), ale soluției de lipopolizaharidă (2,0...20 μg/ml), ale soluției de metavanadat de amoniu (2,0...32,0 μmol/ml); ale soluțiilor de HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> (1,25...20,0 mmol/l) (concentrația finală - 0,26...4,2 mM/l), a soluției de clorură de vanadiu în 1 M HCl (15...100,0 mmol/l) (concentrația finală - 1,76...11,8 mM/l). Pentru obținerea suspensiei de macrofage peritoneale și activarea lor au fost testate mediile de cultură – RPMI - 1640, Eagle, DMEM, suspensia celulară de macrofage peritoneale a fost colectată după 12...120 ore. Experiențele au permis de a stabili limitele concentrației optime a soluției de lectină din *Phytolacta americana* (0,6...1,2 μg/g masă corporală); timpul optim de colectare a suspensiei celulare peritoneale de macrofage - 72 ore; mediile de cultură optimale (RPMI - 1640 și DMEM - Eagle

modificat după Dulbecco); ale concentrațiilor de lipopolizaharidă (LPS) - 10...15 µg/ml, de metavanadat de amoniu - 4,0...16,0 µmol/ml; a soluției de HgCl<sub>2</sub> - 2,5...5,0 mmo1/l (concentrația finală 0,53...1,05 mmo1/l), a soluției de clorură de vanadiu în 1 M HCl - 45,0...65,0 mmo1/l (concentrația finală 19,85...28,50 mmo1/l) pentru obținerea efectului pozitiv. Analizele au fost efectuate în laboratorul biochimie al Universității (în volum de 200 analize), iar rezultatele obținute au permis de a argumenta efectul pozitiv și avantajul metodei propuse față de soluția cea mai apropiată. Metoda propusă permite obținerea macrofagelor peritoneale funcționale cu un grad mai înalt de producere a oxidului nitric și cu eficiență mare de aderare la placă. La folosirea metodei descrise se micșorează timpul de efectuare a analizei de 1,5 ori, se mărește sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea, în comparație cu soluția cea mai apropiată. Aceasta permite de a determina mai precis activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric de către macrofagele peritoneale, care reflectă efectele antiinflamatoare ale substanțelor testate, crește productivitatea muncii și efectul economic. Astfel, metoda propusă asigură stabilirea mai exactă a activității antiinflamatorii a substanțelor biologic active testate, metoda fiind cost-eficientă.

#### (56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Jorge Carlos Ruiz-Ruiz, Angel Jesus Matus-Basto, Pablo Acereto-Escoffie, Maira Rubi Segura-Campos. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28 (6), p. 1424-1437
2. Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 1989, 10, p. 1003-1008

#### (57) Revendicări:

Metodă de apreciere a activității antiinflamatoare a substanțelor biologic active, care constă în aceea că se obține exudat peritoneal cu conținut de macrofage peritoneale prin injectarea intraperitoneală unui animal de laborator a soluției de lectină din *Phytolacta americana*, peste 72 ore cavitatea abdominală se spală cu o soluție caldă sterilă de tampon fosfat salin cu pH-ul 7,2...7,4 și se colectează celulele exudatului peritoneal, care se centrifughează la 450...500 rot./min, timp de 7...10 min, sedimentul obținut se suspendă într-un mediu pentru culturi celulare ce conține suplimentar 5...10% ser fetal bovin, 8µg/ml gentamicină și 2,5 µg/ml fluconazol, se aduce concentrația macrofagelor până la (5,0...10,0)x10<sup>5</sup> macrofage/ml, apoi cultura celulară de macrofage se transferă pe o placă cu godeuri cu concentrația finală de (5,0... 10,0)x10<sup>4</sup> macrofage/per godeu și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 2...4 ore, după care celulele non-aderente se înlătură prin spălări repetate cu soluție de tampon fosfat salin cu pH-ul 7,2...7,4, apoi în fiecare godeu al probelor de cercetat se adaugă câte 90 µl de mediu pentru culturi celulare ce conține suplimentar 5...10% ser fetal bovin, 8 µg/ml gentamicină, 2,5 µg/ml fluconazol, 10...15 µg/ml lipopolizaharidă, 4,0...16,0 µmol/ml metavanadat de amoniu și diluțiile compușilor cercetați, probele de control și de referință se montează la fel, având în loc de diluții ale compușilor cercetați o cantitate echivalentă de un diluant și, respectiv, un compus de referință, probele se amestecă și se incubează în incubatorul cu CO<sub>2</sub> la 37°C, timp de 24...48 ore, după care se transferă în godeurile plăcii fotometrice câte 75 µl de supernatant, 20 µl de soluție 2,5...5,0 mmol/l de HgCl<sub>2</sub>, 75 µl soluție 45...65 mmo1/l de clorură de vanadiu în 1 M HCl și câte 75 µl reactivul Griess, se amestecă, se lasă la întuneric la 25°C, timp de 30 min, după care se masoară absorbanta la lungimile de undă de 540 nm și 630 nm, apoi se determină activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, conform formulei:

Activitatea de inhibiție a producerii de oxid nitric, în % = [(Abs. 540 k – Abs. 630 k) - (Abs. 540pr – Abs. 630pr)] / [(Abs. 540 k – Abs. 630 k)] x 100, unde:

Abs. 540 pr și Abs. 630 pr – absorbanta probelor de cercetat la 540 și, respectiv, 630 nm,

Abs. 540 k și Abs. 630 k – absorbanta probelor de control la 540 și, respectiv, 630 nm,

totodată activitatea antiinflamatoare a substanțelor biologic active este apreciată în raport cu proba de referință și cu cât este mai mare activitatea de inhibiție a producerii oxidului nitric, cu atât activitatea antiinflamatoare a substanțelor biologic active este mai mare.