



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2005 00876**

(22) Data de depozit: **14.10.2005**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.11.2011** BOPI nr. 11/2011

(41) Data publicării cererii:
29.06.2007 BOPI nr. 6/2007

(73) Titular:
• **CIUHRII MIRCEA, STR.TOAMNEI NR.100,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CIUHRII MIRCEA, STR.TOAMNEI NR.100,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 118115 B; RO 119113 B1

(54) **PROCEDEU DE PREPARARE A UNEI COMPOZIȚII
FARMACEUTICE PE BAZĂ DE LYMANTRIA DISPAR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de preparare a unei compoziții farmaceutice pe bază de *Lymantria dispar*, pentru stimularea memoriei omului, în care: se recoltează ouă și pupe de *Lymantria dispar* de pe tulpinile stejarilor afectați, se separă materialul protector din pupe și puf cu un conținut de 383 mg/100 g proteine, 408/100 g Mg și 345 mg/100 g P, se spală de 2...3 ori cu apă distilată, se dispersează timp de 15...20 min în ser fiziologic din 9,0 mg NaCl la 1,0 l apă distilată, se filtrează și se esorează, iar opțional se congelează la temperatura de -15...-20°C, apoi se mărunțește fin, până la 5...10 μm, prin destrucție fizico-mecanică, într-o moară cu bile cu o turație de 15000...20000 rot/min,

până când rezultă o pastă de culoare gri, care se usucă până la umiditatea de 5...6%, se mărunțește într-o moară cu bile până la obținerea unor fracții cu mărimea de 50...90 mesh, rezultând o fosfoproteină cu compoziție de 680 mg fosfor, 310 mg magneziu și 150 mg calciu la 100 g produs, după care se amestecă într-o moară cu bile cu pulbere de amidon, într-un raport gravimetric fosfoproteină/amidon de 1/9...1/1, până la obținerea unei mase omogene de culoare gri, apoi se omogenizează cu un agitator rotativ timp de 30...40 min și se încorporează în capsule de gelatină tip N1.

Revendicări: 1



RO 123368 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de preparare a unei compoziții farmaceutice pe bază
de *Lymantria dispar* pentru stimularea memoriei omului, cu utilizare în industria farmaceutică.

3 Se cunosc o serie de suplimente alimentare ce conțin principii active obținute din
5 produse naturale pe bază de plante ca atare sau sub forma extractelor apoase sau organice,
atomizate sau liofilizate, cum ar fi cele din *Gingko Biloba*, sau a produselor de semisinteză
7 sau de sinteză chimică, cum sunt Piracetamul, Nootropilul etc., care nu au o acțiune stabilă,
de lungă durată și nu sunt lipsite de efecte secundare complexe. Aceste preparate
9 acționează foarte lent, efectul lor fiind vizibil după câteva luni și de multe ori ineficient și au
costuri ridicate.

11 Sunt cunoscute de asemenea, substanțe biologic active extrase din insecte în diverse
stadii de dezvoltare, având diferite acțiuni farmacologice.

13 Brevetul RO 118115 se referă la o substanță biologic activă, procedeul de obținere
a acesteia și utilizarea substanței biologic active. Substanța biologic activă, conform
15 invenției, conține o proteină cu un conținut de 4,84...7,97% Glu, 4,10...8,45% Fen,
3,76...5,23% Asp, 2,04...4,44% Liz, 1,50...2,79% Tre, 2,72...3,10% Pro, 1,65...3,11% Ala,
1,80...2,54% Val, 1,37...2,59% Izo, 1,41...3,04% Pir, 1,91...3,61% Arg, 0,83...1,17% His,
17 procente fiind exprimate în greutate. Procedeul conform invenției constă în aceea că, se
colectează ouă și pupe de *Lymantria dispar*, larve de *Leptinotarsa decembriata* și adulți de
19 *Malolonta melolonta*, care se sterilizează, se mărunțesc într-un mojar electric la viteza de
2500...5000 rot/min până se obține o masă omogenă de culoare gri-deschis, care se filtrează
21 printr-o pânză cu orificii de 200...250 μ, se izolează resturile de țesuturi, se filtrează prin filtrul
cu vid până la obținerea unei suspensii gri deschis, care se liofilizează sau se atomizează
23 și se obține o pulbere. Substanța biologic activă se utilizează pentru obținerea unui
medicament împotriva infecțiilor hepatice.

25 Brevetul RO 119113 prezintă un preparat biologic pentru lizarea alunițelor, nevilor,
polipilor, keloizilor, carcinoamelor și altor formațiuni cutanate, la procedeul de obținere și
27 utilizare a acestuia. Preparatul biologic este constituit din 51,7...52% proteină specifică care
conține 10% substanță biologic activă ce are la bază aminoacizii: Gly, Asp, Ley, Pir, Fen, Liz,
29 împreună cu 25% lanolină, 25% glicerină, 255 lapte praf, 10% extract de nucă, 0,12%
nipagin, 0,08% nipasol, și 4,8% apă bidistilată, procente fiind exprimate în greutate.
31 Procedeul de obținere a preparatului constă în aceea că pupele de *Lymantria dispar* L., care
se colectează din pădurile infestate, se dezinfectează bine cu detergent, alcool și raze ultra-
33 violete, apoi se mojarază până la obținerea unei mase gri deschis, omogenă, care se liofili-
zează la temperatura de -130...-150°C, timp de 45...48 h, sau se atomizează la temperaturile
35 de 120...130°C, la intrare, și 85...90°C, la ieșire, apoi se adaugă în următoarea ordine:
glicerină, lanolină, lapte gras, extract de nucă, nipagină, nipasol, substanță biologic activă
37 și apă bidistilată, care se amestecă cu un mixer până la obținerea unei mase omogene.

39 Scopul invenției este de a elabora o compoziție, pe baza unor compuși lipo-proteici,
extrași din materialul protector al ouălor de *Lymantria dispar* (Omida păroasă a stejarului),
care se recoltează de pe tulpinile de arbori afectați de fitofagul *Lymantria dispar*. De obicei,
41 materialul protector al ouălor apare în luna iunie și se colectează de pe tulpini cu un cuțit din
inox în vase de plastic sterile. Acest material protector conține cantități importante de chitină,
43 cheratină și svingolipide, care include până la 680 mg fosfor, 310 mg magneziu și 150 mg
calciu la 100 g de produs.

45 Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta invenție constă în stimularea
memoriei.

47 Procedeul de preparare a compoziției farmaceutice pe bază de *Lymantria dispar*
constă în aceea că: se recoltează ouă și pupe de *Lymantria dispar* de pe tulpinile stejarilor
49 afectați, se separă materialul protector din pupe și puf cu un conținut de 383 mg/100 g
proteine, 408/100 g Mg și 345 mg/100 g P, se spală de 2...3 ori cu apă distilată, se
51 dispersează timp de 15...20 min în ser fiziologic din 9,0 mg NaCl la 1,0 l apă distilată, se

RO 123368 B1

filtrează și se esorează, iar opțional se congelează la temperatura de -15...-20°C, apoi se mărunțește fin, până la 5...10 μm, prin destrucție fizico-mecanică, într-o moară cu bile cu o turație de 15 000...20 000 rot/min, până când rezultă o pastă de culoare gri, care se usucă până la umiditatea de 5...6%, se mărunțește într-o moară cu bile până la obținerea unor fracții cu mărimea de 50...90 mesh, rezultând o fosfoproteină cu compoziția de 680 mg fosfor, 310 mg magneziu și 150 mg calciu la 100 g produs, după care se amestecă într-o moară cu bile cu pulbere de amidon, într-un raport gravimetric fosfoproteină/amidon de 1/9...1/1, până la obținerea unei mase omogene de culoare gri, apoi se omogenizează cu un agitator rotativ timp de 30...40 min și se încorporează în capsule de gelatină tip N 1.

Procedeul de preparare a compoziției farmaceutice pe bază de *Lymantria dispar* prezintă următoarele avantaje:

- prezintă o modalitate de valorificare superioară a materialului protector din pupe și puf din omida păroasă a stejarului (*Lymantria dispar*), într-un flux tehnologic continuu și unitar, cu număr redus de faze;

- se obține o compoziție netoxică, folosită ca supliment alimentar pentru stimulează memoriei atât la copii cu vârsta de peste 10 ani, cât și la persoane de vârsta a treia;

- compoziția obținută are acțiune rapidă și eficientă, completând sistemul nervos cu cantități suficiente de fosfor, calciu și magneziu, care se absorb imediat în organism.

Sunt prezentate în continuare 2 exemple de realizare a procedurii, conform invenției:

Exemplul 1.

- colectarea ouălelor din zonele infestate cu omida păroasă a stejarului (*Lymantria dispar*);

- izolarea lor din matricea care constituie o keratină specifică;

- absorbția substratului cu un aspirator;

- purificarea substratului;

- mărunțirea keratinei cu ajutorul unei mori speciale.

Se adună cheratina care acoperă ouăle de *Lymantria dispar* de pe scoarța arborilor de stejar, salcâm, plop etc. Substratul (puful) care acoperă ouăle se absoarbe cu un aspirator de casă din masa de keratină care se mărunțește între două discuri. Substratul de keratină se spală într-o soluție serică (9 g de sare pură la 10 l de apă curată) timp de 20 - 30 minute. Masa se centrifughează timp de 15 minute la viteza de 5-7 mii rot/min, apoi se întinde pe o peliculă sterilă și se lasă 2-3 h să se usuce. După această procedură, puful se pune într-o moară cu bile și se rotește la viteza de 20-30 rotații/min timp de 1½ - 2 h până la formarea unei pulberi omogene.

Exemplul 2.

- se colectează pupe de *Lymantria dispar* (omida păroasă a stejarului) în vase de plastic cu capacitate de 1,5 - 2 l;

- se spală pupele cu ser fiziologic timp de 2 h;

- se dezinfectează cu alcool de 70° timp de 15 min;

- se mărunțesc cu un mojar de tip I-500 (Cehia) la o viteză de 4500-5000 de rotații pe minut timp de 15-16 min, obținându-se o masă de culoare gri deschis;

- masa se filtrează printr-o pânză cu 200 de orificii pe cm², înlăturându-se astfel particulele brute;

- produsul obținut se centrifughează la o viteză de 5000 de rotații pe minut timp de 15-20 min, iar sedimentul de pe fundul eprubetelor se izolează și se liofilizează/atomizează până la obținerea unei pulberi de culoare gri deschis, cu o umiditate de 5-6%.

RO 123368 B1

1 Pupele, după colectare se spală de 3-4 ori într-o soluție serică (9 g de sare la 10 l apă
curată). Se trec prin apă distilată timp de 15 - 20 min, apoi pupele se pun într-un cilindru de
3 inox, unde se mărunțesc timp de 15 min până la formarea unei paste de culoare gri deschis.
Pasta se liofilizează sau atomizează până la umiditatea de 5-6%. Pulberea obținută se
5 amestecă cu o matriță 1:1, apoi se încapsulează în capsule de gelatină Nr. 1.

Pentru procedeul de preparare se localizează specia de insecte *Lymantria dispar*
7 (omida păroasă a stejarului), specifică speciilor de foioase (stejar, păducel, măr, păr, etc.),
care de multe ori produc defolieri totale ale plantațiilor de păduri și livezi. Defolierile sunt
9 produse de larvele insectei, care au cinci sau șase vârste: masculii au 5 vârste, iar femelele
6 vârste. Larvele de vârstă a 6-a se transformă în pupe pentru aproximativ 5-7 zile, după
11 care se transformă în adulți (fluturi). Fluturii femelă depun ouă, pe care le plasează pe
tulpinile arborilor. Fiecare femelă depune de la 500 până la 3500 de ouă, lipite pe scoarța
13 arborilor. Pentru protejarea lor, femelele le acoperă cu o keratină de culoare albă, foarte
rezistentă la acțiunile nefavorabile ale mediului înconjurător (frig, ploi, ninsori, vânt, raze
15 solare). În această keratină se găsește un component ce conține o cantitate mare de fosfor
(P) - 345 mg/100 g (tabelul 1). Acesta se izolează după o tehnologie destul de complicată:
17 mai întâi se culeg ouă și pupe de *Lymantria dispar* de pe arborii afectați, în vase de 2-2,5 l,
desprinzându-se de pe tulpinile acestora cu un cuțit, după care se transportă în laboratoare
19 speciale, unde se separă ouăle și se trec printr-o sită, operațiune în urma căreia se separă
puful, care se absoarbe cu un aspirator special. Materialul colectat se pune într-un sac
21 special, după care pupele se mărunțesc și se filtrează printr-o evelină cu 200 de orificii/cm.
După aceste operațiuni se centrifughează la o viteză de 15-20000 de rotații pe minut, timp
23 de 15-20 min. Frația de la jumătatea eprubetelor se separă și se liofilizează sau se atomi-
zează, obținându-se astfel o pulbere de culoare gri, care conține până la 684 mg/100 g fosfor
25 (P), 314 mg/100 g Mg, 148 mg/100 g Ca (tabelul 1).

În proteina "P" predomină diferiți aminoacizi, prevăzuți în tabelul 2. Dintre cei mai
27 importanți amintim: acidul glutamic, acidul aspartic, fenilalanina, arginina, lizina, aminoacizi
foarte importanți pentru organismul uman.

Tabelul 1

31 Conținutul în macroelemente în materiale biologice (substanță uscată)

33 Proba	Cenușă totală %	Cenușă insolubilă în HCl 10%	Ca mg/100 g	Mg mg/100 g	P mg/100 g
O - atomizat	9,85	0,0284	475	192	415
35 Cv - atomizat	5,95	0,0174	513	480	207
O - uscat în etuvă	8,69	0,0253	429	285	144
37 Cv - uscat în etuvă	1,53	0,0012	182	87	23
Puf	13,78	0,0085	1091	865	345
39 Li - atomizat	8,93	0,057	283	408	263
P - atomizat	4,37	0,003	148	314	684

Compoziția în aminoacizi a proteinei din pulberea "Pe"

Aminoacizii	mg/g
Acid glutamic	39,647
Acid aspartic	31,698
Fenilalanina	39,6320
Arginina	21,287
Lizina	17,650
Leucina	15,185
Alanina	16,878
Pirolizina	13,936
Glicocol	13,156
Treonina	15,872
Prolina	12,995
Valina	13,329
Izoleucina	11,515

Substanța Biologic Activă (SBA) se obține dintr-un component, respectiv puful femelelor de omida păroasă a stejarului (*Lymantria dispar*) și pupele omidei păroase a stejarului, care apar după formarea larvelor și se termină cu formarea adultului (fluture sau imago).

Pupele și puful (keratina) cu care fluturii de *Lymantria dispar* acoperă ouăle depuse pe tulpinile arborilor include cantități mari de fosfor, magneziu și calciu (tabelul 1).

După ardere, puful și pupele conțin cantități minimale de cenușă (tabelul 1). Cenușa totală la puf constituie 13,78%, iar cenușa solubilă în HCl 10% numai 0,0085.

În pupele atomizate, cenușa totală este de 4,37%, solubilă în 10% HCl - 0,003.

Alte componente ale insectelor extrase din alte faze de dezvoltare includ cantități mai mici de P, Ca, Mg.

Analizele cantitative au arătat că în pupe cea mai mare cantitate de substanțe o constituie proteinele - la unele specii până la 15,12%. La pupele de *Lymantria dispar*, după atomizare acestea reprezintă - 52,78% (tabelul 3), iar proteinele includ azot - 8,44%, aminoacizi - 9,08%, azot neprecipitabil - 4,46%.

Lipidele din componența pupelor constituie 26,52%, iar hidrații de carbon - 8,44%. Complexul de substanțe din pupe și apoi din substanța protectoare a ouălelor are cea mai mare influență asupra măririi potențialului memoriei omului, care s-a demonstrat la persoane de vârsta a 3-a, care de multe ori își pierd capacitatea memoriei.

Tabelul 3

Compoziția substanțelor biologic active din insecte (în substanță uscată)

Componentele SBA	O atomizat	Li atomizat	P atomizat	O uscat la etuvă	Cv uscat la etuvă
Proteine (azot x 6,25), din care	62,47	55,34	52,78	71,86	75,72
*azot total %	9,99	8,85	8,44	11,49	12,11
*aminoacizi %	7,75	6,87	9,08	3,07	4,38
*azot, neprecipitabil cu ATC%	5,71	2,83	4,46	2,75	1,67
Lipide totale %	16,41	24,8	26,57	8,41	3,70
Hidrați de carbon, total %	2,82	4,92	8,44	2,44	13,71
Cenușă total %	9,85	8,93	4,37	8,69	1,53

Tabelul 4

Analize comparative la insecte și alte surse biologice

Stadiul de dezvoltare	Proteine g/100 g	Lipide g/100 g	Hidrați de carbon g/100 g
L ou	66,26	16,91	2,38
L larvă	73,17	11,78	0,556
L pupă	66,36	23,50	8,87
L adult	55,93	9,02	
C larvă	48,48	20,39	4,60
C adult	65,20	6,57	4,20
D larvă	53,21	22,22	4,23
D adult	44,67	38,62	4,28
Ou de prepeliță	43,14	29,50	2,06
Aloe vera	12,45	8,40	5,40
Semințe de strugure	12,14	-	2,20

Schema tehnologică de înmulțire în masă a insectelor:

- Selecția ouălor de insecte
- Pregătirea mediilor nutritive
- Plasarea ouălor pe mediile nutritive
- Igienizarea casetelor cu larve
- Colectarea insectelor la anumite faze de dezvoltare
- Extragerea SBA din țesuturile insectelor după tehnologii speciale
- Conservarea SBA la temperaturi scăzute

TESTĂRI FARMACOLOGICE

1. Testarea toxicității acute

S-au efectuat testări farmacotoxicologice, pentru determinarea toxicității substanțelor biologic active (SBA) extrase din insecte (HI-1, HL-2, IM-2, IMsp).

Acest studiu prezintă dozele toxice (maximă, medie și minimă) ale substanțelor cercetate, cât și caracterul și nivelul modificărilor patologice ale unor organe sensibile sau sisteme de organe. De asemenea, s-a determinat reversibilitatea acestor modificări în timp, cât și toleranța locală a substanțelor cercetate.

RO 123368 B1

Determinarea toxicității acute a SBA Nr. 1(H_L-1), Nr.2(H_L-2), Nr.3(IM-2) și Nr. 4(IM_{SPP}) 1

Cercetările au fost efectuate conform "recomandărilor metodice pentru studii de toxicitate generală a substanțelor farmacologice" aprobate de Comitetul Farmacologic de Stat a MS din Rusia din 29.12.97. 3 5

Determinarea toxicității acute a SBA prin administrare unică pe cale enterală și intraperitoneală a substanțelor date 7

Materiale și metode: în studiu au fost incluși 430 șobolani albi (216 femele și 214 masculi) în vârstă de 3-4 luni, cu masa corporală între 150-240 g, precum și 190 șoareci (100 masculi și 90 femele) cu masa corporală 16-26 g. Vârsta și masa corporală au fost selectate conform cerințelor indicate în recomandările date. 9 11

Animalele au fost obținute din aceeași sursă și menținute timp de 3 zile în condițiile de viață ale laboratorului (cutii standard de masă plastică) pentru aclimatizare. Condițiile de trai și alimentația au corespuns cerințelor sanitare și normelor de alimentare. Pentru utilizarea apei au fost stabilite autopeducte. Animalele nu au primit hrană cu 12 h înainte de inițierea experienței și pe parcursul ei. În dimineața zilei destinate experimentelor, aceștia au fost cântăriți și repartizați în loturi omogene câte 5-6 masculi și 5-6 femele conform masei corporale. 13 15 17

Substanțele cercetate fiind insolubile în apă se formează o suspensie uniformă. Ele au fost diluate în volume constante de soluție fiziologică de 0,9% (câte 3-5 ml pentru fiecare șobolan la administrarea per os și 1-3 ml cantitatea de lichid maximal admisibilă pentru șoareci, pentru administrare enterală și intraperitoneală (conform instrucțiunilor). Calea de administrare: enterală (la șobolani) și intraperitoneală la (șoareci). 19 21 23

Determinarea toxicității acute a SBA Nr. 1(H_L-1), Nr.2(H_L-2), Nr.3(IM-2) și Nr. 4 (IM_{Spp}), administrate pe cale enterală 25

Inițial pentru stabilirea dozelor toxice substanțele au fost administrate enteral succesiv în doze teste de 250, 350 și 500 mg/kg masă corporală. 27

Animalele au fost supravegheate timp de 7 zile. Nu s-au constatat modificări în compartamentul animalelor și nici decesul lor. Ulterior s-a recurs la administrarea substanțelor în doze de 750, 1000, 1500 și 2000 mg/kg și asemenea, nu s-au constatat modificări în comportamentul șobolanilor și nici decesul lor pe parcursul celor 7 zile de observație. Doza superioară de 2000 mg/kg nu s-a mai folosit deoarece era necesar un volum mare de soluție fiziologică (ce depășea instrucțiunile din recomandări) pentru formarea unei suspensii accesibile pentru administrare intragastrică. 29 31 33 35

Tabelul 5

Toxicitatea acută a substanțelor H_L-1, H_L-2, IM-2, IM_{Spp}, administrate pe cale enterală 37

Doze	H _L -1		H _L -2		IM-2		IM _{Spp}	
	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces
750 mg/kg masculi	6	-	6	-	6	-	6	-
750mg/kg femele	6	-	6	-	6	-	6	-
1000 mg/kg masculi	6	-	6	-	6	-	6	-
1000 mg/kg femele	6	-	6	-	6	-	6	-
1500 mg/kg masculi	6	-	6	-	6	-	6	-

 39 41 43 45

Tabelul 5 (continuare)

Doze	H _L -1		H _L -2		IM-2		IM _{spp}	
	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces
1500 mg/kg femele	6	-	6	-	6	-	6	-
2000 mg/kg masculi	6	-	6	-	6	-	6	-
2000 mg/kg femele	6	-	6	-	6	-	6	-

Toxicitatea acută la administrarea parenterală a substanțelor s-a studiat pe șoareci și șobolani albi, obținuți din aceeași sursă. Testarea toxicității acute la injectarea intraperitoneală a suspensiilor substanțelor cercetate s-a inițiat cu doze ce constituiau circa 50% din cele utilizate enteral. După administrarea dozelor stabilite, animalele au fost supuse supravegheerii până la dispariția modificărilor în mortalitate și în comportamentul lor. În timpul observației a fost înregistrat comportamentul animalelor, activitatea motorie, coordonarea mișcărilor, reacția la excitanții fiziologici (lumină, zgomot), activitatea respiratorie, starea ochilor, pielii și mucoaselor. De asemenea, au fost înregistrate timpul apariției fenomenelor de intoxicație și timpul apariției morții animalelor (relaxarea și întreruperea convulsiilor, oprirea respiratorie și cardiacă).

Vizual a fost determinat tabloul clinic al intoxicației. Rezultatele au fost prelucrate statistic după metoda Kurber și metoda statistică a probabilităților după V.B. Prozorovschii.

Astfel, la administrarea substanței HL-1 la șoareci masculi și femele, LD₁₀₀ a fost de 500 mg/kg masa corporală (deși doza inițială ce a provocat moartea a 100% animale a fost de 750 mg/kg.) Ulterior au fost administrate următoarele doze succesive: 250, 100 și 25 mg/kg. Rezultatele obținute au permis constatarea că LD₁₀₀ a fost de 25 mg/kg masă corporală.

La animalele de experiență s-a constatat o diminuare a activității motorie cu o reacție redusă, din ce în ce mai slabă la stimuli exogeni (lumină, zgomot, etc.) cu dezvoltarea unei stări terminale (gasping) și decesul animalelor în timp de 30-60 min la dozele de 750 și 500 mg/kg sau la câteva ore (2-4 h) la dozele de 250 și 100 mg/kg și care au supraviețuit după o perioadă de hipodinamie cu reducerea reacției la stimuli exogeni, iar activitatea motorie și reactivitatea la excitanți s-a restabilit.

Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a 24 h (tabelul 5).

Tabelul 6

Toxicitatea acută a substanțelor H_L-1, H_L-2, IM-2, IM_{spp}, administrate intraperitoneal la șoareci

Doze	H _L -1		H _L -2		IM-2		IM _{spp}	
	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces
1000 mg/kg masculi	-	-	5	5	-	-	-	-
1000 mg/kg femele	-	-	5	5	5	5	-	-
750 mg/kg masculi	10	10	10	9	5	5	5	5
750 mg/kg femele	5	5	5	1	5	5	5	5

Tabelul 6 (continuare)

Doze	H _L -1		H _L -2		IM-2		IM _{spp}	
	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces
500 mg/kg masculi	5	5	8	5	8	6	5	3
500 mg/kg femele	5	5	5	-	5	4	5	3
250 mg/kg masculi	7	6	5	-	5	3	-	-
250 mg/kg femele	5	4	5	-	5	2	5	2
100 mg/kg masculi	5	3	-	-	5	-	5	-
100 mg/kg femele	5	2	-	-	5	-	5	-
25 mg/kg masculi	5	-	-	-	-	-	-	-
25 mg/kg femele	5	-	-	-	-	-	-	-

La administrarea substanței H_L-2 la șoareci masculi și femele, LD₁₀₀ găsită a fost de 1000 mg/ kg masă corporală. Ulterior s-au administrat următoarele doze succesive: 750, 500 și 250 mg/kg. Rezultatele obținute ne-au permis să constatăm că LD₁₀₀ a fost de 250 mg/kg masă corporală pentru masculi și 500 mg/kg pentru femele. La animalele de experiment se constată o diminuare a activității motorie, cu o reacție redusă din ce în ce mai slabă la stimuli exogeni (lumină, zgomot), cu dezvoltarea unei stări terminale (gasping) și decesul animalelor în timp de 30-60 min la dozele de 1000 mg/kg sau în câteva ore (2-4 h) la dozele de 750 și 500 mg/kg la masculi, iar la final la doza de 750 mg/kg a decedat doar un animal. Convulsiile s-au constatat doar ocazional. La șoareci, la dozele de 750 și 500 mg/kg au supraviețuit după o perioadă de hipodinamie, s-a restabilit reacției la stimuli exogeni, activitatea motorie și reactivitatea la excitanți s-a restabilit. Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a 24 h.

La administrarea substanțelor IM-2 și IM_{spp} la șoricei atât masculi, cât și femele, LD₁₀₀ a fost de 750 mg/kg masă corporală. Ulterior au fost făcute următoarele doze succesive de 500, 250, și 100 mg/kg. Rezultatele obținute ne-au permis să constatăm că LD₀ era de 100 mg/ kg masă corporală pentru masculi și femele. La animale se constată o diminuare a activității motorie cu o reacție redusă apoi din ce în ce mai slabă la stimuli exogeni (lumină, zgomot) cu dezvoltarea unei stări terminale (gasping) și decesul animalelor timp de 30-60 min la dozele de 750 mg/kg sau câteva ore (2-4 h) la dozele de 250 și 500 mg/kg. Convulsiile s-au constatat doar ocazional. La șoricei în dozele 2500 și 500 mg/kg ce au supraviețuit după o perioadă de hipodinamie și reducerea reacției la stimuli exogeni activitatea motorie și reactivitatea la excitanți. Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a 24 h (tabelul 6).

Toxicitatea acută a substanțelor H_L-1, H_L-2, IM-2, IM_{spp}, la administrarea intraperitoneală la șobolani

Doze	H _L -1		H _L -2		IM-2		IM _{spp}	
	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces	N animale	De-ces
1000 mg/kg masculi	-	-	-	-	-	-	-	-
1000 mg/kg femele	-	-	5	5	-	5	-	-
750 mg/kg masculi	-	-	5	5	-	5	-	-
750 mg/kg femele	-	-	6	1	-	5	5	5
600 mg/kg femele	-	-	6	-	-	-	-	-
500 mg/kg masculi	5	5	6	3	6	6	5	5
500 mg/kg femele	6	6	5	-	6	6	5	5
250 mg/kg masculi	5	5	5	-	6	6	5	5
250 mg/kg femele	6	6	-	-	6	3	6	4
100 mg/kg masculi	-	-	-	-	6	2	6	3
100 mg/kg femele	6	5	-	-	6	-	6	-
150 mg/kg masculi	-	-	-	-	-	-	-	-
150 mg/kg femele	-	-	-	-	-	-	6	2
75 mg/kg masculi	-	-	-	-	-	-	-	-
75 mg/kg femele	5	4	-	-	-	-	-	-
50 mg/kg masculi	6	6	-	-	5	-	-	-
50 mg/kg femele	-	-	-	-	-	-	-	-
25 mg/kg masculi	6	2	-	-	-	-	-	-
25 mg/kg femele	6	2	-	-	-	-	-	-
5 mg/kg masculi	5	-	-	-	-	-	-	-
5 mg/kg femele	5	-	-	-	-	-	-	-

Prin administrarea substanței Nr. 1 la șobolani masculi s-a determinat LD₁₀₀ de 50 mg/kg, iar la femele LD₁₀₀ este 250 mg/kg. După cum reiese din tabelul 3, s-au preparat următoarele doze succesive: 500, 250, 100, 75, 50, 25 și 5 mg/kg. Rezultatele obținute au permis constatarea că LD₁₀₀ a fost de 5 mg/kg masă corporală. La animalele de experiență s-a constatat o diminuare a activității motorii, cu o reacție redusă din ce în ce mai slabă la stimuli exogeni (lumină, zgomot etc.) cu dezvoltarea unei stări terminale (gasping) și decesul animalelor la doza de 250 mg/kg (femele) și 50 mg/kg (masculi). Convulsiile s-au constatat la majoritatea animalelor la dozele de 750 mg/kg și la 500 mg/kg. S-a observat de asemenea creșterea frecvenței respiratorii cu implicarea musculaturii abdominale. Șobolani cu dozele de 25 mg/kg au supraviețuit după o perioadă de hipodinamie și reducerea reacției la stimuli exogeni, după care activitatea motorie și reactivitatea la excitanți s-au restabilit. Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a 24 h. La examinarea macroscopică a organelor interne la animalele decedate, nu s-au observat modificări (tabelul 7).

RO 123368 B1

Substanța HI-2 s-a administrat la șobolani femele în doză de LD₁₀₀ 1000 mg/kg masă corporală, iar la masculi în doză de 750 mg/kg. Ulterior s-au administrat următoarele succesiuni de doze: 500, 600 și 700 mg/kg la femele și 500 și 250 mg/kg la masculi. Rezultatele obținute au permis să se constate că LD₁₀₀ a fost de 250 mg/kg masă corporală pentru masculi și 600 mg/kg pentru femele. La animalele de experiență s-a constatat o scădere a activității motorii cu o reacție redusă, din ce în ce mai slabă la stimulii exogeni (lumină, zgomot, etc.) cu dezvoltarea unei stări terminale și decesul animalelor timp de 6-10 h. Convulsiile s-au constatat doar ocazional. S-au restabilit șobolanii cu dozele de 750 mg/kg (femele) și 500 (masculi) mg/kg și au supraviețuit după o perioadă de hipodinamie și reducerea reacției la stimulii exogeni. Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a 24 h. La examinarea macroscopică a organelor interne, la animalele decedate, nu s-au constatat modificări vizibile.

La administrarea substanțelor IM-2 la șobolani, atât masculi cât și femele, LD₁₀₀ s-a administrat în doză de 250 mg/kg masă corporală. Inițial, s-au studiat doze de 500 mg/kg, care s-au soldat cu decesul a 100% animale. Ulterior s-a recurs la doze sub 250 mg/kg (respectiv: 150, 100 și 50 mg/kg). Rezultatele obținute au permis să se constate că LD₁₀₀ a fost de 50 mg/kg masă corporală pentru masculi și 100 mg/kg pentru femele. S-a constatat o diminuare a activității motorii cu o reacție redusă, din ce în ce mai slabă la stimulii exogeni (lumină, zgomot, etc.), cu dezvoltarea stării terminale (gasping) și decesul animalelor timp de 24 h, la dozele unde s-a stabilit decesul. Convulsii s-au constatat doar ocazional. La șobolanii cu dozele 150 și 100 mg/kg, ce au supraviețuit după o perioadă de hipodinamie și reducerea reacției la stimuli exogeni, activitatea motorie și reactivitatea la excitanți s-au restabilit. Animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a 24 h. La examinarea macroscopică a organelor interne, la animalele decedate, nu s-au constatat modificări vizibile.

La administrarea substanțelor IMSpp la șobolanii masculi, LD₁₀₀ a fost de 250 mg/kg masă corporală, iar la femele 750 mg/kg. Inițial, la masculi, s-au administrat doze de 750 și 500 mg/kg care s-au soldat cu decesul a 100% animale. Ulterior, s-a recurs la doze sub 250 mg/kg (respectiv: 150, 100 și 50 mg/kg). Rezultatele obținute au permis să se constate că LD₁₀₀ a fost de 50 mg/kg masă corporală pentru masculi și 100 mg/kg pentru femele. S-a constatat o diminuare a activității motorii cu o reacție redusă, din ce în ce mai slabă la stimulii exogeni (lumină, zgomot etc.), cu dezvoltarea stării terminale (gasping) și decesul animalelor timp de 24 h, la dozele unde s-a stabilit decesul. Convulsii s-au constatat doar ocazional. La șobolanii în dozele 250, 150 și 100 mg/kg, ce au supraviețuit după o perioadă de hipodinamie și reducerea reacției la stimuli exogeni, activitatea motorie și reactivitatea la excitanți s-au restabilit. Animalele au revenit la starea inițială pe parcurs de 24 h. La examinarea macroscopică a organelor interne, la animalele decedate, nu s-au constatat modificări vizibile.

Un criteriu mai adecvat de apreciere a toxicității acute a reprezentat doza letală medie (LD₅₀). Pentru determinarea acesteia s-a folosit metoda Kurber.

La șoareci, doza letală medie, determinată pentru substanțele cercetate, este prezentată în tabelele de mai jos (tabelele 8, 9, 10, 11)

Tabelul 8

Toxicitatea acută (LD₅₀), determinată pentru substanțele studiate administrate parenteral la șoareci

Substanțele	Masculi (mg/ kg)
H _L -1	118,75
H _L -2	583,3
IM-2	318,0
IM _{spp}	435,0

RO 123368 B1

1 Doza letală medie (DL_{50}) pentru substanțele studiate, administrate parenteral la
șobolani, a fost calculată separat la masculi și femele și apoi împreună (integral). Rezultatele
3 obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos.

5 *Tabelul 9*

7 *Toxicitatea acută (LD_{50}), determinată pentru substanțele studiate administrate pe cale
parenterală la șobolani*

Substanțele	Masculi (mg/kg)	Femele (mg/ kg)	Masculi și femele (mg/kg)
H_L -1	30	65,4	46,6
H_L -2	475	716,7	668,25
IM-2	145,8	162,5	122,2
IM _{spp}	115,0	305,8	140,6

13 De asemenea, s-au calculat dozele letale medii pentru substanțele studiate,
15 administrate pe cale intraperitoneală la șoareci și la șobolani (rezultatele sunt prezentate în
tabelele de mai jos).

17 *Tabelul 10*

19 *Toxicitatea acută DL_{50} pentru substanțele studiate, administrate pe cale
intraperitoneală la șoareci*

Substanțele	Masculi $M \pm DS$ (mg/kg)
H_L -1	131,0 \pm 39,0
H_L - 2	631,0 \pm 51,0
IM-2	318,0 \pm 43,6
IM _{spp}	435,0 \pm 55,0

25 *Tabelul 11*

27 *Toxicitatea acută DL_{50} pentru substanțele studiate, administrate pe cale
intraperitoneală la șobolani*

Substanțele	Masculi $M \pm DS$ (mg/kg)	Femele $M \pm DS$ (mg/kg)	Masculi și femele $M \pm DS$ (mg/kg)
H_L -1	25,5 \pm 7,8	52,4 \pm 12,2	33,4 \pm 13,4
H_L -2	500,0 \pm 86,7	725,0 \pm 43,0	622,5 \pm 45,5
IM-2	141,7 \pm 19,3	160,0 \pm 16,3	163,0 \pm 14,7
IM _{spp}	120,0 \pm 35,0	264,0 \pm 42,9	229,5 \pm 52,8

35 **2. Determinarea toxicității cronice**

37 Toxicitatea cronică a fost determinată pe șobolani masculi cu masa corporală între
110 și 140 g, repartizați în grupe a câte 7-8 animale. Experiențele au durat 30 de zile.
39 Șobolani au fost repartizați în celule separate cu alimentarea la rația standard. Lotul intact
(de control) a fost constituit din 7 șobolani masculi, iar cele experimentale au constituit câte
41 8 animale. Au fost cercetate 4 substanțe: H_L -1, H_L -2, IM-2, IM_{spp}. Fiecare substanță a fost
administrată în 2 doze (100 și 1000 mg/kg) care s-au administrat animalelor, fiind amestecate
43 în hrană. Șobolani au fost urmăriți până au ingerat bolul alimentar. La fiecare 7 zile,
animalele s-au cântărit.

RO 123368 B1

Inițial, s-a efectuat un frotiu pentru examinarea sângelui periferic (formula leucocitară). Frotiul s-a repetat peste 30 de zile de la administrarea substanțelor cercetate. După 30 de zile șobolanii au fost decapitați și s-a colectat sângele pentru explorări biochimice (determinarea glucozei, proteinelor totale, colesterolului, ASAT, ALAT, fosfatazei alcaline). După aceasta, animalele au fost deschise și s-a efectuat studiul macroscopic al organelor interne, iar inima, pulmonii, ficatul, splina și rinichii au fost separate, cântărite și folosite ulterior pentru studiul morfologic la microscop.

Datele obținute au fost prelucrate după criteriul t-Student.

Pe parcursul studiului nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor din grupul de control și cel experimental. La examinarea macroscopică a organelor interne, nu s-au depistat modificări patologice.

Pe parcursul a 30 de zile, animalele din lotul de control și cele experimentale au crescut în greutate. La majoritatea loturilor experimentale, s-a constatat o creștere mai mare a masei corporale, cu excepția grupului cu HI-1 100 mg/kg, față de lotul de control. Acest indice s-a majorat la animalele ce li s-a administrat HI-2 și IM-2 în dozele de 100 și 1000 mg/kg, la care creșterea în greutate a fost de la 8 la 15 g, mai mare ca la șobolanii din lotul de control. Mai puțin important a fost suplimentul în greutate la animalele din loturile cu Imspp la ambele doze și HI-1 pentru 1000 mg/kg (creșterea masei corporale a fost cu 4-5 g mai mult). La toate grupele, creșterea ponderală a fost semnificativă față de greutatea inițială. Putem conchide că substanțele utilizate nu au diminuat masa corporală în dozele administrate, ci chiar au majorat-o cu 4-15 g față de șobolanii martor.

După autopsia animalelor și examinarea organelor interne, cordul, pulmonii, ficatul, rinichii și splina au fost cântărite și s-a determinat indicele masă a organului/masa corpului. Conform cu tabelul 2 nu s-au constatat devieri esențiale ale indicelui cercetat. Aceasta se referă în primul rând la cord, pulmonii, rinichi și splină. Referitor la indicele masa ficatului/masa corpului, deși devierile nu erau statistic semnificative, s-a constatat că, la majoritatea loturilor experimentale, îndeosebi cele cu IM-2-1000 mg/kg și HI-1-100 mg/kg, s-a observat o creștere a indicelui respectiv ceea ce denotă o majorare relativă a masei organului.

Un compartiment al studiului toxicității cronice l-a constituit tabloul sângelui periferic. Înainte de inițierea administrării substanțelor cercetate s-a efectuat studiul formulei leucocitare a sângelui periferic. Conform tabelului 3, în lotul martor și cele destinate pentru administrarea substanțelor HI-1, HI-2, IM-2 și Imspp, nu s-au înregistrat modificări esențiale la numărul leucocitelor și la procentele formelor segmentate. Numărul leucocitelor a fost în limitele normale și au oscilat între $5,71 \pm 0,3$ și $6,47 \pm 0,2$. Formele segmentate ale leucocitelor au fost în limite normale și au oscilat între $58 \pm 2,5$ și $67,7 \pm 2,0$. După 30 de zile la lotul martor s-a constatat o scădere neesențială a numărului leucocitelor cu o scădere veridică a procentului formelor segmentate. În toate loturile experimentale după o lună de la administrarea substanțelor cercetate s-a depistat o reducere semnificativă a numărului leucocitelor față de datele inițiale, dar neesențiale față de animalele martori, după 30 de zile. Totuși, scăderea numărului leucocitelor era esențială la loturile ce foloseau substanțele în cauză și varia de la 1,25 la 2,24 mii. Practic, același lucru s-a determinat și la dinamica procentelor formelor segmentate. Atât la lotul martor, cât și în cele experimentale, acest indice a scăzut față de datele inițiale. Dacă la animalele intacte, leucocitele segmentate au scăzut cu 15,1% (de la $58,0 + 2,5\%$ la $42,9 + 1,4\%$), atunci în loturile experimentale, acestea au crescut de la 15,4% (IM-2 - 1000 mg/kg) la 27,5% (Imspp - 100 mg/kg) - tab. 12, 13, 14, 15.

RO 123368 B1

Tabelul 12

Modificarea masei corporale la șobolani după 30 de zile de administrare a substanțelor cercetate

Lotul	Numărul de animale	Masa inițială	Masa finală	Devierile de masă	Veridicitate (P)
1. martor	7	131,4±2,6	163,8±5,5	31,4±4,5	$P_1 < 0,001$
2. HI-1 100 mg/kg	8	140±0	166,2±5,6	26,2±5,8	$P_2 < 0,05$ $P_{1-2} > 0,05$
3. HI-1 1000 mg/kg	8	140±0	174,4±5,0	34,4±5,0	$P_3 < 0,001$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$
4. HI-2 100 mg/kg	8	118,7±1,3	158,1±6,3	39,4±6,4	$P_4 < 0,001$ $P_{1-4} > 0,05$
5. HI-2 1000 mg/kg	8	120±0	164,4±5,3	44,4±5,3	$P_5 < 0,001$ $P_{1-5} > 0,05$ $P_{4-5} > 0,05$
6. IM-2 100 mg/kg	8	130±0	173,1±6,0	43,1±6,0	$P_6 < 0,001$ $P_{1-6} > 0,05$
7. IM-2 1000 mg/kg	8	140±0	185,6±6,8	45,6±6,8	$P_7 < 0,001$ $P_{1-7} > 0,05$ $P_{6-7} > 0,05$
8. IMspp 100 mg/kg	7	140±0	175,7±8,5	35,7±8,5	$P_8 < 0,05$ $P_{1-8} > 0,05$
9. IMspp 1000 mg/kg	8	115±3,3	153,1±7,1	38,1±4,8	$P_9 < 0,001$ $P_{1-9} > 0,05$ $P_{8-9} > 0,05$

Tabelul 13

Modificarea indicilor masa organului/masa corpului după 30 de zile de administrare a substanțelor cercetate

Lotul	Numărul de animale	Masa cordului/ masa corpului	Masa pulmonilor/ masa corpului	Masa ficatului/ masa corpului	Masa rinichiului/ masa corpului	Masa splinei/ masa corpului
1. martor	6	0,004±0,0001	0,009±0,001	0,036±0,001	0,004±0,0002	0,004±0,0003
2. HI-1 100 mg/kg	8	0,004±0,0002 $P_{1-2} > 0,05$	0,009±0,0005 $P_{1-2} > 0,05$	0,042±0,002 $P_{1-2} > 0,05$	0,004±0,0002 $P_{1-2} > 0,05$	0,004±0,0003 $P_{1-2} > 0,05$
3. HI-1 1000 mg/kg	8	0,004±0,0001 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	0,008±0,0004 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	0,038±0,001 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	0,004±0,0001 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	0,004±0,0003 $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$
4. HI-2 100 mg/kg	8	0,004±0,0002 $P_{1-4} > 0,05$	0,009±0,0004 $P_{1-4} > 0,05$	0,036±0,001 $P_{1-4} > 0,05$	0,004±0,0002 $P_{1-4} > 0,05$	0,004±0,0004 $P_{1-4} > 0,05$
5. HI-2 1000 mg/kg	8	0,004±0,0002 $P_{1-5} > 0,05$ $P_{4-5} > 0,05$	0,009±0,001 $P_{1-5} > 0,05$ $P_{4-5} > 0,05$	0,038±0,001 $P_{1-5} > 0,05$ $P_{4-5} > 0,05$	0,004±0,0002 $P_{1-5} > 0,05$ $P_{4-5} > 0,05$	0,004±0,0004 $P_{1-5} > 0,05$ $P_{4-5} > 0,05$

RO 123368 B1

Tabelul 13 (continuare)

Lotul	Numărul de animale	Masa cordului/ masa corpului	Masa pulmoni/ masa corpului	Masa ficatului/ masa corpului	Masa rinichiului/ masa corpului	Masa splinei/ masa corpului
6. IM-2 100 mg/kg)	8	0,004±0,0002 P ₁₋₆ >0,05	0,008±0,001 P ₁₋₆ >0,05	0,038±0,004 P ₁₋₆ >0,05	0,004±0,0002 P ₁₋₆ >0,05	0,005±0,0004 P ₁₋₆ >0,05
7. IM-2 1000 mg/kg)	8	0,004±0,0002 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	0,008±0,0005 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	0,046±0,003 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	0,004±0,0001 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	0,005±0,0004 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05
8. IM spp 100 mg/kg)	6	0,005±0,0002 P ₁₋₈ >0,05	0,008±0,0005 P ₁₋₈ >0,05	0,04±0,002 P ₁₋₈ >0,05	0,004±0,0002 P ₁₋₈ >0,05	0,004±0,0004 P ₁₋₈ >0,05
9. IM spp 1000 mg/kg)	7	0,004±0,0002 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	0,008±0,0005 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	0,037±0,001 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	0,004±0,0002 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	0,005±0,0004 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05

Tabelul 14

Modificarea numărului leucocitelor și procentului neutrofilelor segmentate la șobolani după 30 de zile de administrare a substanțelor cercetate

Lotul	Numărul de animale	Numărul de leucocite (inițial)	Numărul de leucocite (după 30 de zile)	Procentul neutrofilelor segmentate (inițial)	Procentul neutrofilelor segmentate (după 30 de zile)
1. intact	7	5,71±0,3	4,81±0,14 P ₁ >0,05	58,0±2,5	42,9±1,4 P ₁ <0,05
2. H1-1 >100mg/kg)	8	6,11±0,23 P ₁₋₂ >0,05	4,0±0,38 P ₂ <0,001 P ₁₋₂ >0,05	60,8±2,5 P ₁₋₂ >0,05	38,6±4,5 P ₂ <0,05 P ₁₋₂ >0,05
3. H1-1 (1000 mg/kg)	8	5,96±0,16 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	4,06±0,36 P ₃ <0,05 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	62,1±2,0 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	32,8±3,8 P ₃ <0,001 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05
4. H1-2 (100 mg/kg)	8	6,0±0,26 P ₁₋₄ >0,05	4,34±0,21 P ₄ <0,05 P ₁₋₄ >0,05	62,6±2,5 P ₁₋₄ >0,05	41,1±2,4 P ₄ <0,001 P ₁₋₄ >0,05
5. H1-2 (1000 mg/kg)	8	5,29±0,29 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	4,61±0,31 P ₅ <0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	62,2±2,9 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	43,8±3,2 P ₅ <0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05
6. IM-2 (100 mg/kg)	8	5,91±0,32 P ₁₋₆ >0,05	3,78±0,45 P ₅ <0,05 P ₁₋₆ >0,05	61,5±3,1 P ₁₋₆ >0,05	29,5±5,0 P ₆ <0,001 P ₁₋₆ >0,05
7. IM-2 (100 mg/kg)	8	5,81±0,32 P ₁₋₇ >0,05	4,56±0,31 P ₇ <0,05 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	60,0±2,9 P ₁₋₇ >0,05	44,6±3,2 P ₇ <0,05 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05

RO 123368 B1

Tabelul 14 (continuare)

Lotul	Numărul de animale	Numărul de leucocite (inițial)	Numărul de leucocite (după 30 de zile)	Procentul neutrofilelor segmentate (inițial)	Procentul neutrofilelor segmentate (după 30 de zile)
8. IMspp (100 mg/kg)	7	6,47±0,2 P ₁₋₈ >0,05	4,23±0,26 P ₈ <0,001 P ₁₋₈ >0,05	67,7±2,0 P ₁₋₈ >0,05	40,2±2,7 P ₈ <0,001 P ₁₋₈ >0,05
9. IMspp (1000 mg/kg)	8	6,02±0,23 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	4,36±0,14 P ₉ <0,001 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	62,5±2,1 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	41,2±1,9 P ₉ <0,001 P ₈₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05

Tabelul 15

Modificarea procentului eozinofilelor, limfocitelor și monocitelor la șobolani după 30 de zile de administrare a substanțelor cercetate

Lotul	Numărul de animale Inițial	Eozinofile (%)		Limfocite (%)		Monocite (%)	
		Inițial	după 30 de zile	Inițial	după 30 de zile	Inițial	după 30 de zile
1. intact	7	2,3±0,5	1,9±0,5 P ₁ >0,05	34,4±1,8	52,3±1,2 P ₁ <0,001	5,4±1,1	3,0±0,4 P ₁ >0,05
2. HI-1 (100 mg/kg)	8	1,8±0,5 P ₁₋₂ >0,05	4,9±1,5 P ₂ >0,05 P ₁₋₂ >0,05	32,5±2,3 P ₁₋₂ >0,05	48,1±3,9 P ₂ <0,05 P ₁₋₂ >0,05	5,4±0,6 P ₁₋₂ >0,05	6,5±0,8 P ₂ >0,05 P ₁₋₂ >0,05
3. HI-1 (1000 mg/kg)	8	2,6±0,4 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	3,4±1,0 P ₃ >0,05 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	30,0±1,4 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	59,6±3,9 P ₃ <0,001 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ >0,05	5,2±0,5 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	3,2±0,4 P ₃ >0,05 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05
4. HI-2 (100 mg/kg)	8	2,2±0,4 P ₁₋₄ >0,05	2,8±0,6 P ₄ >0,05 P ₁₋₄ >0,05	30,5±1,8 P ₁₋₄ >0,05	51,4±2,3 P ₄ <0,001 P ₁₋₄ >0,05	5,4±0,9 P ₁₋₄ >0,05	3,6±0,5 P ₄ >0,05 P ₁₋₄ >0,05
5. HI-2 (1000 mg/kg)	8	2,6±0,6 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	1,4±0,3 P ₅ >0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	29,1±2,8 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	50,8±3,5 P ₅ <0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	6,4±0,6 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	3,5±0,6 P ₅ >0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05
6. IM-2 (100 mg/kg)	8	2,8±0,7 P ₁₋₆ >0,05	3,4±0,9 P ₆ >0,05 P ₁₋₆ >0,05	29,4±1,9 P ₁₋₆ >0,05	62,9±4,8 P ₆ <0,001 P ₁₋₆ <0,05	5,0±0,8 P ₁₋₆ >0,05	3,6±0,8 P ₆ >0,05 P ₁₋₆ >0,05
7. TM-200 (mg/kg)	8	2,6±0,5 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	1,9±0,5 P ₇ >0,05 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	31,2±2,5 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	50,4±3,3 P ₇ <0,001 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	6,1±0,9 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	3,1±0,5 P ₇ <0,05 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05

Tabelul 15 (continuare)

Lotul	Numărul de animale Inițial	Eozinofile (%)		Limfocite (%)		Monocite (%)	
		Inițial	după 30 de zile	Inițial	după 30 de zile	Inițial	după 30 de zile
8. IMspp (100 mg/kg)	6	2,0±0,4 P ₁₋₈ >0,05	2,0±0,5 P ₈ >0,05 P ₁₋₈ >0,05	25,8±2,1 P ₁₋₈ >0,05	54,8±2,5 P ₈ <0,001 P ₁₋₈ >0,05	4,8±0,9 P ₁₋₈ >0,05	3,2±0,5 P ₈ >0,05 P ₁₋₈ >0,05
9. IMspp (1000 mg/kg)	8	2,4±0,5 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	1,3±0,2 P ₉ >0,05 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	29,2±1,0 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	54,1±1,9 P ₉ <0,001 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	5,6±0,8 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	3,5±0,5 P ₉ >0,05 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05

Putem concluziona că la animalele ce li s-au administrat substanțele cercetate, s-a constatat o scădere a numărului leucocitelor și procentului neutrofilelor. Acestea însă nu au fost semnificative față de lotul martor.

În tabelul 5 sunt expuse datele referitoare la dinamica eozinofilelor, limfocitelor și monocitelor. La șobolanii martori nu s-au înregistrat modificări esențiale la acestea, deși procentul eozinofilelor și monocitelor a avut o tendință spre scădere. La animalele ce au ingerat substanța HI-1 în doza de 100 mg/kg, acest indice a crescut neesențial, iar HI-1 în doza de 1000 mg/kg a provocat o creștere neesențială eozinofilelor și o scădere neesențială a monocitelor. La utilizarea substanțelor HI-2, IM-2 și IMspp în doză de 100 mg/kg, procentul acestora a avut tendința spre scădere. Substanțele enumerate în ambele doze manifestau o tendință de scădere a procentului monocitelor.

La examinarea procentului limfocitelor s-a constatat că la animalele martor, acesta a oscilat între 25,8±2,1 până la 34,4±1,8%. Peste 30 de zile, atât la lotul martor, cât și la cele experimentale, la toate substanțele s-a determinat o limfocitoză marcată. S-a observat că la substanța HI-1 această creștere a limfocitelor era semnificativă pentru ambele doze, dar mai pronunțată pentru doza de 1000 mg/kg. În același timp, la substanța HI-2 nu s-a depistat diferența în dependența de doza utilizată. Substanțele IM-2 și IMspp au provocat o creștere a limfocitelor mai accentuată la doza de 100 mg/kg, deși diferența cu cea de 1000 mg/kg nu a fost semnificativă. O limfocitoză mai marcată față de lotul martor după 30 de zile s-a constatat la utilizarea substanțelor HI-1 în doză de 1000 mg/kg și IM-2 în doză de 100 mg/kg.

Cele mai sus menționate au permis să se constate că substanțele cercetate pot provoca o leucopenie față de datele inițiale, dar neesențială față de lotul martor în aceeași termeni de studiu, cu o scădere neesențială a leucocitelor segmentate și o creștere a limfocitelor în comparație cu animalele de control după o lună de interpretare. Aceste devieri, în majoritatea cazurilor nu au caracter dozo-dependent, deși în unele cazuri (la IM-2, IMspp și HI-2) se pot evidenția unele tendințe în dependența de doză. Concomitent la 1-2 animale la utilizarea substanțelor HI-1, HI-2 și IM-2 în ambele doze se constată apariția blastocitelor 1%, precum și a 1-2% leucocite nesegmentate (tabelele 16, 17, 18, 19).

RO 123368 B1

Tabelul 16

Modificarea numărului leucocitelor și procentului neutrofilelor segmentate la șobolani după 30 de zile de administrare a substanțelor cercetate

Lotul	Numărul de animale	Numărul de leucocite (inițial)	Numărul de leucocite (după 30 de zile)	Procentul neutrofilelor segmentate (inițial)	Procentul neutrofilelor segmentate (după 30 de zile)
1. intact	7	5,71±0,3	4,81±0,14 P ₁ >0,05	58,0±2,5	42,9±1,4 P ₁ <0,05
2. HI-1 (100 mg/kg)	8	6,11±0,23 P ₁₋₂ >0,05	4,0±0,38 P ₂ <0,001 P ₁₋₂ >0,05	60,8±2,5 P ₁₋₂ >0,05	38,6±4,5 P ₂ <0,05 P ₁₋₂ >0,05
3. HI-1 (1000 mg/kg)	8	5,96±0,16 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	4,06±0,36 P ₃ <0,05 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	62,1±2,0 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	32,8±3,8 P ₃ <0,001 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05
4. HI-2 (100 mg/kg)	8	6,0±0,26 P ₁₋₄ >0,05	4,34±0,21 P ₄ <0,05 P ₁₋₄ >0,05	62,6±2,5 P ₁₋₄ >0,05	41,1±2,4 P ₄ <0,001 P ₁₋₄ >0,05
5. HI-2 (1000 mg/kg)	8	5,29±0,29 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	4,61±0,31 P ₅ <0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	62,2±2,9 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	43,8±3,2 P ₅ <0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05
6. IM-2 (100 mg/kg)	8	5,91±0,32 P ₁₋₆ >0,05	3,78±0,45 P ₆ <0,05 P ₁₋₆ >0,05	61,5±3,1 P ₁₋₆ >0,05	29,5±5,0 P ₆ <0,001 P ₁₋₆ >0,05
7. IM-2 (1000 mg/kg)	8	5,81±0,32 P ₁₋₇ >0,05	4,56±0,31 P ₇ <0,05 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	60,0±2,9 P ₁₋₇ >0,05	44,6±3,2 P ₇ <0,05 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05
8. IMspp (100 mg/kg)	7	6,47±0,2 P ₁₋₈ >0,05	4,23±0,26 P ₈ <0,001 P ₁₋₈ >0,05	67,7±2,0 P ₁₋₈ >0,05	40,2±2,7 P ₈ <0,001 P ₁₋₈ >0,05
9. IMspp (1000 mg/kg)	8	6,02±0,23 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	4,36±0,14 P ₉ <0,001 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	62,5±2,1 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	41,2±1,9 P ₉ <0,001 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05

Modificarea procentului eozinofilelor, limfocitelor și monocitelor la șobolani după 30 de zile de administrare a substanțelor cercetate

Lotul	Numărul de animale	Eozinofile (%)		Limfocite (%)		Monocite (%)	
		Inițial	după 30 de zile	Inițial	după 30 de zile	Inițial	după 30 de zile
1. intact	7	2,3±0,5	1,9±0,5 P ₁ >0,05	34,4±1,8	52,3±1,2 P ₁ <0,001	5,4±1,1	3,0±0,4 P ₁ >0,05
2.HI-1 (100 mg/kg)	8	1,8±0,5 P ₁₋₂ >0,05	4,9±1,5 P ₂ >0,05 P ₁₋₂ >0,05	32,5±2,3 P ₁₋₂ >0,05	48,1±3,9 P ₂ <0,05 P ₁₋₂ >0,05	5,4±0,6 P ₁₋₂ >0,05	6,5±0,8 P ₂ >0,05 P ₁₋₂ >0,05
3.HI-1 (1000 mg/kg)	8	2,6±0,4 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	30,0±1,4 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	59,6±3,9 P ₃ <0,001 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ >0,05	5,2±0,5 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05	3,2±0,4 P ₃ >0,05 P ₁₋₃ >0,05 P ₂₋₃ >0,05
4. HI-2 (100 mg/kg)	8	2,2±0,4 P ₁₋₄ >0,05	2,8±0,6 P ₄ >0,05 P ₁₋₄ >0,05	30,5±1,8 P ₁₋₄ >0,05	51,4±2,3 P ₄ <0,001 P ₁₋₄ >0,05	5,4±0,9 P ₄ >0,05	3,6±0,5 P ₄ >0,05 P ₁₋₄ >0,05
5.HI-2 (1000 mg/kg)	8	2,6±0,6 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	1,4±0,3 P ₅ >0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	29,1±2,8 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	50,8±3,5 P ₅ <0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	6,4±0,6 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	3,5±0,6 P ₅ >0,05 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05
6. IM-2 (100 mg/kg)	8	2,8±0,7 P ₁₋₆ >0,05	3,4±0,9 P ₆ >0,05 P ₁₋₆ >0,05	29,4±1,9 P ₁₋₆ >0,05	62,9±4,8 P ₆ <0,001 P ₁₋₆ <0,05	5,0±0,8 P ₁₋₆ >0,05	3,6±0,8 P ₆ >0,05 P ₁₋₆ >0,05
7. IM-2 (1000 mg/kg)	8	2,6±0,5 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	1,9±0,5 P ₇ >0,05 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	31,2±2,5 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	50,4±3,3 P ₇ <0,001 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	6,1±0,9 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	3,1±0,5 P ₇ <0,05 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05
8. IMspp (100 mg/kg)	6	2,0±0,4 P ₁₋₈ >0,05	2,0±0,5 P ₈ >0,05 P ₁₋₈ >0,05	25,8±2,1 P ₁₋₈ >0,05	54,8±2,5 P ₈ <0,001 P ₁₋₈ >0,05	4,8±0,9 P ₁₋₈ >0,05	3,2±0,5 P ₈ >0,05 P ₁₋₈ >0,05
9. IMspp (1000 mg/kg)	8	2,4±0,5 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	1,3±0,2 P ₉ >0,05 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	29,2±1,0 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	54,1±1,9 P ₉ <0,001 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	5,6±0,8 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	3,5±0,5 P ₉ >0,05 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05

S-a constatat că la animalele cărora li s-au administrat substanțele cercetate s-a observat o scădere a numărului leucocitelor și procentului neutrofilelor. Rezultatele nu au fost semnificative față de lotul martor.

Referitor la dinamica eozinofilelor, limfocitelor și monocitelor s-a constatat că la șobolanii martor nu s-au înregistrat modificări esențiale, deși procentul eozinofilelor și monocitelor avea o tendință spre scădere. La animalele ce au ingerat substanța HI-1 în doza de 100 mg/kg, acest indice a crescut neesențial, iar la HI-1 în doză de 1000 mg/kg a provocat

RO 123368 B1

1 o creștere nesemnificativă a eozinofilelor și o scădere neesențială a monocitelor. La utili-
zarea substanțelor HI-2, IM-2 și IMspp în doză de 100 mg/kg, procentul acestora a avut
3 tendința de scădere. Substanțele menționate în ambele doze au manifestat o tendință de
scădere a procentului monocitelor.

5 La examinarea procentului limfocitelor s-a constatat la animalele martor că acesta
a oscilat între 25,8±2,1% până la 34,4±1,8%. Peste 30 de zile, atât în lotul martor, cât și la
7 cele experimentale, cu toate substanțele s-a determinat o limfocitoză marcată. S-a observat
de asemenea că la substanța HI-1 această creștere a limfocitelor a fost semnificativă pentru
9 ambele doze, dar mai pronunțată pentru cea de 1000 mg/kg. În același timp, pentru
substanța HI-2 nu s-a semnalat diferența dependentă de doză utilizată. Substanțele IM-2 și
11 IMspp au provocat o creștere a limfocitelor mai accentuată la doză de 100 mg/kg, deși
diferența cu cea de 1000 mg/kg nu a fost semnificativă. O limfocitoză mai marcată față de
13 lotul martor după 30 de zile s-a constatat la utilizarea substanțelor HI-1 în doză de
1000 mg/kg și IM-2 în doză de 100 mg/kg.

15 Cele de mai sus au dus la constatarea că substanțele cercetate pot provoca o
leucopenie față de datele inițiale, dar neesențială față de lotul martor în aceiași termeni de
17 studiu, cu o scădere neesențială a leucocitelor segmentate și o creștere a limfocitelor,
comparativ cu animalele de control după o lună de interpretare. Aceste deviații, în majoritatea
19 cazurilor nu au avut caracter dozo-dependent, deși în unele cazuri (la IM-2, IMspp și HI-2)
s-au putut evidenția unele tendințe în dependența de doză. Concomitent la 1-2 animale prin
21 utilizarea substanțelor HI-1, HI-2 și IM-2 în ambele doze s-a constatat apariția blastocitelor
1% și a 1-2% leucocite nesegmentate.

23 **Determinarea influenței substanțelor cercetate asupra unor parametri biochimici**

25 În loturile experimentale și cel de control s-a determinat un șir de parametri ce
caracterizează metabolismul glucidic, proteic și lipidic, precum și unii indici ai activității
27 funcției ficatului.

29 La determinarea concentrației glucozei în sânge, nu s-au constatat deviații esențiale
ale acestui parametru. La animalele cărora pe parcursul a 30 de zile li s-a administrat
substanța HI-1 în doze de 100 și 1000 mg/kg, s-a constatat o creștere neesențială a
31 glucozei. Același lucru s-a evidențiat și la loturile ce au ingerat substanța IM-2 în ambele
doze. În același timp, la administrarea substanțelor HI-2 și IMspp, s-a observat o tendință de
33 scădere a glicemiei, care a fost observată la doza de 100 mg/kg pentru HI-2 și la doza de
1000 mg/kg pentru IMspp.

35 Astfel, substanțele cercetate nu au provocat modificări esențiale ale nivelului glucozei
în sânge. Este necesar de menționat tendința de hiperglicemie (cu 0,26-0,41 mmol/l) la
37 substanțele HI-1 și IM-2, precum și o hipoglicemie nesemnificativă (cu 0,19-0,46 mmol/l) la
substanțele HI-2 și IMspp.

39 La determinarea proteinelor totale s-a constatat că, după 30 de zile de la administrare
cu substanțele HI-1 și IM-2, în ambele doze, crește nivelul proteinelor totale. În aceste cazuri
41 se observă un caracter dozo-dependent, deși nesemnificativ. La administrarea pe parcursul
a 30 zile a substanțelor HI-2 și IMspp, nu s-au constatat modificări esențiale ale proteinelor
43 totale. Se menționează o tendință de creștere a proteinelor totale la doza de 100 mg/kg și
una inversă la doza de 1000 mg/kg la HI-2.

45 La determinarea nivelului colesterolului total, nu s-au depistat modificări esențiale.
La substanța HI-1, după administrarea timp de 30 de zile, s-a constatat o tendință spre
47 creșterea colesterolului, dependentă de doză. În aceleași condiții, substanța IM-2 în doza de
100 mg/kg determină o tendință mai importantă spre hipocolesterolemie. La șobolanii ce au
49 ingerat timp de o lună substanța HI-2 în ambele doze, s-a constatat o tendință spre hipo-
colesterolemie.

RO 123368 B1

Astfel, substanțele HI-1 și IM-2 determină o tendință spre hiperglicemie, hipercolesterolemie și hiperproteinemie, iar substanța HI-2 o tendință spre hipoglicemie și hipocolesterolemie. Deci, substanțele examinate nu exercită modificări esențiale asupra metabolismului glucidic, lipidic și proteic.

Concomitent, au fost studiate unele enzime ce caracterizează funcția hepatocitelor. La determinarea nivelului transaminazelor s-a constatat că substanța HI-1 în ambele doze micșorează activitatea ASAT și ALAT. În acest caz, se poate vorbi despre un efect, deși nesemnificativ, dependent de doză, deci mai esențial pentru doza de 1000 mg/kg. La șobolanii ce au ingerat substanța IM-2, de asemenea s-a depistat diminuarea nivelului ASAT și ALAT. Dar în acest caz, efectul era invers ca la substanța HI-1, deci activitatea transaminazelor scădea mai evident, deși nesemnificativ ($P_{6-7} > 0,05$), ca la doza de 100 mg/kg.

După administrarea substanței HI-2 în ambele doze, peste o lună, nu s-au determinat devieri ale activității ASAT și ALAT în ser. În același timp la șobolanii ce au fost pretratați cu substanța IMspp în doză de 100 mg/kg, s-a depistat o tendință spre micșorare a nivelului ASAT (de la $1,67 \pm 0,07$ la $1,36 \pm 0,09$) și ALAT (de la $3,14 \pm 0,15$ la $2,7 \pm 0,17$), iar la doza de 1000 mg/kg o scădere semnificativă a ASAT (de la $1,67 \pm 0,07$ la $1,27 \pm 0,1$) cu o tendință spre scădere a ALAT (de la $3,14 \pm 0,15$ la $2,79 \pm 0,24$).

Astfel, substanțele HI-1 și IM-2 au provocat o scădere a activității transaminazelor, iar IMspp doar o tendință de scădere a lor, în timp ce HI-2 nu a exercitat influență asupra parametrilor respectivi.

La cercetarea activității fosfatazei alcaline s-a constatat o creștere a nivelului enzimei, după pretratarea timp de o lună cu substanțele HI-1 și IM-2 în ambele doze, fără a manifesta un caracter dozo-dependent. În același timp, la administrarea substanțelor HI-2 și IMspp, conținutul fosfatazei alcaline nu suferea modificări esențiale în dozele studiate.

În urma studiului toxicității cronice a substanțelor HI-1, HI-2, IM-2 și IMspp, se pot concluziona următoarele:

- pe parcursul utilizării substanțelor cercetate timp de 30 de zile, s-a constatat o creștere ponderală ușor mărită la animalele pretratate decât la cele martor;
- masa organelor interne, reflectată prin indicii masa organului/masa corpului, în cazul cordului, pulmonilor, ficatului, splinei, nu s-a modificat;
- substanțele cercetate pot diminua numărul leucocitelor și formelor segmentate cu creșterea în unele cazuri a limfocitelor;
- substanțele studiate nu au modificat esențial nivelul glucozei și colesterolului;
- substanțele HI-1 și IM-2 cresc nivelul proteinelor totale;
- activitatea transaminazelor este micșorată de substanțele HI-1 și IM-2 și mai puțin influențată de HI-1 și IMspp;
- substanțele HI-2 și IMspp nu influențează nivelul fosfatazei alcaline, în timp ce HI-1 și IM-2 intensifică activitatea ei.

Tabelul 18

Modificarea nivelului glucozei, proteinelor totale și colesterolului la utilizarea timp de 30 de zile a substanțelor cercetate

Lotul	Numărul de animale	Glucoză mmol/l	Proteine totale g/l	Colesterolul total mmol/l
1. intact	6	$3,93 \pm 0,07$	$51,75 \pm 1,13$	$1,6 \pm 0,15$
2. HI-1 100 mg/kg	8	$4,19 \pm 0,1$ $P_{1-2} > 0,05$	$60,29 \pm 1,55$ $P_{1-2} < 0,05$	$1,72 \pm 0,08$ $P_{1-2} > 0,05$
3. HI-1 1000 mg/kg	8	$4,19 \pm 0,21$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	$61,92 \pm 3,53$ $P_{1-3} < 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$	$1,85 \pm 0,15$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$

RO 123368 B1

Tabelul 18 (continuare)

Lotul	Numărul de animale	Glucoză mmol/l	Proteine totale g/l	Cholesterolul total mmol/l
4. HI-2 100 mg/kg	8	3,47±0,23 P ₁₋₄ >0,05	53,01±1,07 P ₁₋₄ >0,05	1,52±0,07 P ₁₋₄ >0,05
5. HI-2 1000 mg/kg	8	3,74±0,14 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	47,0±1,63 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	1,54±0,15 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05
6. IM-2 100 mg/kg	8	4,34±0,06 P ₁₋₆ >0,05	59,5±0,83 P ₁₋₆ <0,05	1,96±0,2 P ₁₋₆ >0,05
7. IM-2 1000 mg/kg	8	4,24±0,2 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05	61,37±1,64 P ₁₋₇ <0,05 P ₆₋₇ >0,05	1,62±0,07 P ₁₋₇ >0,05 P ₆₋₇ >0,05
8. IM spp 100 mg/kg	7	3,69±0,23 P ₁₋₈ >0,05	51,43±1,41 P ₁₋₈ >0,05	1,59±0,05 P ₁₋₈ >0,05
9. IM spp 1000 mg/kg	8	3,59±0,24 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	52,65±1,93 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	1,66±0,08 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05

Tabelul 19

Modificarea nivelului transaminazelor și fosfatazei alcaline la utilizarea timp de 30 de zile a substanțelor cercetate

Lotul	Numărul de animale	ASAT mmol/l	ALAT mmol/l	Fosfatasa alcalina mmol/l
1. intact	6	1,67±0,07	3,14±0,15	8256,7±674,7
2. HI-1 100 mg/kg	8	1,01±0,06 P ₁₋₂ <0,001	2,03±0,12 P ₁₋₂ <0,001	21250,0 ±2610,7 P ₁₋₂ <0,001
3. HI-1 1000 mg/kg	8	0,88±0,03 P ₁₋₃ <0,001 P ₂₋₃ >0,05	1,77±0,07 P ₁₋₃ <0,001 P ₂₋₃ >0,05	19985,5±2259,9 P ₁₋₃ <0,001 P ₂₋₃ >0,05
4. HI-2 100 mg/kg	8	1,68±0,11 P ₁₋₄ >0,05	3,14±0,23 P ₁₋₄ >0,05	7492,5±1074,1 P ₁₋₄ >0,05
5. HI-2 1000 mg/kg	8	1,67±0,12 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	3,14±0,21 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05	9057,5±597,0 P ₁₋₅ >0,05 P ₄₋₅ >0,05
6. IM-2 100 mg/kg	8	0,71±0,06 P ₁₋₆ <0,001	1,45±0,13 P ₁₋₆ <0,001	23760,0±1648,7 P ₁₋₆ <0,001
7. IM-2 1000 mg/kg	8	0,92±0,06 P ₁₋₇ <0,001 P ₆₋₇ >0,05	1,86±0,12 P ₁₋₇ <0,001 P ₆₋₇ >0,05	23958,7±1829,8 P ₁₋₇ <0,001 P ₆₋₇ >0,05
8. IM spp 100 mg/kg	7	1,36±0,09 P ₁₋₈ >0,05	2,70±0,17 P ₁₋₈ >0,05	10757,0±2121,0 P ₁₋₈ >0,05
9. IM spp 1000 mg/kg	8	1,27±0,1 P ₁₋₉ <0,05 P ₈₋₉ >0,05	2,79±0,24 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05	9847,5±1122,7 P ₁₋₉ >0,05 P ₈₋₉ >0,05

RO 123368 B1

În vederea testării compoziției farmaceutice, conform invenției, au fost selectați copii din clasa a V-a (12-13 ani) cu rezultate mediocre la învățatură, la care după utilizarea acesteia timp de 6 luni de zile s-a observat o îmbunătățire apreciabilă a capacității de concentrare și memorizare.	1 3
Complexul de substanțe extrase din pupe și apoi din substanța protectoare a ouălelor are cea mai mare influență asupra măririi potențialului de memorare și s-a constatat la persoane de vârsta a 3-a, care de multe ori își pierd capacitatea memoriei.	5 7
Compoziție farmaceutică sub formă de capsule pe bază de <i>Lymantria dispar</i> se administrează pe cale orală, dimineața sau seara, pe stomacul gol, cu o ceașcă de ceai (infuzie slabă de tei și sunătoare) sau cu un pahar de apă plată.	9
Pacienții nu mai uită atât de mult ca înainte de tratament. Își amintesc episoade petrecute cu mulți ani în urmă. Înțeleg mai repede tot ceea ce se petrece în jurul lor, iar la pacienții cu maladia Parkinson, se diminuează tremuraturul mâinilor și capului.	11 13
Tratamentul se aplică timp de 1-2 luni în perioadele de repaus intelectual sau timp de 6-8 luni în perioadele de stres sau de activitate intelectuală intensă. După câteva zile de tratament, se simte o îmbunătățire a memoriei. Primele simptome de îmbunătățire a memoriei s-au resimțit după 5-6 zile. Pacientul își aduce aminte detalii din tinerețe.	15 17

1

Revendicare

3

Procedeu de preparare a unei compoziții farmaceutice pe bază de *Lymantria dispar* pentru stimularea memoriei omului, în care: se recoltează ouă și pupe de *Lymantria dispar* de pe tulpinile stejarilor afectați, se separă materialul protector din pupe și puf cu un conținut de 383 mg/100 g proteine, 408/100 g Mg și 345 mg/100g P, se spală de 2...3 ori cu apă distilată, se dispersează timp de 15...20 min în ser fiziologic din 9,0 mg NaCl la 1,0 l apă distilată, se filtrează și se esorează, iar opțional se congelează la temperatura de -15...-20°C, apoi se mărunțește fin, până la 5...10 μm, prin destrucție fizico-mecanică, într-o moară cu bile cu o turație de 15000...20000 rot/min, până când rezultă o pastă de culoare gri, care se usucă până la umiditatea de 5...6%, se mărunțește într-o moară cu bile până la obținerea unor fracții cu mărimea de 50...90 mesh, rezultând o fosfoproteină cu compoziția de 680 mg fosfor, 310 mg magneziu și 150 mg calciu la 100 g produs, după care se amestecă într-o moară cu bile cu pulbere de amidon, într-un raport gravimetric fosfoproteină/amidon de 1/9...1/1, până la obținerea unei mase omogene de culoare gri, apoi se omogenizează cu un agitator rotativ timp de 30...40 min și se încorporează în capsule de gelatină tip N 1.

5

7

9

11

13

15

