



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01338**

(22) Data de depozit: **07.12.2011**

(41) Data publicării cererii:  
**28.06.2013** BOPI nr. **6/2013**

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE  
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ  
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• CRIVINEANU MARIA,  
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR. 210, BL. V40,  
AP. 3, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;  
• PAPUC CAMELIA PUIA, BD. UVERTURII  
NR.87, BL. 014A, SC.C, ET.3, AP.61,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CRÎNGANU DAN,  
STR. SERG. NIȚU VASILE NR. 33,  
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

• NICORESCU VALENTIN RĂZVAN,  
STR. VALEA OLTULUI NR.139-141, BL.A,  
SC.2, AP.28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• PREDESCU NICOLETA CORINA,  
CALEA VĂCĂREȘTI NR. 207, BL.85B,  
SC. A, ET. 7, AP. 28, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• NICORESCU ISABELA MĂDĂLINA,  
STR. VALEA OLTULUI NR. 139-141, BL. A,  
SC. 2, AP. 28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO

Această publicație include și modificările descrierii,  
revendicărilor și desenelor, depuse conform art. 35,  
alin. (20), din HG nr. 547/2008.

(54) **EXTRACT POLIFENOLIC DE UZ VETERINAR UTILIZAT CA  
ADJUVANT ÎN CHIMIOTERAPIA ANTICANCEROASĂ  
(CHIMIOHELP)**

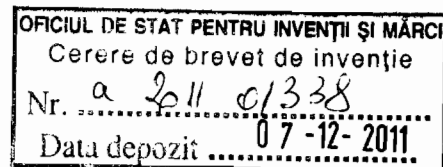
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs cu proprietăți antioxidante, utilizat ca adjuvant în tratamentul cu citostatice la animale. Produsul conform invenției constă dintr-un concentrat polifenolic, extras dintr-un material vegetal constituit din fructe de afin (*Vaccinium myrtillus*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*), părți aeriene de sunătoare

(*Hypericum perforatum*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*), în raport masic 2:1:1:0, 5:0, 5, cu o concentrație de polifenoli de 5 g echivalent acid galic/100 ml și un conținut de zaharoză de 40%.

Revendicări: 1





## DESCRIEREA INVENȚIEI CU TITLUL:

### **EXTRACT POLIFENOLIC DE UZ VETERINAR UTILIZAT CA ADJUVANT ÎN CHIMIOTERAPIA ANTICANCEROASĂ (CHIMIOHELP)**

Prezenta invenție se referă la un produs natural sub forma de sirop, cu proprietăți puternic antioxidante, de uz veterinar, destinat animalelor bolnave de cancer supuse unui tratament chimioterapic.

Produsul este constituit dintr-un concentrat polifenolic extras din: fructe de afin (*Vaccinium myrtillus*), părți aeriene de sunătoare (*Hypericum perforatum*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*), cu o concentrație în polifenoli de 5 g echivalent acid galic/100 ml (5 g GAE/100 ml) și un conținut în sucroză de 40%. Extracția polifenolilor s-a efectuat, după spălarea și uscarea menajata a plantelor, cu un solvent organic netoxic.

Preparatul prezintă *activitate antioxidantă, reduce toxicitatea citostaticelor și chimiorezistența tumorilor*. Aceste proprietăți au fost testate în laboratoarele și clinica Facultății de Medicină Veterinară București.

Rezultatele obținute indică următoarele proprietăți ale preparatului:

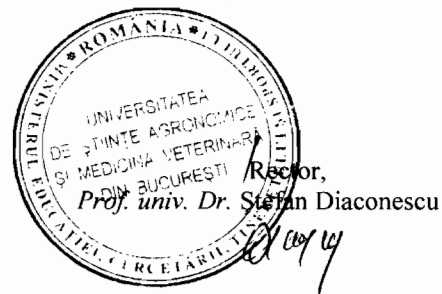
#### **Activitatea antioxidantă**

*Studii in vitro.* Extractul prezintă abilitatea de a anihila speciile reactive de oxigen (radicalul hidroxil, anionul superoxid, peroxidul de hidrogen, oxigenul singlet, anionul hipoclorit) și speciile reactive de azot (oxidul nitric); inhibă procesul de oxidare a acizilor grași polinesaturați; acționează ca chelator al ionilor metalelor tranziționale, în special a ionului  $Fe^{2+}$  considerat un generator de radicali hidroxil în reacția Fenton.

*Studii in vivo.* Experimentele efectuate pe șobolani au demonstrat că la nivel hepatic, acest extract îmbunătățește activitatea enzimelor antioxidante catalaza (CAT), glutation peroxidaza (GPx), superoxid dismutaza (SOD), crește nivelul glutationului redus și scade concentrația compușilor care reacționează cu acidul tiobarbituric (malondialdehida, MDA). Experimentele efectuate pe animale de companie (câini) au demonstrat că preparatul crește activitatea enzimelor antioxidante eritrocitare r-CAT, r-SOD și r-GPX și scade nivelul malondialdehidei eritrocitare r-MDA.

Director proiect,  
Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu

1



**Reducerea toxicității citostatice.** Cercetările efectuate pe șobolani și animale de companie (câini) au demonstrat că administrarea concomitentă a citostatice (ciclofosamidă, ifosfamidă, gemcitabină, vincristină, citozin-arabinozidă) cu preparatul CHIMIOHELP a determinat ameliorarea nivelului parametrilor biochimici markeri ai citolizei hepatice (alanil-aminotransferaza, aspartat-aminotransferaza, fosfataza alcalină) și creșterea nivelului albuminei serice.

**Reducerea chimiorezistenței tumorilor.** Cercetările efectuate pe cățele cu tumori mamare au demonstrat că administrarea extractului polifenolic obținut din afin, sunătoare, cătină, păducel și rostopască în paralel cu schema de administrare a chimioterapicelor a determinat scăderea chimiorezistenței față de chimioterapicele administrate.

### **Stadiul actual al cunoștințelor în domeniul reducerii chimiorezistenței tumorilor sub acțiunea polifenolilor extrași din plante**

Rezistența tumorilor la acțiunea citostatice constituie principala cauză a eșecurilor și ineficienței terapiei citostatice cu un chimioterapic sau concomitent față de mai multe medicamente anticanceroase. Această rezistență, congenitală sau dobândită, este cunoscută în literatura de specialitate sub denumirea de rezistență multidrog (Multi Drug Resistance - MDR).

La ora actuală sunt căutate strategii pentru evitarea, prevenirea sau depășirea instalării rezistenței multidrog. Dintre strategiile abordate menționăm prevenirea apariției în cursul terapiei a MDR prin utilizarea mai multor citostatice alternativ și la doze maxim tolerate și administrarea de substanțe adjuvante, inclusiv antioxidanți naturali.

Astfel, o strategie interesantă este utilizarea unor polifenoli din plante. Această strategie rezolvă două procese majore:

1. Anihilarea radicalilor liberi care apar în urma acțiunii stresului oxidativ instituit de starea psihică, tratamentul medicamentos, procesele de multiplicare a celulelor maligne, precum și din procesele celulare normale existente într-un organism, dar și chelatarea ionilor metalelor tranzitionale (acțiune antioxidantă);

2. Modularea activității unor proteine și enzime implicate în procesele de transport și metabolizare a citostatice.

La pacienții cu diferite forme de cancer s-a constatat că radicalii liberi rezultați în urma diferitelor procese oxidative, ca și în urma acțiunii chimioterapicelor anticanceroase, induc stres oxidativ, care generează procese secundare cum ar fi modificarea permeabilității membranelor celulare. Aceste procese oxidative se repercutează asupra stării de sănătate a

pacienților, determinând agravarea acestora, sau, în cazul chimioterapiei, pot contribui la instalarea rezistenței față de medicamentul administrat.

Studiile efectuate au demonstrat că agenții antineoplazici induc, din cauza toxicității lor, reducerea capacității organismului de a anihila radicalii liberi și în consecință favorizează peroxidarea lipidică la nivelul acizilor grași din membrana celulară. Procesele de peroxidare la nivelul fosfolipidelor din constituția citomembranelor se repercutează asupra funcțiilor de transport citotransmembranare, afectând permeabilitatea acestora.

**Prezentarea soluției tehnice a invenției, cu evidențierea elementelor de creație științifică sau tehnică originale care rezolvă problema menționată**

Datele din literatura de specialitate referitoare la efectul polifenolilor asupra statusului antioxidant al animalelor supuse chimioterapiei precum și asupra rezistenței multitrog și efectului de reducere a toxicității chimioterapicelor sunt insuficiente și contradictorii. Suplimentar, cercetătorii au studiat fie caracterul antioxidant al unor extracte din plante, fie efectul rezistenței multitrog, fie toxicitatea chimioterapicelor. Cele 3 probleme majore apărute în terapia anticanceroasă nu au fost studiate în interacțiune.

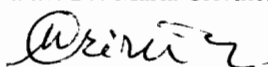
CHIMIOHELP este un produs netoxic obținut din plante medicinale din flora spontană a României, bogat în polifenoli cu activitate antioxidantă, cu efecte benefice asupra statusului antioxidant al pacienților supuși unor scheme de tratament cu medicamente anticanceroase. Acest produs îmbunătățește funcția hepatică și ajută la scăderea rezistenței multitrog a animalelor supuse chimioterapiei. Produsul CHIMIOHELP nu are efecte secundare, este ieftin și poate fi comercializat cu ușurință prin intermediul farmaciilor veterinare.

**Problemele pe care le rezolvă invenția**

CHIMIOHELP rezolvă următoarele probleme:

- anihilează speciile reactive de oxigen (ROS) și azot (RNS) puse în libertate sub acțiunea stresului provocat de boala neoplazică, dar și de medicamentele antitumorale administrate (chimioterapice);
- îmbunătățește activitatea enzimelor antioxidante care intervin în procesele de anihilare ale ROS și RNS;
- mărește nivelul glutatoniului redus la nivel hepatic;
- reduce procesul de oxidare a lipidelor din membranele celulare îmbunătățind potențialul de membrană și permeabilitatea membranelor;
- exercită efect hepatoprotector;

Director proiect,  
Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu



3



Rector,  
Prof. univ. Dr. Ștefan Diaconescu

- scade rezistența multidrog față de chimioterapice îmbunătățind în acest mod efectul antitumoral al acestor produse terapeutice.

**Forma de ambalare și livrare.** Produsul va fi comercializat în sticle de culoare brună de 100, 500 și 1000 ml sub formă de sirop cu un conținut de 40% sucroză.

#### Exemple de utilizare a produsului

- **Exemplul nr. 1 - utilizarea CHIMIOHELP în schemele de tratament cu chimioterapice la câini cu tumori mamare**

Protocolul experimental care s-a aplicat în cazul cățelelor cu tumori mamare surprinse în stadiile de evoluție T<sub>1</sub> și T<sub>2</sub> este prezentat în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Schema de tratament cu citostatice și CHIMIOHELP la cățele cu tumori mamare surprinse în stadiile T<sub>1</sub> și T<sub>2</sub>

Săptămâna	Tratament cu chimioterapice și CHIMIOHELP		Tratament cu chimioterapice	
	Chimioterapic	CHIMIOHELP (mg GAE/kg)	Chimioterapic	CHIMIOHELP (mg GAE/kg)
1	Ciclofosfamidă - 50 mg/m <sup>2</sup> /zi 4 zile consecutiv Covinan (proligeston) – 1 ml (100 mg)/10 kg, o administrare în prima zi	5 mg/kg zilnic	Ciclofosfamidă - 50 mg/m <sup>2</sup> /zi 4 zile consecutiv Covinan (proligeston) – 1 ml (100 mg)/10 kg, o administrare în prima zi	-
2	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
<b>INTERVENȚIE CHIRURGICALĂ (MASTECTOMIE)</b>				
3	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
4	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
5	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m <sup>2</sup> /zi 2 zile consecutiv	5 mg/kg zilnic	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m <sup>2</sup> /zi 2 zile consecutiv	-
6	Gemcitabină - 200 mg/m <sup>2</sup> o administrare	5 mg/kg zilnic	Gemcitabină - 200 mg/m <sup>2</sup> o administrare	-
7	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
8	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
9	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
10	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m <sup>2</sup> /zi 2 zile consecutiv	5 mg/kg zilnic	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m <sup>2</sup> /zi 2 zile consecutiv	-
11	Gemcitabină - 200 mg/m <sup>2</sup> o administrare	5 mg/kg zilnic	Gemcitabină - 200 mg/m <sup>2</sup> o administrare	-

#### Rezultate scontate

##### Îmbunătățirea statusului antioxidant sub influența preparatului CHIMIOHELP

Administrarea preparatului polifenolic la câini cu tumori mamare, tratați cu citostatice și supuși mastectomiei (conform tabelului 1), a determinat creșterea valorilor enzimelor antioxidante eritrocitare superoxid dismutaza (r-SOD), catalaza (r-CAT), glutation peroxidaza (r-GPx), scăderea concentrației malondialdehidei eritrocitare (r-MDA) și creșterea concentrației glutationului redus (r-GSH). La câinii care nu s-au beneficiat de preparatul

CHIMIOHELP, activitatea enzimelor antioxidante eritrocitare (r-SOD, r-CAT, r-GPx) a scăzut, iar nivelul malondialdehidei a crescut. O scădere semnificativă a fost înregistrată și la nivelul glutatationului redus din eritrocite (Tabelul nr. 2). Aceste rezultate demonstrează scăderea nivelului procesului de oxidare a lipidelor la nivelul membranei eritrocitare și îmbunătățirea statusului antioxidant.

Tabelul nr. 2

Activitatea superoxid dismutazei eritrocitare (r-SOD), catalazei eritrocitare (r-CAT), glutatation peroxidazei eritrocitare (r-GPx), concentrația malondialdehidei eritrocitare și a glutatationului redus (r-GSH)

	Câini cu tumori mamare tratați cu citostatice și CHIMIOHELP					Câini cu tumori mamare tratați cu citostatice				
	r-SOD (U/gHb)	r-CAT (U/mgHb)	r-GPx (U/μmoli/NADPH/gHb/min)	r-MDA (μmol/g Hb)	r-GSH (mg/g Hb)	r-SOD (U/g Hb)	r-CAT (U/mg Hb)	r-GPx (U/ U/μmoli/NADPH/gHb/min)	r-MDA (μmol/g Hb)	r-GSH (mg/g HB)
Control	125,3	400,2	39,3	0,31	35,1	125,3	400,2	39,3	0,31	35,1
ziua 0 (înainte de tratament)	99,5	378,2	30,9	0,47	21,4	88,5	380,2	27,1	0,55	21,1
săptămâna 2	99,4	377,3	31,0	0,47	20,1	89,1	380,3	27,5	0,57	19,2
săptămâna 6	101,3	387,1	31,9	0,41	19,7	89,1	380,2	27,1	0,46	19,1
săptămâna 7	101,2	388,9	32,1	0,39	22,8	87,3	372,5	26,7	0,48	17,8
săptămâna 11	109,7	390,0	34,1	0,35	24,3	84,2	364,5	26,0	0,65	16,5

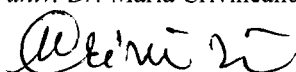
\*Valorile prezentate sunt media a 5 determinări

#### Efectul hepatoprotector al preparatului CHIMIOHELP

Introducerea în schema de tratament a produsului CHIMIOHELP, conform tabelului 1, a determinat reducerea efectelor toxice ale citostaticelor la nivelul ficatului. Datorită efectului hepatoprotector exercitat de produsul CHIMIOHELP, activitatea enzimelor serice fosfataza alcalină (ALP), aspartat-aminotransferaza (AST), alanil-aminotransferaza (ALT) și lactat-dehidrogenaza (LDH) a fost îmbunătățită. La câinii care nu au beneficiat de CHIMIOHELP, activitatea enzimelor serice menționate a crescut, ceea ce demonstrează intensificarea procesului de citoliza la nivel hepatic (Tabelul nr. 3).

Astfel, se observă că valorile activității acestor enzime sunt crescute de 3-4 ori față de cele normale în cazul pacienților cu tumori mamare tratați numai cu citostatice, spre deosebire de pacienții cărora li s-au administrat pe lângă citostatice și extracte polifenolice vegetale, la care valorile activității acestor enzime sunt peste limitele normale, ajungând doar până la dublul valorilor normale, și aceasta numai în unele cazuri. Aceste observații indică faptul că polifenolii extrași din plante, prin acțiunea lor antioxidantă, reduc toxicitatea hepatică a chimioterapicelor citostatice folosite în terapia cancerului mamar.

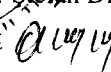
Director proiect,  
Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu



5



Reactor,  
Prof. univ. Dr. Ștefan Diaconescu



	- 0,5 mg/kg zilnic		- 0,5 mg/kg zilnic	
5	Pauză	10 mg/kg zilnic	Pauză	-
6	Pauză	10 mg/kg zilnic	Pauză	-
7	Vincristină - 0,7 mg/m <sup>2</sup> o administrare Cytosar (citozin-arabinozidă) - 100 mg/m <sup>2</sup> o administrare	10 mg/kg zilnic	Vincristină - 0,7 mg/m <sup>2</sup> o administrare Cytosar (citozin-arabinozidă) - 100 mg/m <sup>2</sup> o administrare	-
8	Vincristină - 0,7 mg/m <sup>2</sup> o administrare	10 mg/kg zilnic	Vincristină - 0,7 mg/m <sup>2</sup> o administrare	-
9	Vincristină - 0,7 mg/m <sup>2</sup> o administrare Cytosar (citozin-arabinozidă) - 100 mg/m <sup>2</sup> o administrare	10 mg/kg zilnic	Vincristină - 0,7 mg/m <sup>2</sup> o administrare Cytosar (citozin-arabinozidă) - 100 mg/m <sup>2</sup> o administrare	-

### Rezultate scontate

#### Îmbunătățirea statusului antioxidant sub influența preparatului CHIMIOHELP

Administrarea CHIMIOHELP concomitent cu chimioterapia, la un câine cu limfom celular de tip B a determinat, după 9 săptămâni de tratament, creșterea ușoară a activității enzimelor antioxidante celulare r-SOD, r-CAT, r-GPx, scăderea nivelului malondialdehidei eritrocitare (r-MDA) și creșterea nivelului glutationului redus (r-GSH). În cazul administrării numai a chimioterapicelor, nivelul enzimelor antioxidante a scăzut puternic pe parcursul celor 9 săptămâni, iar procesul de peroxidare lipidică la nivelul acizilor grași polinesaturați s-a intensificat (a crescut nivelul r-MDA). Administrarea chimioterapicelor s-a repercutat și asupra nivelului r-GSH, la acest parametru fiind înregistrată o puternică scădere a concentrației (Tabelul nr. 5).

Tabelul 5

Activitatea superoxid dismutazei eritrocitare (r-SOD, catalazei eritrocitare (r-CAT), glutation peroxidazei eritrocitare (r-GPx), concentrația malondialdehidei eritrocitare și concentrația glutationului redus (r-GSH)

	Câine cu limfom celular B tratat cu citostatice și CHIMIOHELP					Câine cu limfom celular B tratat cu citostatice				
	r-SOD (U/gHb)	r-CAT (U/mgHb)	r-GPx (U/μmoli/NADPH /gHb/min)	r-MDA (μmol/g Hb)	r-GSH (mg/g Hb)	r-SOD (U/g Hb)	r-CAT (U/mg Hb)	r-GPX (U/μmoli/NADPH /gHb/min)	r-MDA (μmol/g Hb)	r-GSH (mg/g Hb)
Control	115,7	408,2	37,6	0,28	32,1	127,1	389,9	38,5	0,29	33,2
ziua 0 (înainte de tratament)	77,2	345,2	29,8	0,55	19,2	88,5	355,7	22,9	0,64	27,4
săptămâna 2	75,2	345,1	28,7	0,56	19,3	87,1	345,8	21,2	0,64	26,4
săptămâna 4	74,7	339,9	27,9	0,47	18,6	81,7	339,9	20,9	0,71	26,4
săptămâna 8	74,2	389,9	28,2	0,47	18,7	80,3	330,7	20,9	0,79	22,9
săptămâna 9	80,9	393,5	29,9	0,39	20,1	78,7	315,1	17,7	0,88	19,9

Director proiect,  
Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu



*Efectul hepatoprotector al preparatului CHIMIOHELP*

La fel ca și în cazul câinilor cu tumori mamare, introducerea în schema de tratament a produsului CHIMIOHELP alături de terapia citostatică a determinat reducerea efectelor toxice ale citostaticelor la nivelul ficatului în cazul câinelui cu limfom B celular. Datorită efectului hepatoprotector exercitat de produsul CHIMIOHELP, activitatea enzimelor serice fosfataza alcalină (ALP), aspartat-aminotransferaza (AST), alanil-aminotransferaza (ALT) și lactat-dehidrogenaza (LDH) a fost îmbunătățită (tabelul nr. 6).

Tabelul nr. 6

Activitatea enzimelor markeri ai citolizei hepatice: fosfataza alcalină (ALP), aspartat transaminaza (AST), alanil transaminaza (ALT) și lactat dehidrogenaza (LDH) la pacienții cu limfom B celular

	Câine cu limfom celular B tratat cu citostatice și CHIMIOHELP				Câine cu limfom celular B tratat cu citostatice			
	ALP (U/l)	AST (U/l)	ALT (U/l)	LDH (U/l)	ALP (U/l)	AST (U/l)	ALT (U/l)	LDH (U/l)
Control	90,5	22,4	28,5	153,9	90,5	22,4	28,5	153,9
ziua 0 (înainte de tratament)	146,2	27,3	29,5	321,4	134,5	39,1	32,1	301,4
săptămâna 2	159,2	39,1	35,6	384,3	200,5	60,5	40,8	389,3
săptămâna 4	198,2	46,2	72,1	467,3	224,8	80,1	80,3	499,2
săptămâna 8	259,5	52,7	89,4	621,4	250,6	91,9	97,3	732,9
săptămâna 9	241,7	49,9	76,2	750,3	289,3	90,5	113,2	803,7

Asocierea CHIMIOHELP cu chimioterapia citostatică a condus la o ușoară creștere a concentrației albuminelor plasmatice însoțită de scăderea concentrației gamma-globulinelor, comparativ cu câinele tratat doar cu chimioterapie citostatică (tabelul nr. 7).

Tabelul nr. 7

Profilul electroforetic al proteinelor plasmatice la câinele diagnosticat cu limfom B celular și tratat cu chimioterapie și CHIMIOHELP și la câinele tratat numai cu chimioterapie

	Câine tratat cu citostatice și mix CHIMIOPROTECT					Câine tratat cu citostatice				
	Albumine %	α1-globuline %	α2-globuline %	β-globuline %	γ-globuline %	Albumine %	α1-globuline %	α2-globuline %	β-globuline %	γ-globuline %
Control (animal sănătos)	68,5	4,1	8,8	9,1	9,5	68,5	4,1	8,8	9,1	9,5
ziua 0 (înainte de tratament)	40,4	6,2	12,1	9,2	32,1	42,3	5,8	11,9	9,5	30,5
săptămâna 2	37,3	8,2	12,3	9,5	33,7	35,1	9,9	11,8	9,7	33,5
săptămâna 4	35,2	8,7	11,9	9,3	34,9	29,7	9,9	10,6	10,1	39,7
săptămâna 8	37,8	9,5	9,6	9,0	34,1	30,2	9,2	10,0	9,9	40,7
săptămâna 9	40,0	8,9	9,9	8,1	33,1	29,4	9,5	10,2	9,4	41,5

Director proiect,  
Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu

*Dr. Crivineanu*



Rector  
Prof. univ. Dr. Ștefan Diaconescu



### *Reducerea rezistenței multidrogh sub influența preparatului CHIMIOHELP*

Evaluarea eficienței tratamentului la câinii cu limfom B celular a fost apreciată prin variația proteinei Bence-Jones și a proteinei M.

Proteina Bence Jones, reprezentată de lanțuri ușoare ale imunoglobulinelor este biosintetizată în celulele neoplazice. Această proteină este prezentă în sângele pacienților cu mielom, dar și în urina lor datorită filtrării renale deficitare și are masa moleculară cuprinsă între 22 – 24 kDa. Proteina Bence Jones a fost detectată în urina câinilor cu mielom multiplu pe tot parcursul efectuării tratamentului, însă analiza electroforetică efectuată în acrilamidă în condiții denaturante a relevat prezența în cantitate mare a acestei proteine în sângele câinilor cu mielom multiplu înainte de tratament și în cantitate mult mai mică în sângele câinilor cu mielom multiplu tratați cu citostatice și cu citostatice asociate cu extract polifenolic. Cel mai mic spot pentru proteina Bence-Jones a fost observat în serul provenit de la câinele cu mielom tratat cu citostatice și mix polifenolic. Aceste rezultate demonstrează eficiența tratamentului chimioterapic citostatic asociat cu mixul polifenolic.

În literatura de specialitate, proteina M este descrisă ca fiind o proteină care apare doar în tumorile de tip limfom B celular (mielom multiplu). În privința proteinei M, scăderea concentrației gamma-globulinelor poate fi atribuită scăderii concentrației proteinei M în sângele pacientului diagnosticat cu mielom multiplu tratat cu citostatice și extract polifenolic (tabelul nr. 7).

Director proiect,  
Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu



Prof. univ. Dr. Ștefan Diaconescu

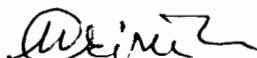
Rector



## REVENDICARE

1. Produs constituit dintr-un concentrat polifenolic extras din fructe de afin (*Vaccinium myrtillus*), părți aeriene de sunătoare (*Hypericum perforatum*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*), cu o concentrație în polifenoli de 1...20 g echivalent acid galic/100 ml (g GAE/100ml) și un conținut în sucroză de 10... 40%, caracterizat prin aceea că poate fi utilizat ca adjuvant în tratamentul cu citostatice (chimioterapie) la animale.

Director proiect,  
Prof. univ. Dr. Maria Crivineanu



10



Prof. univ. Dr. Ștefan Diaconescu

**DESCRIEREA INVENȚIEI CU TITLUL:**  
**EXTRACT POLIFENOLIC DE UZ VETERINAR UTILIZAT CA**  
**ADJUVANT ÎN CHIMIOTERAPIA ANTICANCEROASĂ (CHIMIOHELP)**

Invenția se referă la un produs natural sub formă de extract polifenolic obținut din plante, cu proprietăți puternic antioxidante, utilizat ca adjuvant în chimioterapia anticanceroasă la animale.

**Stadiul tehnicii**

*Stadiul actual al cunoștințelor referitor la activitatea antioxidantă a polifenolilor*

*Studii in vitro.* Se cunoaște faptul că polifenolii: prezintă abilitatea de a anihila speciile reactive de oxigen (radicalul hidroxil, anionul superoxid, peroxidul de hidrogen, oxigenul singlet, anionul hipoclorit) și speciile reactive de azot (oxidul nitric), inhibă procesul de oxidare a acizilor grași polinesaturați, acționează ca chelatori ai ionilor metalelor tranziționale, în special ai ionului  $Fe^{2+}$ , considerat un generator de radicali hidroxil în reacția Fenton.

*Studii in vivo.* Experimentele efectuate pe șobolani au demonstrat că, la nivel hepatic, polifenolii îmbunătățesc activitatea enzimelor antioxidante catalaza (CAT), glutation peroxidaza (GPx), superoxid dismutaza (SOD), cresc nivelul glutationului redus și scad concentrația compușilor care reacționează cu acidul tiobarbituric (malondialdehida - MDA).

*Stadiul actual al cunoștințelor în domeniul reducerii chimiorezistenței tumorilor*

Se cunoaște faptul că rezistența tumorilor la acțiunea citostaticelor constituie principala cauza a eșecurilor și ineficienței terapiei citostatice cu un chimioterapic sau concomitent față de mai multe medicamente anticanceroase. Această rezistență, congenitală sau dobândită, este cunoscută în literatura de specialitate sub denumirea de rezistență multidrog (Multi Drug Resistance - MDR).

La ora actuală sunt căutate strategii pentru evitarea, prevenirea sau depășirea instalării rezistenței multidrog. Dintre strategiile abordate menționăm prevenirea apariției MDR în cursul terapiei prin utilizarea mai multor citostatice, alternativ și la doze maxim tolerate, precum și administrarea de substanțe adjuvante, inclusiv antioxidanți naturali.

Soluțiile cunoscute din stadiul tehnicii prezintă următoarele **dezavantaje**:

Datele din literatura de specialitate referitoare la efectul polifenolilor asupra statusului antioxidant al animalelor supuse chimioterapiei, asupra rezistenței multitrog, precum și asupra reducerii toxicității chimioterapicelor sunt insuficiente. Cercetătorii au studiat fie caracterul antioxidant al unor extracte din plante, fie efectul rezistenței multidrog, fie toxicitatea chimioterapicelor citostatice. Cele 3 probleme majore apărute în terapia anticanceroasă nu au fost studiate în interacțiune.

**Problema tehnică pe care o rezolvă invenția** constă în îmbunătățirea statusului antioxidant al animalelor supuse chimioterapiei, cu ajutorul unei compoziții fitoterapeutice cu efect adjuvant.

Astfel, **obiectivul invenției** constă în obținerea și utilizarea unui produs natural, constituit în principal din polifenoli, cu efect puternic antioxidant.

Acest produs prezintă două acțiuni majore:

1. Anihilarea radicalilor liberi care apar în urma acțiunii stresului oxidativ instituit de starea psihică, tratamentul medicamentos, procesele de multiplicare a celulelor maligne, precum și chelatarea ionilor metalelor tranziționale (acțiune antioxidantă).

La pacienții cu diferite forme de cancer s-a constata că radicalii liberi rezultați în urma diferitelor procese oxidative, ca și în urma acțiunii chimioterapicelor anticanceroase, induc stres oxidativ, care generează procese secundare cum ar fi modificarea permeabilității membranelor celulare. Aceste procese oxidative se repercutează asupra stării de sănătate a pacienților, determinând agravarea acesteia, sau, în cazul chimioterapiei, pot contribui la instalarea rezistenței față de medicamentul administrat.

Studiile efectuate au demonstrat că agenții antineoplazici induc, din cauza toxicității lor, reducerea capacității organismului de a anihila radicalii liberi și în consecință favorizează peroxidarea lipidică la nivelul acizilor grași din membranele celulare. Procesele de peroxidare la nivelul fosfolipidelor din constituția citomembranelor se repercutează asupra funcțiilor de transport citotransmembranar, afectând permeabilitatea acestora.

2. Modularea activității unor proteine și enzime implicate în procesele de transport și metabolizare a citostaticelor.

### **Expunerea invenției**

Invenția constă dintr-un produs natural sub forma de sirop, care are un conținut în polifenoli de 5 g echivalent acid galic (EAG)/100 ml, polifenolii fiind extrași din fructe de

afin (*Vaccinium myrtillus*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*), părți aeriene de sunătoare (*Hypericum perforatum*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*), acești polifenoli fiind ulterior dizolvați într-o soluție etanolică de zaharoză de concentrație 40%.

Produsul natural, conform invenției, prezintă următoarele **avantaje**:

- prezintă activitate antioxidantă (anihilează radicalii liberi generați de boala canceroasă și de chimioterapie) și reglează activitatea enzimelor antioxidante;
- reduce toxicitatea citostaticelor;
- reduce chimiorezistența tumorilor;
- are efect hepatoprotector;
- nu interferă în linia metabolică a altor medicamente;
- este netoxic și nu are efecte adverse.

Forma de prezentare a preparatului aleasă, respectiv sirop alcoolic, are ca avantaj absorbția eficientă la nivelul tubului digestiv a substanțelor active conținute, asigurând o biodisponibilitate crescută a principiilor active asociate în acest produs, precum și administrarea facilă la animale, având în vedere faptul că preparatul este de uz veterinar.

Alegerea plantelor menționate este susținută de datele existente în literatura de specialitate. Astfel, se cunoaște faptul că fructele de afin sunt bogate în polifenoli (flavonoide și antociani) cu efect puternic antioxidant, care oferă protecție membranelor lipozomale contra proceselor oxidative. Antocianii din fructele de afin au efect hipoglicemiant, cardioprotectiv, neuroprotectiv, antiinflamator, genoprotectiv și anticancerigen. Studiile efectuate au demonstrat că polifenolii extrași din fructe de cătină au efect antioxidant puternic, antiinflamator și antiproliferativ în cancerul de colon și ficat. Polifenolii extrași din fructele de păducel au efect antioxidant, hepatoprotectiv, gastroprotectiv, diuretic, radioprotectiv, imunostimulator, anticancerigen și antidepresiv. Părțile aeriene de sunătoare sunt bogate în flavonoide, rutină, quercitină, kaempferol și hipericină. Acești compuși polifenolici au activitate antioxidantă, antidepresivă și anticancerigenă. Părțile aeriene de rostopască conțin polifenoli și alcaloizi cu proprietăți terapeutice. Apigenina, polifenol extras din rostopască, prezintă activitate anticancerigenă, antioxidantă și modulează rezistența multidrog.

Produsul natural realizat conform invenției nu interferă în linia metabolică a altor medicamente, nu prezintă efecte secundare și nu creează reacții adverse. Doza recomandată este între 5 și 10 mg EAG polifenoli/kg.

Se prezintă în continuare **un mod de realizare a invenției.**

Materialul vegetal utilizat constă din fructe de afin (*Vaccinium myrtillus*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*), părți aeriene de sunătoare (*Hypericum perforatum*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*) amestecate în proporție de 2: 1: 1: 0,5: 0,5 (m/m'/m/m/m), în stare uscată și măcinată. Materialul vegetal se supune unei extracții prin agitare la reflux timp de 3 h, cu alcool etilic 60%. După răcire, soluția extractivă se separă prin filtrare la presiune normală. După obținere, soluția extractivă este concentrată la presiune scăzută (150 mm col. Hg) până la evaporarea completă a etanolului. Reziduul obținut se dizolvă într-o soluție de zaharoză 40% preparată în etanol 60%, până la o concentrație în polifenoli de 5 g echivalent acid galic (EAG)/100 ml.

Se prezintă în continuare **un exemplu de utilizare a produsului.**

*Utilizarea produsului natural CHIMIOHELP în schemele de tratament cu chimioterapice la câini cu tumori mamare*

**Testări farmaco-clinice.** Protocolul experimental care s-a aplicat în cazul cățelelor cu tumori mamare surprinse în stadiile de evoluție T<sub>1</sub> și T<sub>2</sub> este prezentat în tabelul nr. 1.

*Tabelul nr. 1*

Schema de tratament cu citostatice și CHIMIOHELP la cățele cu tumori mamare surprinse în stadiile T<sub>1</sub> și T<sub>2</sub>:

Săptămâna	Tratament cu chimioterapice și CHIMIOHELP		Tratament cu chimioterapice	
	Chimioterapic	CHIMIOHELP (mg EAG/kg)	Chimioterapic	CHIMIOHELP (mg EAG/kg)
1	Ciclofosfamidă - 50 mg/m <sup>2</sup> /zi 4 zile consecutiv Covinan (proligeston) - 1 ml (100 mg)/10 kg, o administrare în prima zi	5 mg/kg zilnic	Ciclofosfamidă - 50 mg/m <sup>2</sup> /zi 4 zile consecutiv Covinan (proligeston) - 1 ml (100 mg)/10 kg, o administrare în prima zi	-
2	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
<b>INTERVENȚIE CHIRURGICALĂ (MASTECTOMIE)</b>				
3	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
4	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
5	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m <sup>2</sup> /zi 2 zile consecutiv	5 mg/kg zilnic	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m <sup>2</sup> /zi 2 zile consecutiv	-
6	Gemcitabină - 200 mg/m <sup>2</sup> o administrare	5 mg/kg zilnic	Gemcitabină - 200 mg/m <sup>2</sup> o administrare	-
7	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
8	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
9	Pauză	5 mg/kg zilnic	Pauză	-
10	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m <sup>2</sup> /zi 2 zile consecutiv	5 mg/kg zilnic	Holoxan (ifosfamidă) - 200 mg/m <sup>2</sup> /zi 2 zile consecutiv	-
11	Gemcitabină - 200 mg/m <sup>2</sup> o administrare	5 mg/kg zilnic	Gemcitabină - 200 mg/m <sup>2</sup> o administrare	-

- *Îmbunătățirea statusului antioxidant sub influența produsului natural CHIMIOHELP*

Administrarea preparatului polifenolic la câini cu tumori mamare, tratați cu citostatice și supuși mastectomiei (conform tabelului 1), a determinat creșterea valorilor enzimelor antioxidante eritrocitare superoxid dismutaza (r-SOD), catalaza (r-CAT), glutacion peroxidaza (r-GPx), scăderea concentrației malondialdehidei eritrocitare (r-MDA) și creșterea concentrației glutacionului redus (r-GSH). La câinii care nu au beneficiat de preparatul CHIMIOHELP, activitatea enzimelor antioxidante eritrocitare (r-SOD, r-CAT, r-GPx) a scăzut, iar nivelul malondialdehidei a crescut. O scădere semnificativă a fost înregistrată și la nivelul glutacionului redus din eritrocite (tabelul nr. 2). Aceste rezultate demonstrează scăderea nivelului procesului de oxidare a lipidelor la nivelul membranei eritrocitare și îmbunătățirea statusului antioxidant la animalele la care s-a administrat extractul polifenolic.

Tabelul nr. 2

Activitatea superoxid dismutazei eritrocitare (r-SOD), catalazei eritrocitare (r-CAT), glutacion peroxidazei eritrocitare (r-GPx), concentrația malondialdehidei eritrocitare și a glutacionului redus (r-GSH)

	Câini cu tumori mamare tratați cu citostatice și CHIMIOHELP					Câini cu tumori mamare tratați cu citostatice				
	r-SOD (U/g Hb)	r-CAT (U/g Hb)	r-GPx (U/g Hb)	r-MDA ( $\mu\text{mol/g Hb}$ )	r-GSH (mg/g Hb)	r-SOD (U/g Hb)	r-CAT (U/g Hb)	r-GPx (U/g Hb)	r-MDA ( $\mu\text{mol/g Hb}$ )	r-GSH (mg/g Hb)
Control	125,3	400,2	39,3	0,31	3,51	125,3	400,2	39,3	0,31	3,51
ziua 0 (înainte de tratament)	99,5	378,2	30,9	0,47	2,14	88,5	380,2	27,1	0,55	2,11
săptămâna 2	99,4	377,3	31,0	0,47	2,01	89,1	380,3	27,5	0,57	1,92
săptămâna 6	101,3	387,1	31,9	0,41	1,97	89,1	380,2	27,1	0,46	1,91
săptămâna 7	101,2	388,9	32,1	0,39	2,28	87,3	372,5	26,7	0,48	1,78
săptămâna 11	109,7	390,0	34,1	0,35	2,43	84,2	364,5	26,0	0,65	1,65

\*Valorile prezentate sunt media a 5 determinări

- *Efectul hepatoprotector al produsului natural CHIMIOHELP*

Introducerea în schema de tratament a produsului CHIMIOHELP, conform tabelului 1, a determinat reducerea efectelor toxice ale citostaticelor la nivelul ficatului. Datorită efectului hepatoprotector exercitat de produsul CHIMIOHELP, activitatea enzimelor serice fosfataza alcalină (ALP), aspartat-aminotransferaza (AST), alanil-aminotransferaza (ALT) și lactat-dehidrogenaza (LDH) a fost îmbunătățită. La câinii care nu au beneficiat de CHIMIOHELP, activitatea enzimelor serice menționate a crescut, ceea ce demonstrează intensificarea procesului de citoliza la nivel hepatic (tabelul nr. 3).

Astfel, se observă că valorile activității acestor enzime sunt crescute de 3-4 ori față de cele normale în cazul pacienților cu tumori mamare tratați numai cu citostatice, spre deosebire de pacienții cărora li s-au administrat pe lângă citostatice și extracte polifenolice vegetale, la care valorile activității acestor enzime sunt peste limitele normale, ajungând doar până la dublul valorilor normale, și aceasta numai în cazul anumitor parametri. Aceste observații indică faptul că polifenolii extrași din plante, prin acțiunea lor antioxidantă, reduc toxicitatea hepatică a chimioterapicelor citostatice.

Tabelul nr. 3

Activitatea enzimelor markeri ai citolizei hepatice: fosfataza alcalină (ALP), aspartat transaminaza (AST), alanil transaminaza (ALT) și lactat dehidrogenaza (LDH) la pacienții cu tumori mamare

	Câini cu tumori mamare tratați cu citostatice și CHIMIOHELP				Câini cu tumori mamare tratați cu citostatice			
	ALP (U/l)	AST (U/l)	ALT (U/l)	LDH (U/l)	ALP (U/l)	AST (U/l)	ALT (U/l)	LDH (U/l)
Control	88,5	21,0	27,9	148,3	88,5	21,0	27,9	148,3
ziua 0 (înainte de tratament)	93,2	24,2	34,2	238,5	96,9	29,6	42,7	265,2
săptămâna 2	107,2	28,9	47,5	245,2	115,6	39,2	61,3	297,6
săptămâna 6	142,6	34,5	76,5	294,2	137,5	53,2	96,2	324,7
săptămâna 7	140,2	40,1	90,7	307,2	179,2	65,4	120,5	370,5
săptămâna 11	135,4	41,2	72,5	320,5	210,2	95,6	131,2	440,7

\*Valorile prezentate sunt media a 5 determinari

- *Reducerea rezistenței multidrogu sub influența produsului natural CHIMIOHELP*

Ca rezultat important obținut consecutiv strategiei terapeutice abordate, s-a evidențiat clinic o regresie a tumorii, respectiv o remisiune clinică din stadiul T<sub>4</sub> sau T<sub>3</sub> în stadiul T<sub>2</sub> sau T<sub>1</sub>. După tratamentul cu citostatice asociate cu mix polifenolic, într-unul din cazuri tumora a involuat din stadiul T<sub>4</sub>N<sub>2</sub>M<sub>1</sub> în stadiul T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>x</sub>, analizele de sânge punând în evidență o ușoară remisiune a constantelor hematologice și a enzimelor studiate.



## REVENDICARE

1. Produs utilizat ca adjuvant în tratamentul cu chimioterapice citostatice la animale, caracterizat prin aceea că este constituit dintr-un concentrat polifenolic extras dintr-un material vegetal constituit din fructe de afin (*Vaccinium myrtillus*), fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides*), fructe de păducel (*Crataegus monogyna*), părți aeriene de sunătoare (*Hypericum perforatum*) și părți aeriene de rostopască (*Chelidonium majus*) în raport masic 2: 1: 1: 0,5: 0,5, cu o concentrație în polifenoli de 5 g echivalent acid galic/100 ml și un conținut de zaharoză de 40%.

