



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00854

(22) Data de depozit: 30/10/2018

(41) Data publicării cererii:  
29/05/2020 BOPI nr. 5/2020

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,  
BD.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.36-46,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;  
• INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE ȘTEFAN  
S. NICOLAU-, ȘOS. MIHAI BRAVU NR. 285  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• HOFIGAL IMPORT-EXPORT S.A.,  
INTRAREA SERELOR NR.2A, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• CHIFIRIUC CARMEN MARIANA,  
STR. COSTACHE STAMATE, NR.5, BL.A8,  
SC.1, ET.9, AP.37, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• BLEOTU CORALIA,  
ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5,  
SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• MANEA CRISTINA, INTRAREA CATINEI  
NR.6, BREAZA, PH, RO;  
• MARUTESCU LUMINIȚA GABRIELA,  
ALEEA LT. GHEORGHE STĂLNEANU,  
NR.2, BL.2, SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MATEI LILIA, STR. SEMILUNEI NR. 7,  
PARTER, BUCUREȘTI, B, RO;  
• DRAGU LAURA DENISA,  
STR.BANU UDREA, NR.4, BL.G8, AP.98,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• ALEXIU IRINA DANIELA,  
STR.PROF MOISE NICOARĂ, NR.41,  
BL.D3, AP.84, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• DIACONU CARMEN CRISTINA,  
STR. BABA NOVAC, NR.21, G11, 7/74,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• ECONOMESCU CHIVU MIHAELA,  
ȘOS.ȘTEFAN CEL MARE, NR.240, BL.59A,  
SC.4, AP.105, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NEAGU IULIA ANA,  
BDUL.NICOLAE GRIGORESCU, NR.19,  
BL.V18, SC.C, AP.51, BUCUREȘTI, B, RO;  
• LAZĂR VERONICA,  
STR. G-RAL B. VLĂDOIANU NR. 4, BL. 346,  
SC. A, AP. 2, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• ALEXANDRU GEORGETA,  
STR. IZVORUL RECE NR.1, BL.M1/1,  
SC. 10, AP.446, SECTOR 4, BUCUREȘTI,  
B, RO;  
• PITICĂ IOANA MĂDĂLINA,  
BDUL. CONSTANTIN BRÂNCOVEANU,  
NR.14, BL.B5, SC.1, ET.2, AP.10, SECT. 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• ATAMAN MARIUS, BDUL.ABATORULUI,  
NR.4, BL.95, SC. B, ET.4, AP.56,  
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• SUCIU ALEXANDRU, STR. ANTON PANN  
NR. 11, MEDIAȘ, SB, RO;  
• CRIȘAN IULIANA, ALEEA FETEȘTI  
NR.16, BL.M9, SC.G, ET.2, AP.97,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CURUTIU CARMEN,  
STR.SG.ION ROTARU, NR.35, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• BURLIBAȘA LILIANA, BD. MĂRĂȘEȘTI,  
NR.2B, BL.A, SC.2, ET.5, AP.17, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• CONSTANTIN NICOLETA,  
STR. ALEXANDRU VLAHUȚĂ, NR.1,  
BL.M49, AP.75, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• POPA MARCELA, STR. VLADEASA NR.8,  
BL.C48, SC.A, AP.97, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT TOTAL  
CONCENTRAT DE CĂȚINĂ ROȘIE (TAMARIX GALLICA)  
CU ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ, ANTIVIRALĂ,  
IMUNOMODULATOARE ȘI ANTIPROLIFERATIVĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract total concentrat de cătină roșie (*Tamarix Gallica*) cu activitate antimicrobiană, antivirală, imunomodulatoare și antiproliferativă. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că tinctura de cătină roșie este concentrată la rotavapor la presiune redusă de 400 mbar și

temperatura de 60°C, rezultând extract concentrat cu un conținut ridicat în polifenoli.

Revendicări: 2  
Figuri: 7

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## 12.2. DESCRIEREA BREVETULUI: PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT TOTAL CONCENTRAT DE CĂȚINĂ ROȘIE (*TAMARIX GALLICA*) CU ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ, ANTIVIRALĂ, IMUNOMODULATOARE ȘI ANTIPROLIFERATIVĂ

Prezenta invenție se referă la obținerea extractului total concentrat de *Tamarix gallica* (cătină roșie) (ETCTG) și demonstrarea efectului farmacologic antimicrobian, genotoxic, antiviral și imunomodulator al acestuia.

**Cătina roșie** (*Tamarix gallica*) este un arbust fructifer, originar din Asia Centrală, răspândit în toată Europa; în România, poate fi găsit în zone cu vegetație diversă, montane, sălbatice, însoțite, formând tufișuri și crânguri întinse. În general, speciile de *Tamarix* sunt folosite în medicina tradițională ca astringente, aperitive, diaforetice și diuretice, pentru tratarea leucodermei, afecțiunilor splinei, bolilor oculare, cefaleei, febrei, oboselii, pediculozei, artritei reumatoide, normalizarea efectelor stresului oxidativ în diabet (Rotaru și colab., 2018). Plantele din genul *Tamarix* conțin diverse componente chimice bioactive, inclusiv polifenoli, flavonoide, taninuri și o serie de produși volatili, cu activitate antioxidantă și antimicrobiană față de tulpini bacteriene de *Corynebacterium diphtheriae* și *Proteus mirabilis* și fungice de *Aspergillus niger* (Sultanova și colab., 2001; Al-Jaber, Allehaib L, 2017).

De asemenea, un compus recent descoperit, tamaractam (1), precum și compușii cis-N-feruloil-3-O-metildopamina (2) și trans-N-feruloil-3-O-metildopamina (3) au prezentat capacitatea de a induce apoptoza sinoviocitelor asemănătoare fibroblastelor din artrita reumatoidă RA (RA-FLS) prin creșterea nivelului de activare a caspazei-3/7 și creșterea fracției sub-G1 (Yao și colab., 2017).

Extracetele alcoolice de *Tamarix sp.* au demonstrat de asemenea potențial antitumoral, exercitând efecte citotoxice față de celulele tumorale A549, la diferite concentrații și variante de timp, în timp ce citotoxicitatea față de fibroblastele normale a fost minimă (Mirzaaghaei și colab., 2017).

Deși se cunoaște faptul că efectele terapeutice ale extractelor totale sunt mult mai intense și benefice, datorită acțiunii sinergice a componentelor bioactive, până în prezent, extractele totale concentrate de *Tamarix gallicanum* fost investigate pentru a descrie

Universitatea din București  
Prof. dr. Mircea DUMITRU

Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU

Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator Cindea Claudiu Valentin



mecanismele prin care acționează la nivel molecular și celular în cazul proprietăților antimicrobiene, antivirale, antitumorale și imunomodulatoare,

**Problema** pe care invenția actuală o rezolvă este rezistența la medicamente, o temă comună în tratamentul bolilor infecțioase și tumorale, datorită mecanismelor comune de rezistență, cum ar fi cele mediate de pompele de eflux. Bolile infecțioase reprezintă o problemă majoră de sănătate publică la nivel mondial din cauza emergenței rapide a rezistenței la substanțele antimicrobiene și antivirale, amplificată, în cazul infecțiilor microbiene, de formarea biofilmelor microbiene și de numărul foarte limitat de noi agenți antimicrobieni [Anderson, 2006; Becker, 2006; Coastes, 2008; Boucher, 2009; O'Fallon, 2009; Devasahayam, 2010; Rice, 2010; Coastes, 2011; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2005 - 2014]. Dimensiunea globală a fenomenului AR a generat o agendă europeană de cercetare cu o viziune comună cu privire la modul de combatere a rezistenței antimicrobiene (AR), unul dintre obiectivele *Joint Programme Initiative on Antimicrobial Resistance* (JPIAMR) adoptate în decembrie 2013, fiind susținerea inițiativelor de dezvoltare de noi strategii antiinfecțioase (<http://www.jpamr.eu/activities/strategic-research-agenda/>). Numeroși compuși naturali de origine vegetală studiați cu precădere în ultimele două decenii au demonstrat un potențial efect antimicrobian și antiviral [Solowey și colab., 2014].

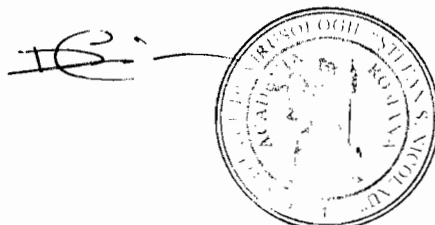
**Soluția** pe care o propune prezenta invenție este demonstrarea experimentală *in vitro* și *in vivo* a efectelor antimicrobiene, antivirale, genotoxice și imunomodulatoare ale ETCTG, ca strategie adjuvantă pentru tratamentul infecțiilor microbiene și virale, rezistente la tratamente convenționale.

**Avantajele invenției:**

- ETCTG este un produs natural cu activități biologice multiple, care poate fi utilizat pentru dezvoltarea unei strategii comune în tratamentul infecțiilor virale și microbiene, rezistente la tratamente convenționale, care ar reduce semnificativ timpul și costurile de introducere pe piață a unor noi medicamente;
- ETCTG prezintă un risc scăzut de selectare a mecanismelor de rezistență, datorită compoziției complexe în compuși bioactivi, ce prezintă mecanisme și ținte de acțiune diferite;
- ETCTG are activitatea imunomodulatoare, care poate potența activitatea antimicrobiană și antivirală a acestuia;



Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator Cîndea Claudiu  
Valențin

- ETCTG are activitate antiproliferativă, demonstrând potențial antitumoral;
- ETCTG este un produs natural, cu un statut relativ sigur și larg acceptat de către consumatori.

Se prezintă în continuare 6 exemple ale invenției în legătură cu:

**Fig 1.** Schema procesului tehnologic de obținere a ETCTG

**Fig. 2.** Imagine la microscopul inversat a monostratului de celulele Hep2 tratate cu ETCTG 1% (sus) 0.1% (jos) (marire 100x și 200x).

**Fig. 3.** Reprezentarea de tip dotplot a ciclului celular al celulelor Hep-2 tratate cu ETCTG.

**Fig. 4.** Reprezentarea grafică a valorilor CMI și CMEB ale extractului de cătină roșie față de tulpinile microbiene testate.

**Fig. 5.** Inhibiția multiplicării virale induse de ETCTG.

**Fig. 6.** Nivelul expresiei citokinelor proinflamatorii, anti-inflamatorii sau de diferențiere indus de administrarea ETCTG la animale de laborator (șoareci CD1) sau pe celule HT 29.

**Fig. 7.** Reprezentarea grafică a incidenței micronucleilor (%) în extractele naturale studiate raportat la controlul negative.

Se prezintă în continuare obținerea extractului concentrat de cătină roșie (ETCTG) și demonstrarea activității antimicrobiene, antivirale, imunomodulatoare și genotoxicității acestuia.

## EXEMPLUL NR. 1 PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI EXTRACT TOTAL CONCENTRAT DE CĂTINĂ ROȘIE

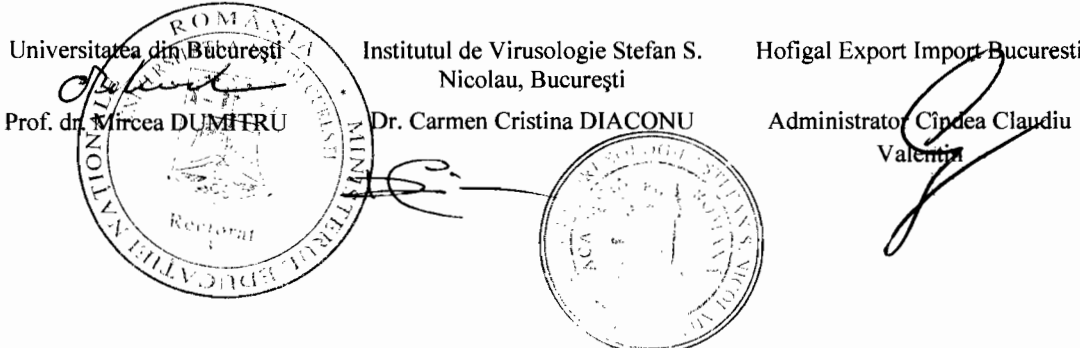
Pentru obținerea a 100 g de extract concentrat de rostopască se folosesc părțile aeriene ale plantei *Tamarix gallica*. Frunzele se usucă natural, pe uscător în strat subțire, la întuneric și la temperatura camerei pentru ca masa vegetală să își păstreze culoarea.

După uscare, produsul vegetal obținut este mărunțit cu ajutorul unui tocător prevăzut cu cuțite, apoi se cerne prin sita nr. 8 (0,08 mm), astfel încât suprafața de contact a plantei cu solventul să fie cât mai mare.

Universitatea din București  
Prof. dr. Mircea DUMITRU

Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU

Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator Cindea Claudiu Valentin



Extracția principiilor active se realizează prin macerarea produsului vegetal *Tamarix gallica* într-un amestec alcool-apă.

Concret, se cântăresc 20 g de material vegetal, procesat prin uscare și mărunțire și se introduc în vasul de extracție de 250 mL, peste care se adaugă 80 g amestec alcool-apă purificată (70/30 v/v). Extracția prin macerare are loc timp de 7 zile, la temperatura camerei, cu agitare de 3-4 ori pe zi timp de 10 minute. La sfârșitul etapei de macerare, tinctura obținută este separată de masa vegetală reziduală prin filtrare, folosind hartie de filtru cu porozitate medie. Apoi, extractul alcoolic obținut este supus unui proces de concentrare pentru îndepărtarea alcoolului și obținerea unui produs cu un conținut ridicat în polifenoli, cu ajutorul unui rotavapor la presiune redusă (200 mbar și 60°C). Eliminarea alcoolului etilic din extractul vegetal este în raport de 1:2, rezultând un lichid brun, în cantitate de 40-45 mL, cu miros caracteristic și conținut ridicat de principii active exprimate în polifenoli conform tabelului 1.

În figura 1 este reprezentată schema procesului tehnologic de obținere a extractului concentrat de cătină roșie.

## EXEMPLUL 2. ANALIZA CANTITATIVĂ A CITOTOXICITĂȚII EXTRACTULUI TOTAL CONCENTRAT DE ROSTOPASCĂ

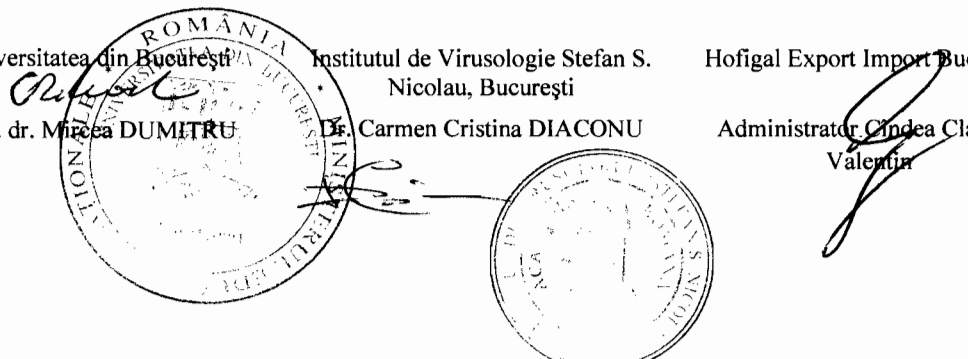
Pentru analiza cantitativă a toxicității induse de ETCTG au fost utilizate linii celulare aderente: Hep2 (*American Cell Type Collection* [ATCC] CCL-23). Celulele aderente au fost tripsinizate, numărate și însămânțate în plăci albe de 24 de godeuri (NUNC, SUA) la o densitate de  $1 \times 10^5$  de celule per godeu. Plăcile au fost incubate în mediu Dulbecco modificat (DMEM:F12) (Sigma, USA), suplimentat cu ser bovin fetal (SBF) 10% inactivat termic (Sigma, USA), la 37 °C, în atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub>, timp de 24 de ore. Linia celulară THP1 a fost menținută în mediu RPMI (Sigma, USA), suplimentat cu SBF 10% inactivat termic (Sigma, USA), la 37 °C, în atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub>. Celulele au fost tratate cu diluții seriale binare de ETCTG (1 - 0,01%) și menținute timp de 24 de ore la 37°C, în atmosfera umedă cu 5% CO<sub>2</sub>.

Pentru a detecta apoptoza timpurie se cuantifică externalizarea fosfatidil serinei în celulele apoptotice utilizând Annexin V conjugată cu FITC, în timp ce apoptoza târzie se cuantifică

Universitatea din București  
Prof. dr. Mircea DUMITRU

Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU

Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator Cindea Claudiu Valentin



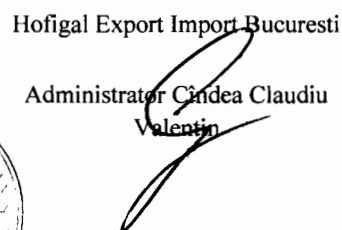
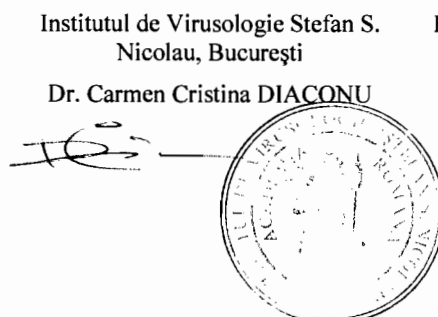
utilizând iodură de propidium (PI). Astfel, la 24 de ore de tratament cu 0,01% și 0,05% extract de cătină roșie, celulele se tripsinizează, se spală în tampon fosfat salin (TFS) și se resuspendă în 200  $\mu$ L tampon de legare pre-diluat, ajustându-se la o densitate de  $2-5 \times 10^5$  celule/mL. Ulterior, suspensia celulară a fost marcată cu 5  $\mu$ L Annexin V: FITC, 10 minute la întuneric la temperatura camerei, spălată cu tampon de legare pre-diluat și colorată cu 10  $\mu$ L soluție de iodură de propidiu din kit pentru evidențierea celulelor moarte.

La 24h de la tratament, celulele au fost vizualizate și fotografiate la microscop în contrast de fază. Morfologia celulelor cu incluzii induse de tratamentul cu extract de cătină în cultura Hep-2 este reprezentată în Fig. 2.

Rezultatele prezentate în Fig. 2 ce indică efectul pro-apoptotic asupra celulelor Hep-2 sunt confirmate prin experimentele de cuantificare a apoptozei celulelor Hep-2 tratate cu ETCTG în concentrație de 0,1% (Fig. 3).

### EXEMPLUL 3. DEMONSTRAREA EFICIENȚEI ANTIMICROBIENE FAȚĂ DE TULPINI STANDARD

Pentru evaluarea activității antimicrobiene au fost utilizate tulpinile de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* Van A 3091, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 reprezentative pentru speciile de importanță epidemiologică. Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării concentrației minime inhibitorii (CMI) s-a realizat prin metoda microdiluțiilor seriale binare (10 diluții binare ale extractului testat) într-un volum de 90  $\mu$ l de mediu Mueller Hinton lichid, folosindu-se plăci cu 96 de godeuri. Ulterior, godeurile au fost însămânțate cu câte 10  $\mu$ l suspensie microbiană, cu densitate  $10^6$  UFC/mL (unități formatoare de colonii), realizată în ser fiziologic steril din culturi proaspete de 24 ore. La fiecare testare sunt prevăzute godeuri martor de sterilitate (control negativ) și un martor de cultură microbiană (control pozitiv). După incubarea plăcilor la temperatura de 37°C timp de 24 ore, sunt analizate rezultatele obținute prin examinare macroscopică. În godeul martor de creștere, mediul trebuie să fie tulbure ca urmare a creșterii microbiene. Godeul martor de sterilitate nu a prezentat creștere microbiană vizibilă, conținutul lichid rămânând clar, transparent. Concentrația de extract testat, corespunzătoare ultimului



godeu în care nu se mai observă dezvoltarea culturii microbiene, a reprezentat valoarea CMI pentru proba respectivă de analizat, confirmată și prin măsurarea absorbției la 620 nm. În urma realizării experimentului pentru stabilirea CMI, plăcile cu 96 de godeuri au fost golite și spălate de două ori cu ser fiziologic steril, biofilmul format pe pereții godeurilor de plastic este fixat timp de 5 minute cu metanol 70%, colorat cu soluție alcalină de cristal violet 1% timp de 15 minute (soluția de colorare este îndepărtată prin spălare sub jet de apă de la robinet și apoi, resuspendată în acid acetic 33% (prin barbotare), intensitatea suspensiei colorate fiind evaluată macroscopic, pentru a aprecia intensitatea colorației comparativ cu controlul pozitiv și apoi s-a realizat absorbția la 492nm. Concentrația de extract testat corespunzătoare ultimului godeu în care nu s-a mai observat dezvoltarea biofilmului a reprezentat valoarea concentrației minime de eradicare a biofilmului (CMEB) pentru proba respectivă de analizat.

ETCTG a prezentat o foarte bună activitate antimicrobiană față de celulele în suspensie ale tuturor speciilor testate (cu concentrații ale ETCTG de 3,12-12,5%), remarcându-se excelenta activitate față de tulpinile de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* și *Candida parapsilosis*, valorile CMI corespunzând unor concentrații mici de ETCTG, respectiv de 3,12%. De asemenea, ETCTG inhibă eficient capacitatea de aderență a celulelor microbiene, respectiv formarea biofilmului, la concentrații foarte mici, cuprinse între 1,56 și 6,25%.

Activitatea antibiofilm se manifestă în special față de tulpina de *Enterococcus faecalis*, valoarea CMEB fiind doar de 0,19%, de 16 ori mai mică decât valoarea CMI corespunzătoare, urmată de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* pentru care valoarea CMEB a fost de 1,56% respectiv 6,25%, adică de 2 ori mai mică și respectiv egală cu valorile CMI corespunzătoare (Fig. 4).

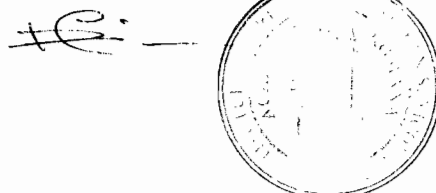
Aceste rezultate sunt foarte promițătoare, cunoscut fiind faptul că celulele incluse în biofilm sunt mult mai rezistente decât cele planctonice la acțiunea agenților antimicrobieni, valorile CMEB fiind de până la câteva sute de ori mai mari decât valorile CMI.

#### EXEMPLUL 4: DEMONSTRAREA EFECTULUI PROFILACTIC, ANTIVIRAL ȘI VIRULICID

Pentru demonstrarea efectului profilactic față de infecția virală în plăci de 96 godeuri se însămânțează 7500 celule Hep2 per godeu. După aderarea celulelor, acestea sunt tratate cu ETCTG la o concentrație care s-a dovedit a nu fi toxică, de 0.1% în mediu de cultură



Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator Cindea Claudiu  
Valentin

DMEM:F12, îmbogățit cu 10% ser fetal bovin. Experimentele se realizează cel puțin în 3 replicare. La 24 h post tratament se îndepărtează mediul de cultură în care s-a inoculat ETCTG de 0,1% și apoi, monostratul de celule este inoculat cu virus. Practic, pentru fiecare virus se realizează diluții zecimale începând cu  $10^{-2}$  și până la  $10^{-8}$ . Câte 3 godeuri rămân ca martor de celule tratate cu ETCTG de 0,1%, neinoculate cu virus. Diluțiile seriale s-au realizat în DMEM/F12 suplimentat cu 2% ser fetal bovin (SBF). De asemenea, în paralel este titrat fiecare virus prin diluții seriale zecimale între  $10^{-2}$  -  $10^{-8}$ , iar ultimele 3 godeuri rămân ca martor de celule fără tratament cu ETCTG de 0,1% sau cu virus. La o oră de la inocularea virusului, acesta este îndepărtat și se înlocuiește cu mediu DMEM/F12 suplimentat cu 2% FBS. Apariția efectului citopatic este urmărită zilnic, timp de o săptămână.

Pentru demonstrarea efectului antiviral în plăci de 96 godeuri se însămânțează 7500 celule Hep2 VSHE per godeu. După aderarea celulelor, la 24 ore, acestea sunt inoculate în triplicate cu virus în diluții zecimale începând cu  $10^{-2}$  și până la  $10^{-8}$  în DMEM/F12+2% FBS. După 1h se îndepărtează inoculul viral și câte 3 replicare din fiecare diluție de virus este tratată cu aceeași concentrație de ETCTG de 0,1% (tratament la 1 oră post-infecție). Apariția efectului citopatic este urmărită zilnic, timp de o săptămână.

Pentru demonstrarea efectului virucid se folosesc plăcuțe de 96 de godeuri la care monostratul de celule s-a obținut prin însămânțarea a 75000 celule Hep2/godeu. Mixul de incubare conține 90μL ETCTG și 10μL virus din stoc. Mixul se incubează timp de 30 minute la temperatura camerei. Practic, în această etapă virusul este diluat de 10 ori, obținându-se diluția  $10^{-1}$ , iar substanța este 90% din stoc. În continuare, se realizează diluții seriale zecimale în DMEM/F12 suplimentat 2% ser fetal bovin (FBS). Cu aceste diluții este inoculat monostratul celular, la 37°C, timp de o oră. Ulterior, inoculul este îndepărtat și se adaugă mediu de întreținere (DMEM/F12 suplimentat cu 2% ser). Apariția efectului citopatic este urmărită zilnic, timp de o săptămână.

Cuantificarea efectului citopatic indus de acțiunea virusului se stabilește după formula:

$$\lg\text{TCID}_{50} = \text{logaritm neg. a celei mai mari concentrații de virus utilizat} - [( \text{suma \% a fiecărei diluții de virus}/100) - 0.5]$$

Cuantificarea inhibiției virale indusă de acțiunea ETCTG se stabilește după formula:

$$I = (\lg\text{TCID}_{50} \text{ celule tratate cu ETCTG și inoculate cu virus}) - (\lg\text{TCID}_{50} \text{ celule inoculate cu virus})$$



Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator Cindea Claudiu Valentin



ETCTG are activitate virulică, acționând mai ales asupra virusurilor herpetice HSV tip-1 și tip-2 și de asemenea asupra adenovirusului (ADV-5), cu o reducere a multiplicării virale de peste 4 log. Totuși, trebuie avut în vedere că pentru a evita toxicitatea cumulativă, în acest experiment au fost utilizate concentrații foarte mici pentru a evalua efectele profilactice și antivirale, eficiența antivirală a ETCTG putând fi chiar mai ridicată la concentrații mai mari (Fig. 5).

#### EXEMPLUL 5: EVALUAREA *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* A ACTIVITĂȚII IMUNOMODULATORII

Pentru evaluarea *in vitro*, celulele HT-29 au fost însămânțate la o concentrație de  $1 \times 10^5$  celule/godeu într-o placă cu 24 de godeuri, iar monostratul celular a fost tratat cu ETCTG, acid clorogenic, acid cafeic și quercetină la concentrații non-toxice. După 24 de ore, ARN total a fost extras folosind Trizol Reagent (Invitrogen, USA) conform protocolului producătorului. ARN total (2  $\mu$ g) a fost revers-transcris folosind kit-ul High Capacity cDNA Reverse Transcription cu inhibitori pentru RN-aze (Applied Biosystems). O cantitate de 50 ng cDNA a fost supus reacției de real time PCR (qPCR) pentru expresia genelor IL6 și IL1b folosind *Taqman Gene Expression Assay* conform indicațiilor producătorului (*Applied Biosystems*). Real Time PCR s-a efectuat pe un sistem PCR de timp real ABI 7300 folosind teste de expresie genetică pre-validată Taqman® (*Applied Biosystems*). Ca și control endogen s-a utilizat GAPDH uman. Fiecare experiment a fost efectuat de trei ori. Rezultatele au fost analizate cu software-ul de studiu RQ (*Applied Biosystems*). Metoda  $\Delta\Delta CT$  a fost utilizată pentru a compara nivelurile relative de expresie. Se observă o creștere a expresiei genice a proteinelor pro-inflamatorii în celulele HT29 după 24 ore de tratament (Fig. 6a).

Pentru evaluarea *in vivo*, ETCTG a fost administrat șoarecilor albi CD1 prin gavaj, câte 200 $\mu$ l/animal). Au fost realizate trei tratamente succesive la fiecare 48 ore. Ulterior, s-a recoltat sânge din inimă, iar nivelul citokinelor pro-/anti-inflamatorii a fost evaluat utilizând Multi-Analyte ELISA Array (Qiagen) (Fig. 6b).

ETCTG induce expresia citokinei pro-inflamatorii IL1b *in vivo*. *In vitro*, ETCTG induce expresia citokinelor proinflamatorii (IL1, IL6) și anti-inflamatorii sau de diferențiere (IL-2, IL-4 și IL-12), ceea ce demonstrează efectul imunomodulator al ETCTG (Fig 6b).

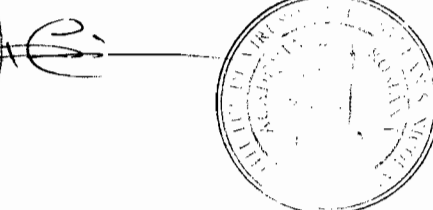
Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin

**EXEMPLUL 6. EVALUAREA ȘI TESTAREA GENOTOXICITĂȚII**

Evaluarea și testarea genotoxicității s-a realizat prin testul de micronucleatie *in vitro* (MNvit) (487 OEDC Guideline), recomandat ca un test de bază pentru evaluarea și caracterizarea capacității genotoxice a agenților chimici/farmaceutici. Acest test detectează prezența micronucleilor în citoplasma celulelor interfazice, indicând activitatea clastogenică și aneugenică a unor agenți chimici, în celule care au parcurs diviziunea celulară în timpul sau după expunerea la substanța de testat, permițând evaluarea rapidă a frecvenței leziunilor cromozomale și a perturbărilor în desfășurarea ciclului celular produse de un agent chimic.

Pentru evaluarea genotoxicității prin testul MNvit, sângele periferic a fost recoltat de la o persoană feminină, de vârstă medie, sănătoasă, care nu a fost expusă recent la agenți genotoxici (substanțe chimice, radiații ionizante, infecții bacteriene/virale). Sângele periferic a fost recoltat pe anticoagulant (heparină) și transferat în mediu PB-MAX (GIBCO) suplimentat cu fitohemaglutinină (agent mitogen), BSA, aminoacizi și antibiotic. Culturile au fost incubate la 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Fiecare probă, inclusiv controlul negativ, a fost realizată în duplicat. După 48 de ore culturile de limfocite sunt tratate cu extract de cătină roșie: concentrațiile: 0,02% (concentrația A) și 0,1% (concentrația B).

Ulterior, culturile de limfocite sunt sacrificate la 24 de ore după adăugarea extractelor timp suficient pentru ca celulele să treacă prin mai multe runde de diviziune celulară astfel încât, să se poată identifica potențialele leziuni ADN sub forma de micronuclei în celulele interfazice. Sacrificarea s-a realizat prin hipotonizare în soluție de KCl 0,075M și fixarea celulelor în soluție de metanol/acid acetic 3:1. Preparatele microscopice din suspensia celulară au fost colorate Giemsa (Merck). Lamele microscopice au fost tratate în prealabil cu Tripsina-EDTA 10X. Analiza preparatelor microscopice s-a realizat la microscopul Olympus BX40 și analizate cu ajutorul programului QuickPhotoMicro 2.3. Culturile de limfocite s-au realizat fără cytochalasin B, fiind astfel necesară măsurarea indicelui RICC (*Relative Increase in Cell Count*) astfel încât, să se demonstreze faptul că celulele din cultură au parcurs diviziunea celulară (s-a evitat răspunsul fals pozitiv). Astfel, dacă citotoxicitatea depășește 60%, apariția micronucleilor este un efect secundar al citotoxicității, astfel încât nu poate fi evaluată incidența micronucleilor ca urmare a genotoxicității substanței.

**Rezultate:** conform indicelui RICC a fost calculată citotoxicitatea pentru fiecare concentrație. Citotoxicitatea ETCTG la concentrațiile selectate s-a încadrat în limitele de

Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cîndea Claudiu  
Valentin



admisibilitate pentru o analiză de acuratețe a genotoxicității, putându-se evalua incidența micronucleilor. În cazul ETCTG s-a constatat scăderea incidenței micronucleilor sub limita controlului negativ, concomitent cu scăderea proliferării celulare, probabil ca urmare a inhibării diviziunii celulare.

### 12.3. REVENDICARE

1. Procedeu de obținere a extractului total de cătină roșie (*Tamarix gallicum*) caracterizat prin aceea că tinctura de cătină roșie. este concentrată la rotavapor la presiune redusă (200 mbar și 60°C) obținându-se 40 - 45 ml de extract concentrat cu un conținut ridicat în polifenoli.
2. Produs obținut conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că prezintă activitate antiinfecțioasă, imunomodulatorie și antiproliferativă, conform experimentelor din descriere.

Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin

## 12.4. DESENE

Tabel 1: Concentrația în polifenoli (exprimată %)

Extract	Conținut polifenoli exprimați în acid cafeic, %min	Conținut flavone exprimate în rutin, %min	Conținut taninuri exprimate în pirogalol %min
Tinctură cătină roșie	8,92	5,72	15,24
Extract concentrat cătină roșie	11,14	7,15	19,04

Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu Valentin

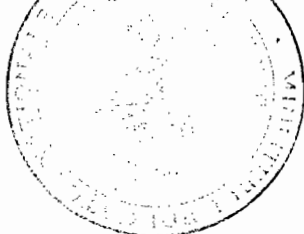
admisibilitate pentru o analiză de acuratețe a genotoxicității, putându-se evalua incidența micronucleilor. În cazul ETCTG s-a constatat scăderea incidenței micronucleilor sub limita controlului negativ, concomitent cu scăderea proliferării celulare, probabil ca urmare a inhibării diviziunii celulare.

### 12.3. REVENDICARE

1. Procedeu de obținere a extractului total de cătină roșie (*Tamarix gallicum*) caracterizat prin aceea că tinctura de cătină roșie. este concentrată la rotavapor la presiune redusă (200 mbar și 60°C) obținându-se 40 - 45 ml de extract concentrat cu un conținut ridicat în polifenoli.
2. Produs obținut conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că prezintă activitate antiinfecțioasă, imunomodulatorie și antiproliferativă, conform experimentelor din descriere.

Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu Valentin

43

**SCHEMA PROCESULUI TEHNOLOGIC DE OBTINERE A EXTRACTULUI  
CONCENTRAT DE CĂȚINĂ ROȘIE**

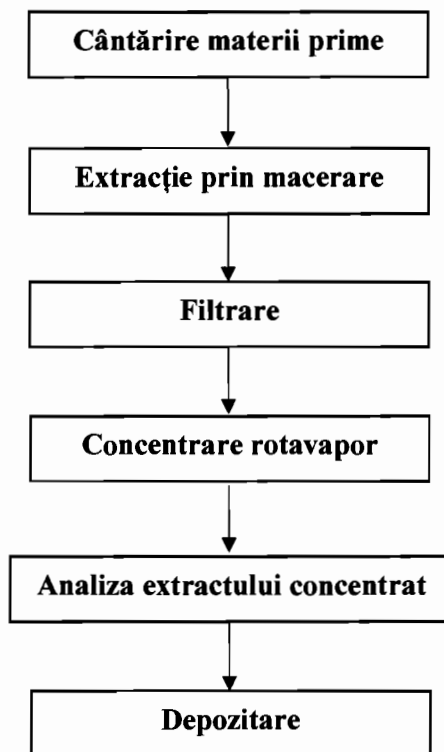


Fig. 1. Schema procesului tehnologic de obținere a extractului concentrat de cătină roșie.

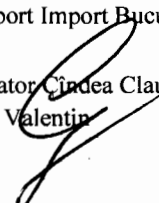


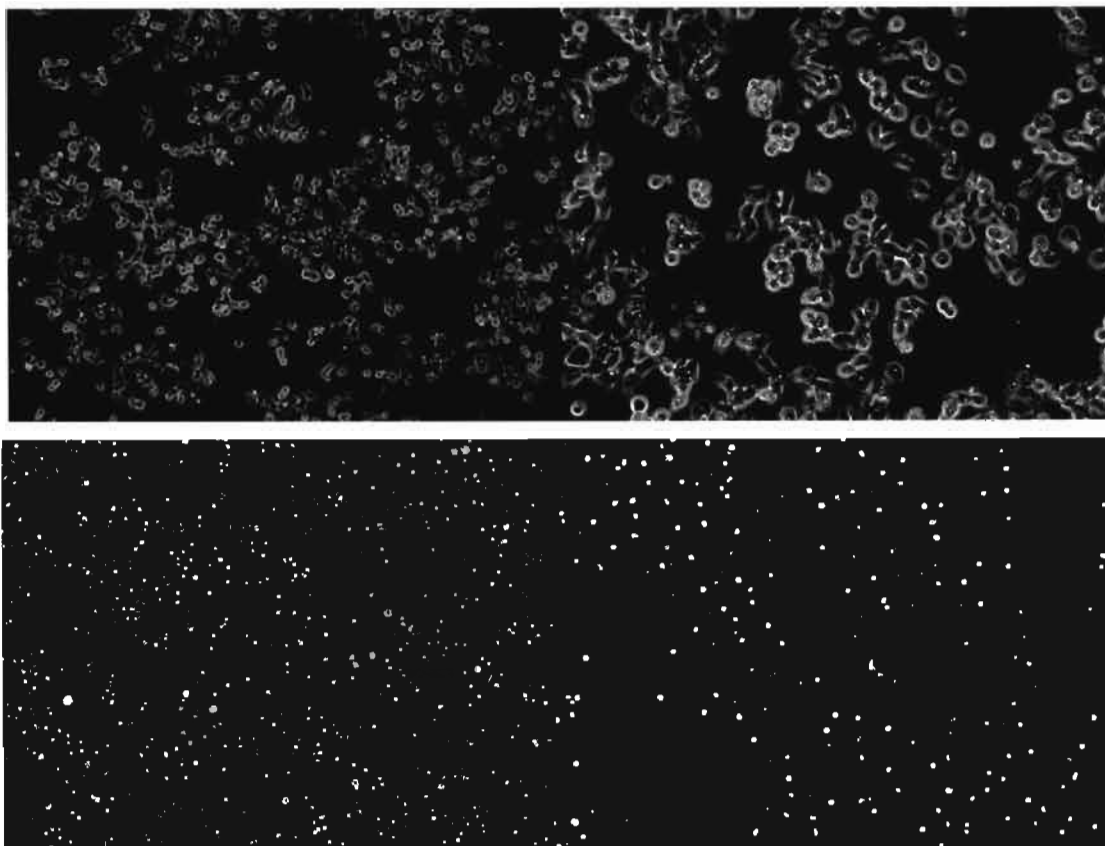
Universitatea din București  
Prof. dr. Mircea DUMITRI

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU

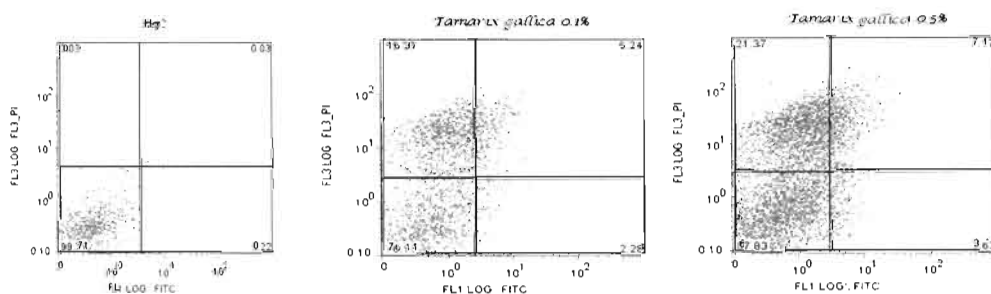


Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator Cindea Claudiu  
Valentin





**Fig. 2.** Imagine la microscopul inversat a monostratului de celulele Hep2 tratate cu ETCTG 1% (sus) 0.1% (jos) (mărire 100x și 200x).



**Fig. 3.** Reprezentarea de tip dotplot a ciclului celular al celulelor Hep-2 tratate cu ETCTG.

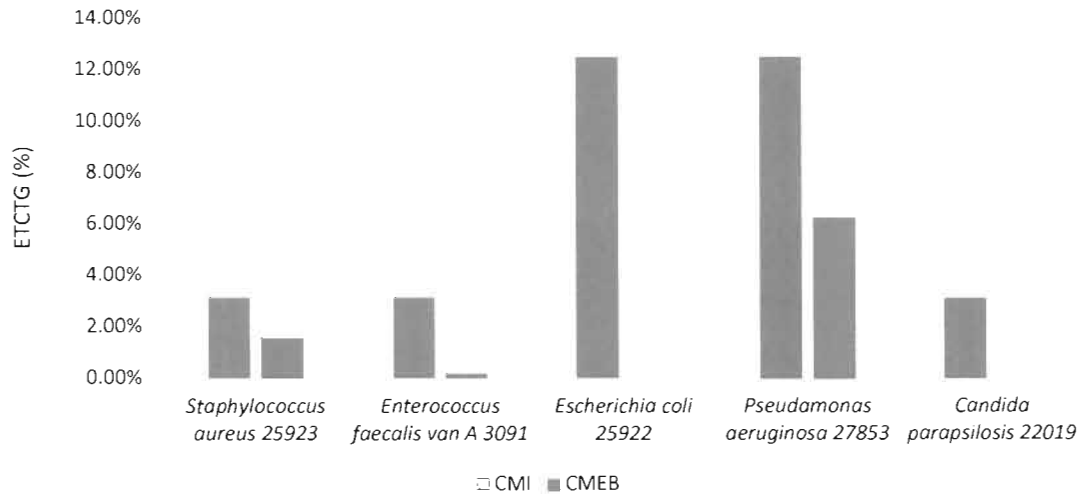
Universitatea din București  
Prof. dr. Mircea DUMITRU



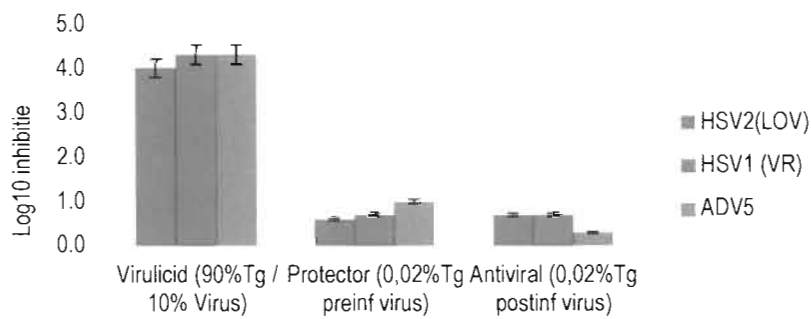
Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU



Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator, Ciudea Claudiu Valentin



**Fig. 4.** Reprezentarea grafică a valorilor CMI și CMEB ale ETCTG față de tulpinile microbiene testate.



**Fig. 5.** Inhibiția multiplicării virale induse de ETCTG.

Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București

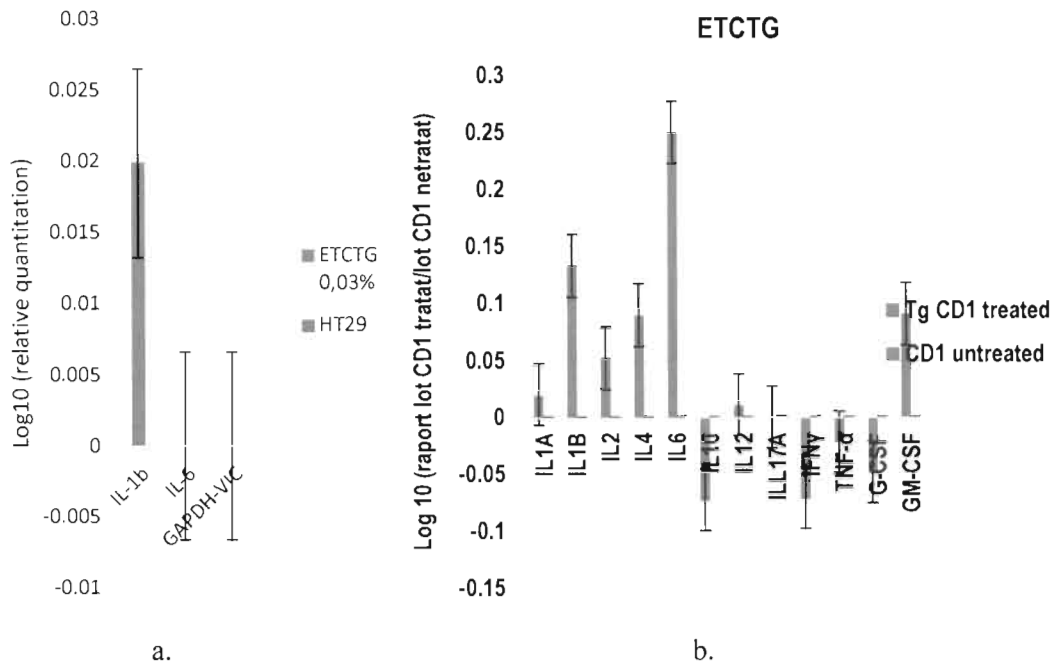
Dr. Carmen Cristina DIACONU



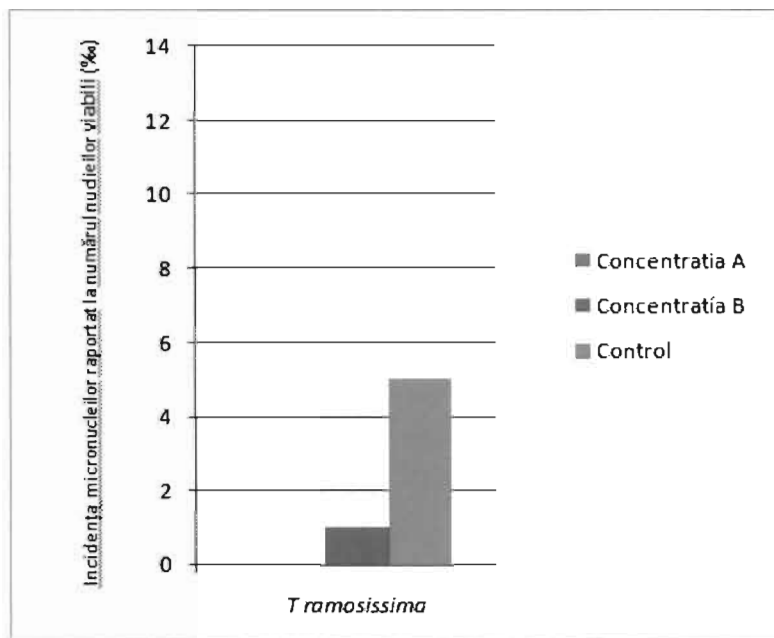
Hofgal Export Import Bucuresti

Administrator Cădea Claudiu





**Fig. 6.** Nivelul expresiei citokinelor proinflamatorii, anti-inflamatorii sau de diferențiere indus de administrarea ETCTG pe celule HT 29 (a) și la animale de laborator (șoareci CD1) (b).



**Fig. 7.** Reprezentarea grafică a incidenței micronucleilor (%) în prezența concentrațiilor de ETCTG studiate, raportată la controlul negativ.

Universitatea din București  
Prof. dr. Mircea DUMITRU

Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București  
Dr. Carmen Cristina DIACONU

Hofigal Export Import Bucuresti  
Administrator: Cîndea Claudiu Valentin

