



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00846

(22) Data de depozit: 26/10/2018

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

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

(72) Inventatori:  
• BLEOTU CORALIA, ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5, SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CHIFIRIUC MARIANA CARMEN, STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8, SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MANEA CRISTINA, INTRAREA CATINEI NR.6, BREAZA, PH, 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, SECTOR 3, B, RO;  
• POPA MARCELA, STR. VLĂDEASA NR. 8, BL. C48, SC. A, ET. 4, AP. 57, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• DIACONU CARMEN CRISTINA, STR. BABA NOVAQC 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 ANA IULIA, BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 19, BL. V18, SC. C, AP. 51, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MARUTESCU LUMINIȚA GABRIELA, ALEEA LT.GHEORGHE STĂLNEANU, NR.2, BL.2, SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ALEXANDRU GEORGETA, STR. IZVORUL RECE NR.1,BL.M1/1, SC.10, AP.446, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NECULA LAURA GEORGIANA, ȘOS. COLENTINA NR. 10, BL. 6, SC. D, ET. 8, AP. 167, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MAMBET CRISTINA, STR. DR. IACOB FELIX NR. 95, BL. 17, SC. A, ET. 6, AP. 25,SECTOR 1, 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;  
• CURUȚIU CARMEN, STR.SG.ION ROTARU, NR.35, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BURLIBASA LILIANA, BD. MĂRĂȘEȘTI NR.2B, BL.A, SC.2, AP.17, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CONSTĂNTIN NICOLETA, STR. ALEXANDRU VLAHUȚĂ, NR.1, BL.M49, AP.75, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• LAZĂR VERONICA, STR. G-RAL B. VLĂDOIANU NR. 4, BL. 346, SC. A, AP. 2, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI EXTRACT TOTAL CONCENTRAT DE ROSTOPASCĂ (CHELIDONIUM MAJUS) CU ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ, ANTIVIRALĂ, ANTITUMORALĂ ȘI IMUNOMODULATOARE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui extract total concentrat de rostopască *Chelidonium majus* cu activitate antimicrobiană, antivirală, antitumorală și imunomodulatoare. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că tinctura de rostopască este concentrată la rotavapor la presiune redusă de 200 mbar și

temperatura de 60°C, rezultând extract concentrat de culoare brună cu un conținut de chelidonină de pste 76 ppm.

Revendicări: 2  
Figuri: 10

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 ROSTOPASCĂ (*CHELIDONIUM MAJUS*) CU ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ, ANTIVIRALĂ, ANTITUMORALĂ ȘI IMUNOMODULATOARE

Prezenta invenție se referă la obținerea extractului total concentrat de *Chelidonium majus* (rostopască) (EATC) și demonstrarea efectului farmacologic antiviral, antimicrobian, antitumoral și imunomodulator al acestui extract concentrat de rostopască (EATC).

Rostopasca - *Chelidonium majus* (familia *Papaveraceae*) a fost utilizată ca plantă medicinală încă din antichitate, sub formă de infuzie, macerat, decoct, pulbere de plantă uscată, latex pentru tratamentul diferitelor afecțiuni, ca de exemplu: colici hepatobiliare, dischinezie biliară, colecistopatii, hepatite acute/cronice, ciroză hepatică, icter, carcinom hepatic, litiază biliară, afecțiuni ale splinei, colici intestinale, enterocolite, tuse convulsivă, tuse spastică, angină pectorală, eczeme, acnee, psoriazis, cicatrizarea rănilor, tuberculoză cutanată, herpes, impetigo, formațiuni papilomatoase benigne, leucemii, tumori, mușcături de șerpi sau insecte infecții virale și microbiene, ca diuretic sau antialgic.

Efectele farmacologice variate ale acestei plante rezumate într-un raport al Comisiei Europene a Medicamentului, dedicat exclusiv plantei *Chelidonium majus* ([https://www.ema.europa.eu/documents/herbal-report/final-assessment-report-chelidonium-majus-l-herba\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/herbal-report/final-assessment-report-chelidonium-majus-l-herba_en.pdf)), se datorează conținutului ridicat în alcaloizi, mai ales în rădăcină și rizomi, unde poate atinge 0,2-0,5%, cum ar fi: chelidonina, homochelidonina, oxichelidonina, mezoxichelidonina, cheleritrina, sanguinarina, coptizina, tetrahydrocoptizina, protopina, alocriptopina, berberina, magnoflorina, sparteina, la care se adaugă rezine, vitamina C, ulei volatil, saponozide și săruri minerale.

Până în prezent, doar anumiți compuși activi din compoziția plantei au fost investigați pentru a descrie mecanismele prin care acționează la nivel molecular și celular în cazul diferitelor proprietăți terapeutice, deși se cunoaște faptul că efectele terapeutice ale extractelor totale sunt mult mai intense și benefice, datorită acțiunii sinergice a componentelor bioactive.

1

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cîndea Claudiu  
Valentin



**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.jpiaamr.eu/activities/strategic-research-agenda/>). În ciuda eforturilor considerabile, cancerul rămâne cauza principală de deces la nivel mondial. Mai mult decât atât, pe parcursul ultimului deceniu, noii agenți chimioterapeutici de sinteză pentru a fi utilizați în clinică, n-au reușit să își dovedească o eficiență mai bună, în ciuda costurilor considerabile și a perioadei lungi de dezvoltare a acestora.

Numeroși compuși naturali de origine vegetală studiați cu precădere în ultimele două decenii au demonstrat un potențial efect antimicrobian, antiviral și antitumoral [Solowey și colab., 2014].

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

#### Avantajele invenției:

- EATC este un produs natural cu activități biologice multiple, care poate fi utilizat pentru dezvoltarea unei strategii comune în tratamentul infecțiilor virale, microbiene și al afecțiunilor tumorale, rezistente la tratamente convenționale, care ar reduce semnificativ timpul și costurile de introducere pe piață a unor noi medicamente;

2

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cîndea Claudiu  
Valentin

- EATC prezintă un risc scăzut de selectare a mecanismelor de rezistență, datorită compoziției complexe în compuși bioactivi, ce prezintă mecanisme și ținte de acțiune diferite;
- EATC este un produs natural, cu un statut relativ sigur și larg acceptat de către consumatori.

Se prezintă în continuare 7 exemple ale invenției în legătură cu:

**Tabel 1:** Concentrația în chelidonină (exprimată în ppm)

**Fig 1.** Schema procesului tehnologic de obținere a extractului concentrat de rostopască

**Fig. 2.** Reprezentarea nivelului de citotoxicitate a concentrațiilor binare de EATC asupra a cinci linii celulare diferite

**Fig. 3.** Rezultatele determinării apoptozei celulelor Hep-2 tratate cu EATC prin citometrie în flux

**Fig. 4.** Reprezentarea nivelului activității caspazelor în celulele Hep-2 tratate cu EATC

**Fig. 5.** Histogramele ciclului celular al celulelor Hep-2 tratate cu EATC

**Fig. 6.** Reprezentarea grafică a valorilor CMI și CMEB ale EATC

**Fig. 7.** Nivelul inhibiției virale indus de tratamentul cu EATC

**Fig. 8.** Reprezentarea nivelului de expresie al unor citokine pro- și antiinflamatorii în celulele HT29 (a) și respectiv, la animalele de laborator (b) tratate cu EATC

**Fig 9.** Reprezentarea grafică a incidenței micronucleilor (a) și a indicelui RICC (b) în culturile de limfocite tratate cu concentrațiile 0,1% și 0,2% EATC

**Fig. 10.** Imaginea microscopică a micronucleilor în culturile de limfocite tratate cu EATC

Se prezintă în continuare obținerea extractului concentrat de rostopască (EATC) și demonstrarea activității antivirale, microbiene, antitumorale și imunomodulatoare a acestuia.

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

Pentru obținerea a 100 g de extract concentrat de rostopască se folosesc părțile aeriene ale plantei *Chelidonium majus*, cu tulpina de 20-30 cm, când planta este complet înflorită. Tulpinile cu

3

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Universitatea din București

Hofigal Export Import Bucuresti

Dr. Carmen Cristina DIACONU

Prof. dr. Mircea DUMITRU

Administrator Cîndea Claudiu  
Valentin



frunze și flori 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.

Extracția principiilor active se realizează prin macerarea produsului vegetal *Chelidonium majus* 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 chelidonină, 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 chelidonină conform tabelului 1.

În figura 1 este reprezentată schema procesului tehnologic de obținere a extractului concentrat de rostopască

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

Pentru analiza cantitativă a toxicității induse de EATC au fost utilizate linii celulare aderente: Hep2 (*American Cell Type Collection* [ATCC] CCL-23); CaSki (ATCC ® CRL-1550™); HaCaT (*CLS Cell Lines Service*, 300493); MG63 (ATCC CRL-1427) și în suspensie THP-1 (ATCC TIB-202). Celulele aderente au fost tripsinizate, numărate și însămânțate în plăci albe de 96 de godeuri (NUNC, SUA) la o densitate de  $7,5 \times 10^3$  de celule per godeu. Plăcile au fost incubate în mediu Dulbecco modificat (DMEM:F12) (Sigma, USA), suplimentat cu ser bovin fetal 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

4

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin

mediu RPMI (Sigma, USA), suplimentat cu ser bovin fetal 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 EATC (10 - 0,075%) și menținute timp de 24 de ore la 37°C, în atmosfera umedă cu 5% CO<sub>2</sub>. Viabilitatea celulară a fost determinată folosind kitul CellTiter-Glo® (Promega, G7572). Înainte de utilizare Tamponul CellTiter-Glo® a fost decongelat și s-a echilibrat, împreună cu substratul CellTiter-Glo® liofilizat, la temperatura camerei. Substratul liofilizat a fost reluat în tampon CellTiter-Glo® și s-a omogenizat prin agitare. Pentru determinarea viabilității celulelor, în fiecare godeu se adaugă un volum egal de reactiv CellTiter-Glo®. Plăcile se incubează la temperatura camerei timp de 10 minute pentru a permite stabilizarea semnalului luminescent. Luminescența s-a citit la aparatul FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, SUA). Rezultatele au fost interpretate ca procent de celule viabile după tratamentul cu diferite concentrații de extract de rostopască raportat la viabilitatea celulelor netratate.

Cuantificarea toxicității induse de EATC arată o reducere progresivă a viabilității celulare odată cu creșterea concentrației de extract în mediul de cultură. Concentrațiile corespunzătoare unei viabilități celulare mai mari de 80% au fost cele  $\leq 0.15\%$  pentru toate liniile celulare testate (Fig. 2). Rezultatele prezentate în Fig. 1 sunt confirmate prin experimentele de cuantificare a apoptozei celulelor Hep-2 tratate cu EATC în concentrație de 0,1% (Fig. 3).

Pentru a detecta apoptoza timpurie se cuantifică externalizarea fosfatidil serinei în celulele apoptotice utilizând Annexin V conjugată cu FITC, iar apoptoza târzie se cuantifică utilizând iodură de propidium (PI). Astfel, la 24 de ore de tratament cu 0,1% extract de rostopască, 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 propidium din kit pentru evidențierea celulelor moarte.

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu

Valentin

### EXEMPLUL 3: DEMONSTRAREA EFECTULUI ANTITUMORAL PRIN CUANTIFICAREA ACTIVITĂȚII CASPAZICE ȘI A CICLULUI CELULAR

Caspazele (*Cysteiny Aspartate-Specific Proteases*) sunt o familie de enzime cu rol important în apoptoză (moartea programată a celulelor). Kitul *Carboxyfluoresce in Multi-Caspase Activity* (BML-AK117-001) detectează apoptoza prin legarea covalentă a unei sonde fluorescente verzi de caspazele active din celulele vii. FAM-VAD-FMK este un derivat al valylalanylaspatic acid fluoromethyl ketone (VAD-FMK). Acesta este un inhibitor al activității caspazice, prin legare la Cys285 pe heterodimerii caspazici. Utilizarea substratului VAD permite detecția globală a caspazelor 1-9, iar cuantificarea fluorimetrică permite evaluarea cantitativă a activității acestora.

Pentru evaluarea activității caspazice, celulele au fost însămânțate în plăci de 24 godeuri la o densitate de  $3 \times 10^5$  celule/ml. La 24 ore s-a realizat tratamentul cu EATC la o concentrație finală de 0,5%. Densitatea celulară în recipientul de cultură nu trebuie să depășească  $10^6$  celule /mL deoarece celulele cultivate în exces pot induce natural apoptoza. La 24 ore de la tratament, celulele au fost reluate de pe substrat, numărate și împărțite în două aliquote la o concentrație de  $10^5$  celule /100 $\mu$ L. Un aliquot a fost tratat cu 2,5  $\mu$ L FAM-VAD-FMK/ 100  $\mu$ L suspensie celulară, agitat și incubat o oră la 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, protejat de lumină. Celulele au fost spălate de 2 ori cu lichid de spălare, iar câte 100  $\mu$ L din fiecare suspensie celulară au fost puși în duplicat într-o placă de microtitrare neagră. Intensitatea fluorescenței fluoresceinei (excitație 490nm, emisie 520nm) a fost cuantificată la FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, SUA).

Rezultatele au demonstrat că tratamentul cu EATC induce o creștere a activității caspazice totale, comparativ cu celulele netratate, demonstrând activarea morții celulare prin apoptoză (Fig. 4).

Celulele tratate cu concentrații de 1% și 0,1% de EATC au fost tripsinizate, spălate în tampon fosfat salin (TFS) și fixate în 1 ml etanol 70%, rece, cel puțin 30 de minute la -20°C. Celulele au fost spălate în TFS, resuspendate în 100  $\mu$ l TFS, tratate cu RNAză (concentrație finală 1 mg/ml) la 37°C timp de 30 minute și colorate cu PI (concentrație finală 100  $\mu$ g/mL) timp de 30 de minute la 37°C, cu agitare periodică. Probele au fost citite la citometrul în flux Beckman Coulter XLM și analizate cu programul FlowJo.

6

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



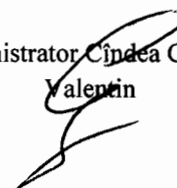

Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cîndea Claudiu



Valentin

Concentrațiile de 1% de EATC induc apoptoza evidențiată prin apariția unui peak situat în stânga G0/G1 denumit sub-G0 și o creștere a fazei G2, demonstrând că EATC acționează ca un citostatic natural, blocând celulele tumorale în faza G2 (Fig. 5).

#### **EXEMPLUL 4: DEMONSTRAREA EFICIENȚEI ANTIMICROBIENE FAȚĂ DE TULPINI REZISTENTE IZOLATE RECENT DIN CLINICĂ**

Pentru evaluarea activității antimicrobiene se utilizează tulpinile de referință: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 reprezentative pentru speciile cu fenotipuri de rezistență de importanță epidemiologică. Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării concentrației minime inhibitorii (CMI) se realizează prin metoda microdiluțiilor seriale binare (10 diluții binare ale extractului testat) într-un volum de 100  $\mu$ l de mediu Mueller Hinton lichid, folosindu-se plăci cu 96 de godeuri. Ulterior, godeurile sunt însămânțate cu câte 20  $\mu$ l suspensie microbiană, cu densitate 0.5 McFarland, 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 prezintă creștere microbiană vizibilă, conținutul lichid rămânând clar, transparent. Concentrația de extract testat, corespunzătoare ultimului godeu în care nu se mai observă dezvoltarea culturii microbiene, va reprezenta valoarea CMI ( $\mu$ g/ml) pentru proba respectivă de analizat, confirmată și prin măsurarea absorbanței la 600 nm. În urma realizării experimentului pentru stabilirea CMI, plăcile cu 96 de godeuri sunt 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 prin citirea absorbanței la 492nm.

7

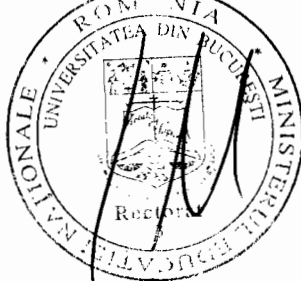
Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cîndea Claudiu

Valentin



08

Concentrația de extract testat corespunzătoare ultimului godeu în care nu se mai observă dezvoltarea biofilmului va reprezenta valoarea concentrației minime de eradicare a biofilmului (CMEB) ( $\mu\text{g/ml}$ ) pentru proba respectivă de analizat.

EATC prezintă activitate antimicrobiană, față de celulele în suspensie și aderente de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* și *Staphylococcus aureus*, cu concentrații minime inhibitorii de  $12,5\mu\text{g/ml}$  și respectiv  $25\mu\text{g/ml}$  și concentrații minime de eradicare a biofilmului de  $12,5\mu\text{g/ml}$  și respectiv  $25\mu\text{g/ml}$  (Fig. 6).

### EXEMPLUL 5: DEMONSTRAREA EFECTULUI PROFILACTIC, ANTIVIRAL ȘI VIRULICID

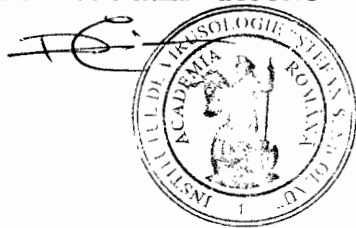
Pentru demonstrarea efectului profilactic față de infecția virală în plăci de 96 godeuri se însămânțează 7500 celule Hep2 per godeu. După aderența celulelor, acestea sunt tratate cu EATC la o concentrație care s-a dovedit a nu fi toxică, de 0.1% în mediu de cultură DMEM:F12, îmbogățit cu 10% ser fetal bovin. Experimentele se realizează cel puțin în 3 replicare. La 24 h post tratament se îndepărtează mediul de cultură în care s-a inoculat EATC 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 EATC 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 EATC 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 aderența 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 EATC de 0,1% (tratament la 1 oră post-infecție). Apariția efectului citopatic este urmărită zilnic, timp de o săptămână.

8

Institutul de Virusologie Ștefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu

Valentin

Pentru demonstrarea efectului virulicid 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 90 $\mu$ L EATC și 10 $\mu$ L 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<sup>-1</sup>, iar substanța este 90% din stoc. În continuare, se realizează diluții seriale zecimale în DMEM/F12 suplimentat 2% 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:

$$\text{lgTCID50} = \text{logaritm neg. a celei mai mari concentrații de virus utilizat} - \\ \text{[(suma \% a fiecărei diluții de virus/100) - 0.5]}$$

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

$$I = (\text{lgTCID50 celule tratate cu EATC și inoculate cu virus}) - (\text{lgTCID50 celule} \\ \text{inoculate cu virus})$$

EATC are activitate virulicidă, acționând mai ales asupra virusurilor herpetice HSV tip-1 și tip-2. De asemenea, extractul de rostopască prezintă efecte protectoare, deoarece tratamentul cu concentrații minime, noncitotoxice, de EATC (0,1%) care acționează timp de 24h reduce titrul viral crescând astfel inhibiția virală cu cel puțin 1 log în cazul virusului ADV5 și 2 log în cazul HSV-1(VR). Efectele tratamentului post-inoculare cu virus, cuantificând intervenția într-unul din etapele infecției productive, sunt minime, <1 log (Fig. 7).

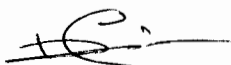
#### **EXEMPLUL 6: *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* A ACTIVITĂȚII IMUNOMODULATORII**

Pentru evaluarea *in vitro*, celulele HT-29 au fost însămânțate la o concentrație de 1 x 10<sup>5</sup> celule/godeu într-o placă cu 24 de godeuri, iar monostratul celular a fost tratat cu EATC, 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

9

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



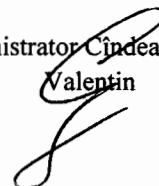
Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cîndea Claudiu  
Valentin



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. 8a). Pentru evaluarea *in vivo*, EATC 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. 8b).

Atât *in vitro*, cât și *in vivo*, EATC induce expresia citokinelor pro-inflamatorii IL-1b și IL-6 și a celor anti-inflamatorii sau de diferențiere (IL-12, IL-10, IL-2 și IL-4), ceea ce demonstrează efectul imunomodulator al EATC (Fig 8)

#### EXEMPLUL 7. EVALUAREA GENOTOXICITĂȚII EXTRACTULUI TOTAL CONCENTRAT DE ROSTOPASCĂ

Pentru evaluarea genotoxicității EATC a fost aplicat testul de micronucleație *in vitro* (conform OECD Guideline) pe culturi de limfocite umane. Sangele periferic a fost recoltat de la un individ de sex femel de vârstă medie, sănătos care nu a fost expus recent la agenți genotoxici (substanțe chimice, radiații ionizante, infecții bacteriene/virale). Sangele 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>. O probă a fost utilizată control negativ. Fiecare probă a fost realizată în duplicat. După 48 de ore culturile de limfocite fost tratate cu concentrațiile 0,1%, respectiv 0,2% EATC și ulterior, sacrificate la 24 de ore după adaugarea EATC, 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

10

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cîndea Claudiu  
Valentin

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 în soluție 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 raspunsul fals pozitiv). Conform indicelui RICC a fost calculată citotoxicitatea pentru fiecare concentrație și s-a constatat o ușoară creștere a citotoxicității odată cu creșterea concentrației EATC (citotoxicitate = 100 - RICC). Nu s-au utilizat pentru studiu concentrații mai mari de EATC deoarece depășesc concentrațiile maxime admise pentru o evaluare corectă fără rezultate fals pozitive. Dacă citotoxicitatea depășește 60% determină apariția micronucleilor ca un efect secundar al citotoxicității, astfel încât nu poate fi evaluată incidența micronucleilor ca urmare a capacității genotoxice a substanței.

Concentrația 0,1% EATC în mediu de cultură a determinat o incidență scăzută a micronucleilor, comparativ cu controlul negativ și reprezintă o concentrație favorabilă evaluării capacității genotoxice. Creșterea concentrației de EATC la 0,2% în cele două replici ale culturii a determinat și creșterea incidenței micronucleilor și deci, a capacității genotoxice, concomitent cu scăderea viabilității celulare (Fig 9 și fig 10).

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu

Valentin

## 12.4. DESENE\

Tabel 1: Concentrația în chelidonină (exprimată în ppm)

Extract	Chelidonina
Tinctură rostopască	33,2
Extract concentrat rostopască	76,1

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu

Valentin

**12.3. REVENDICARE**

1. Procedeu de obținere a extractului total de *Chelidonium majus* caracterizat prin aceea că tinctura de rostopască este concentrată la rotavapor la presiune redusă (200 mbar și 60°C) obținându-se 40 - 45 ml de extract concentrat de culoare brună cu un conținut în chelidonină de peste 76 ppm.
2. Produs obținut conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că prezintă activitate antiinfecțioasă, antitumorală și imunomodulatorie, conform experimentelor din descriere.

12

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



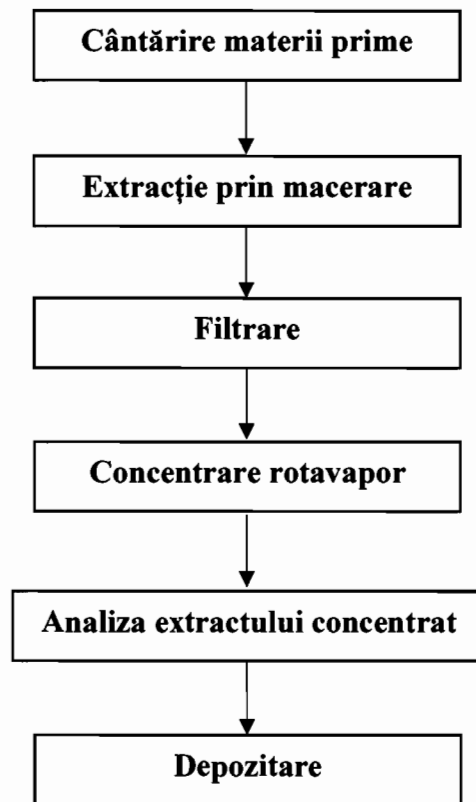
Universitatea din București

Prof. dr. Mișca DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cîndea Claudiu  
Valentin

**SCHEMA PROCESULUI TEHNOLOGIC DE OBȚINERE A EXTRACTULUI  
CONCENTRAT DE ROSTOPASCĂ**

**Fig. 1.** Schema procesului tehnologic de obținere a extractului concentrat de rostopască

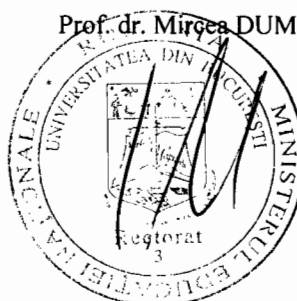
Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

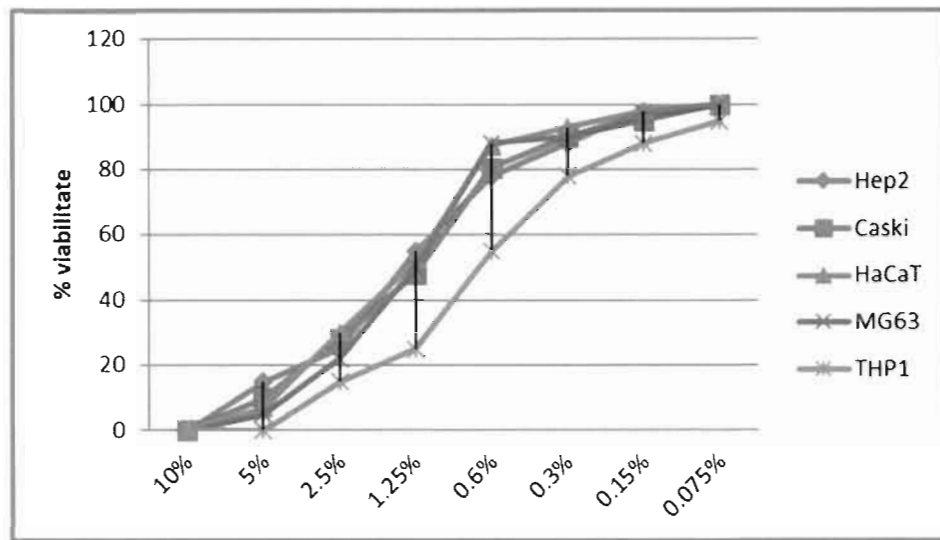
Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin

A handwritten signature of Administrator Cindea Claudiu Valentin is shown.



**Fig. 2.** Reprezentarea nivelului de citotoxicitate a concentrațiilor binare de extract de rostopască asupra a cinci linii celulare diferite.

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin



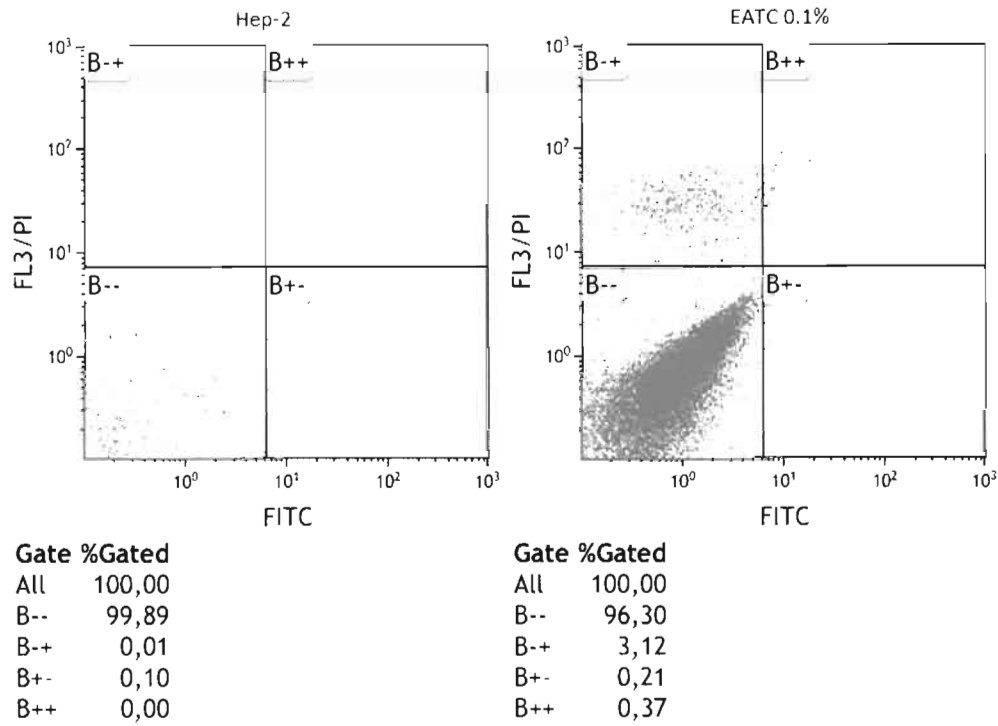


Fig. 3. Rezultatele determinării apoptozei celulelor Hep-2 tratate cu EATC prin citometrie în flux.

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin

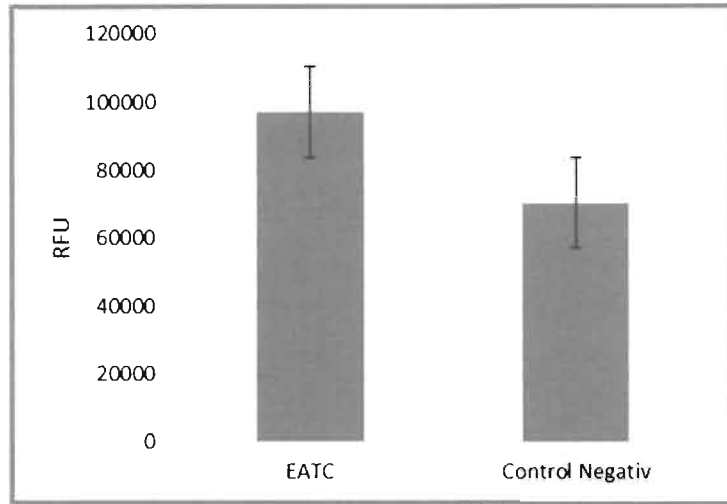


Fig. 4. Reprezentarea nivelului activității caspazelor în celulele Hep2 tratate cu EATC.

Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu Valentin

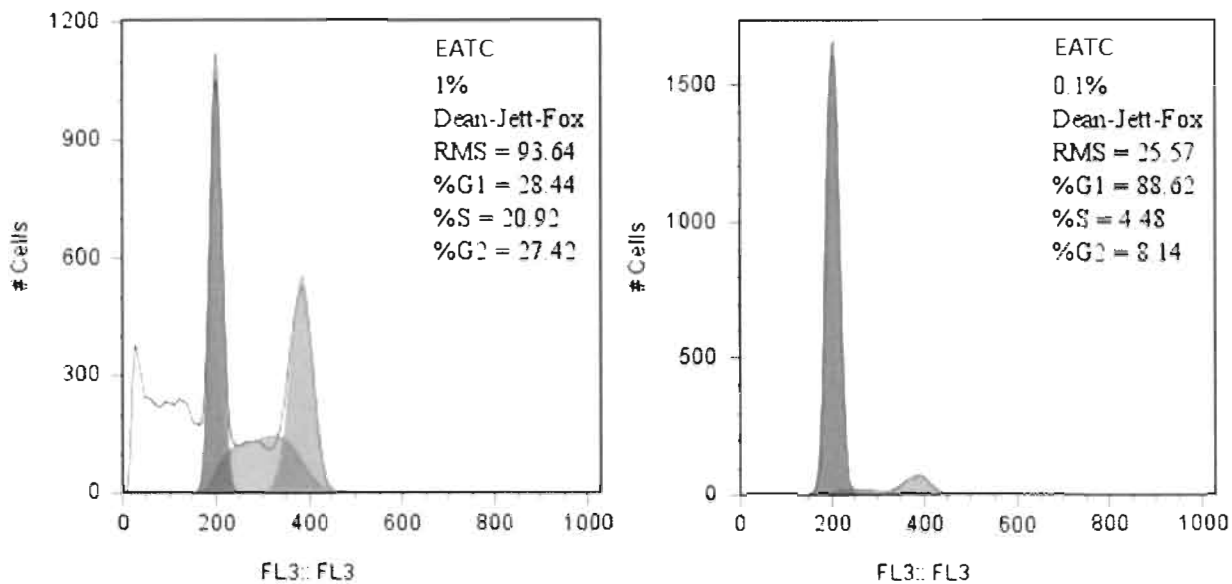


Fig. 5. Histogramele ciclului celular al celulelor Hep-2 tratate cu EATC.

Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, Bucuresti

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din Bucuresti

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu Valentin

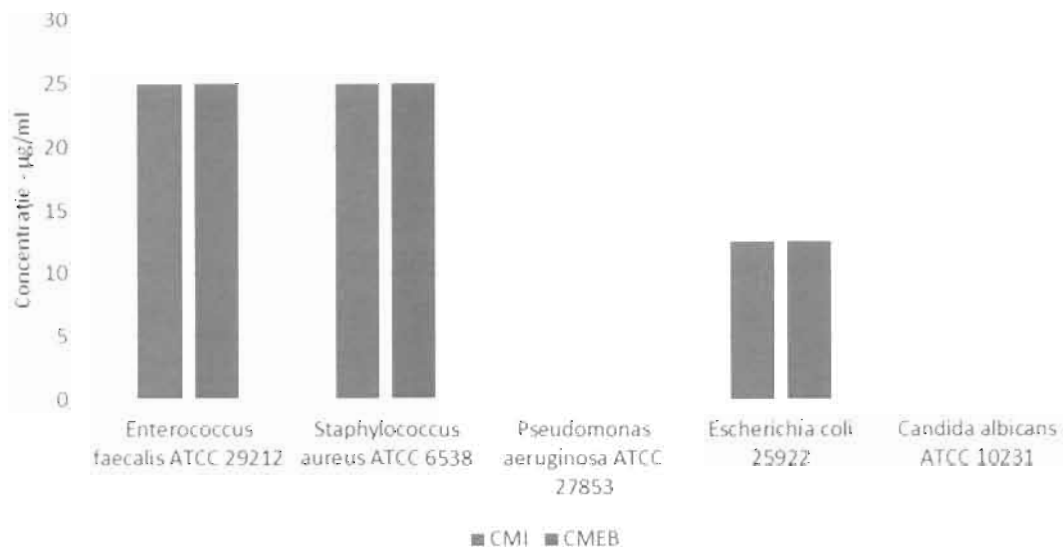


Fig. 6. Reprezentarea grafică a valorilor CMI și CMEB ale EATC față de tulpinile microbiene testate.

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



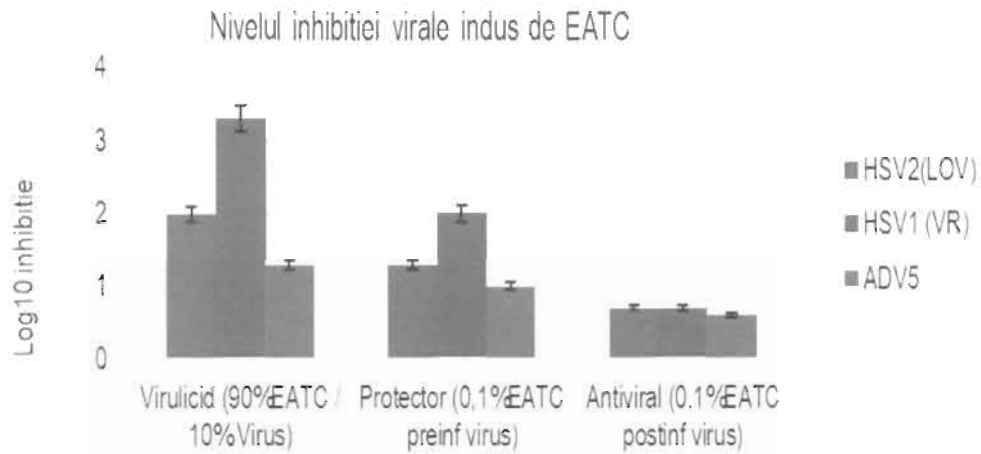
Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin



**Fig. 7.** Nivelul inhibiției virale indus de tratamentul cu EATC.

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



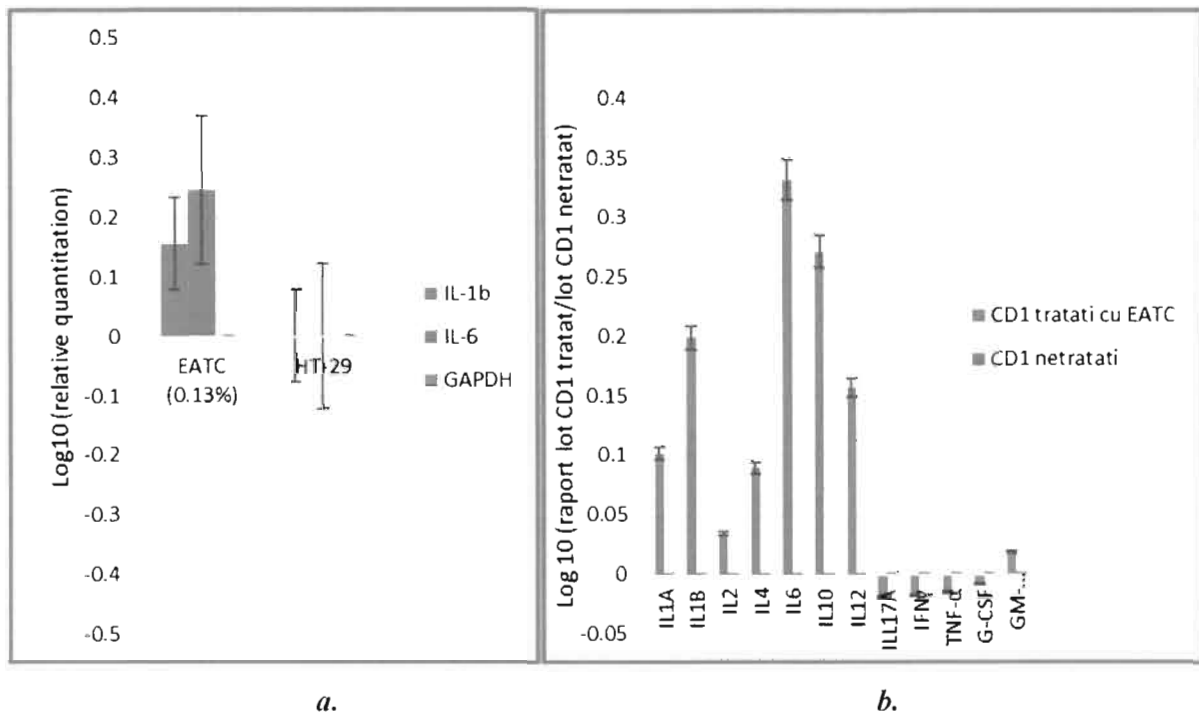
Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin



**Fig. 8.** Reprezentarea nivelului de expresie al unor citokine pro- și antiinflamatorii în celulele HT29 (a) și respectiv, la animalele de laborator (b) tratate cu EATC.

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



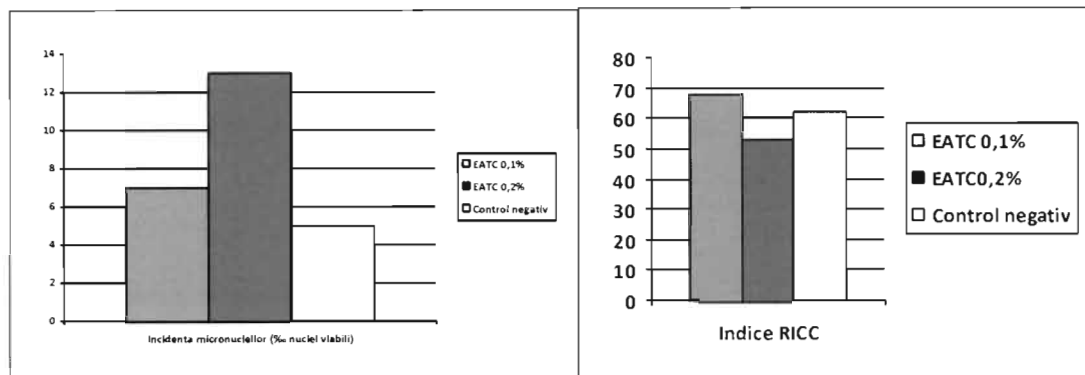
Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin



**Figura 9.** Reprezentarea grafică a incidenței micronucleilor (a) și a indicelui RICC (b) în culturile de limfocite tratate cu concentrațiile 0,1% și 0,2% EATC.

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



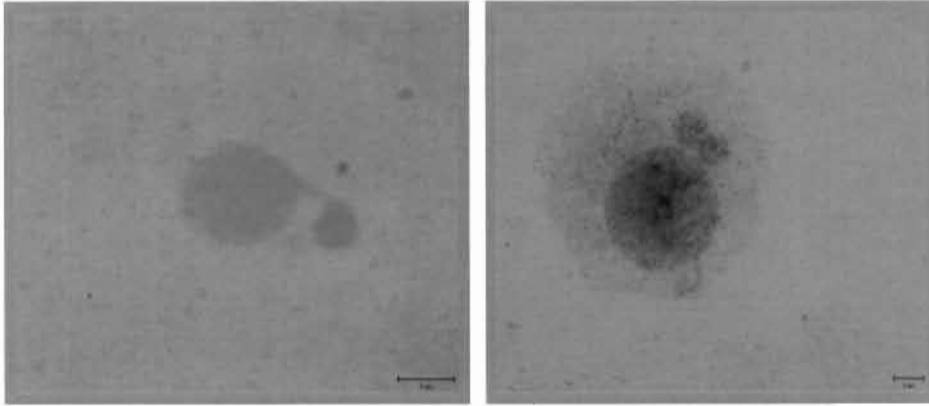
Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin



**Fig. 10.** Imaginea microscopică a micronucleilor în culturile de limfocite tratate cu EATC (concentrație EATC 0,1%, respectiv 0,2%).

Institutul de Virusologie Stefan S.  
Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina DIACONU



Universitatea din București

Prof. dr. Mircea DUMITRU



Hofigal Export Import Bucuresti

Administrator Cindea Claudiu  
Valentin