

## CERCETARI EXPERIMENTALE

### Actiunea antiinflamatorie a unor hidrolizate de proteine

M R SIMIONOVICI, NICULINA BOESTEANU, CARMEN GHEORGHE, FLORICA DAN, A. MARILENA THEODORESCU, C. NICULESCU (Institutul de Cercetari Chimice-Farmaceutice, Bucuresti.), A. G. SAVULESCU (Spitalul Balotesti, S. A. Ilfov).

Încurajati de rezultatele clinice favorabile obtinute cu polipeptide în unele forme de afectiuni reumatismale, am experimentat efectul antiinflamator al unor hidrolizate proteice<sup>1)</sup> (PL) prin doua teste farmacodinamice, inflamatiile cu caragenina si inflamatiile cu adjuvant Freund la sobolanul alb Wistar si la cobai. S-au folosit PL obtinute din ser de cal (PL). Insti-tutul Cantacuzino Bucuresti), din cazeinã pura (PLa, cazeina pura Fluka dupa Hammerstein, fara vitamine) si unul obtinut din cazeina tehnica pentru uz industrial (Intreprinderea Biofarm Bucuresti, PLc).

#### MATERIAL SI METODĂ

Hidrolizatele proteice au fost preparate prin hidroliza acida într-un timp optim, pentru a obtine un produs cu constante fizico-chimice stabilite, cu proprietati antiinflamatorii, neantigenice si lipsite de substante pirogene. Solutiile obtinute au fost filtrate si aduse la un pH 6 — 7 prin adaugare de NaOH 1 N, apoi au fost sterilizate si infolate. Aceste solutii injectabile nu contin proteine (reactivi, triclor acetic, acid sulfosalicilic, acid percloric), dar contin polipeptide de mica greutate moleculara (reactiv fosfotungstic în mediu acid, continutul în azot aminic prin metodele Moore si Stein, continutul în azot total prin metoda biuretului, greutatea moleculara prin filtrarea comparatã a unor peptide cunoscute pe Sefadex G 75).

Inflamatiile cu caragenina s-au realizat pe sobolani (Wistar, mascul, în greutate de 200 g. ±10 g, loturi de 10 animale) prin administrarea intra-plantarã a unui volum de 0,1 ml dintr-o solutie de caragenina 1%. Hidrolizatele s-au administrat în volum de 5 ml/kg corp, intraperitoneal, cu 30 minute înainte de agentul flogistic. S-au efectuat determinari pletismografice ale labelor posterioare initial si la 2, 4, 24 ore de la provocarea inflamatiei. Dozele de PL administrate sînt exprimate în mg. substanta continutã în solutiile de PL pe ml (înainte de neutralizare). Acestea este de fapt substanta efeciva. Rezultatele sînt exprimate în procente de reducere a inflamatiei dupa formula lui Newbold care tine seama de valoarea initiala a animalelor martore.

Inflamatiile cu adjuvant Freund au fost realizate la sobolani Wistar, mascul, sase ani pe un lot, la care s-a administrat Bacto-adjuvant complet Diecko (*Mycobacterium bntiricum* inactivat pus în suspensie în adjuvant Freund) intradermic, la baza cozii, în volum de 0,1 ml în doua etape ; initial si la jumatatea experimentului care a durat 56 zile. PL a fost administrat intraperitoneal în volum de 5 ml/kg corp (1 mg polipeptide/kg corp) zilnic timp de 43 de zile (exceptînd duminicile). S-a urmarit evolutia curbei ponderale, volumul labelor posterioare drepte prin determinari pletismometrice, modificari anatomo-patologice la 30 zile si la 56 zile de la provocarea inflamatiei.

Miozita experimentalã cu adjuvant Freund complet s-a executat pe cobai masculi în greutate de 350 g. ±50 g, care au primit intramuscular adjuvant 0,5 ml în doua etape (în prima zi si în a 7-a zi), experienta tinînd 14 zile. La lotul I PL a fost administrat zilnic subcutan, în doza de 15 mg/kg corp timp de 14 zile. Lotul III nu a primit nici adjuvant nici PL dar s-a administrat zilnic ser fiziologic 2 ml subcutan. Fiecare grup a fost reprezentat de 5 animale. La sfîrșitul experimentarii s-au facut examene anatomopatologice.

Din tabelul I se poate constata ca toate cele trei hidrolizate au actiune antiinflamatorie în diferite grade. Solutia fiziologica nu este în stare sa împiedice inflamatiile cu caragenina. Dozele eficiente, exprimate în substanta activa, sînt foarte reduse iar efectele se mentin si la 24 de ore de la declansarea inflamatiei. Rezultatele prezentate în tabelul II sînt referitoare la actiunea PL, cu diverse doze administrate. Se poate vedea de pendentã efectului antiinflamator de doza si permit calcularea unei DE50 (doza eficientã) de 1,8 mg la 2 ore si de 2,5 mg la 24 ore.

Determinari ale toxicitatii acute pe soar'ice la administrarea intraperitoneala au aratat un

Tabelul 1

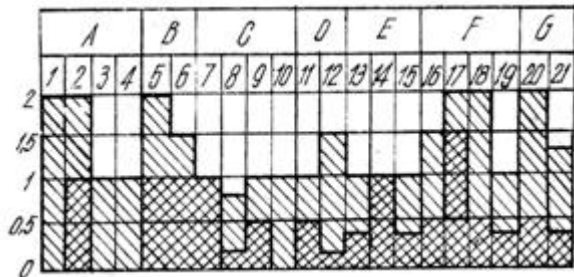
Actiunea antiinflamatorie a PL. Efecte procentuale de reducere a inflamatiei

Doza; mg/kg	2 ore	4 ore	24 ore
PL 5	8	12	43
PL a 1	36	50	34
PL c 1	19	24	4
Ser fiz. 5 ml	0	0	0

Tabelul 11

Actiunea antiinflamatorie a PL<sub>2</sub>. Efecte procentuale de reducere a inflamatiei

Doza; mg/kg	2 ore	24 ore
0,1	27	22
1,0	36	34
3,5	71	55
35,5	92	13



Legenda

Valoarea leziunii la animalele care au primit numai adjuvant Freund  
 Valoarea leziunii la animalele care au primit adjuvant Freund și au fost tratate cu PL<sub>2</sub>

Nr. 6, anul 1989  
Tabelul III Evoluția curbei ponderale (medii pe 10 animale)

Zile de experimentare

	Inițial	8	15	20	27	56	Creșteri %
Martori	152	160	165	168	170	180	+18
Adj. Freund	159	148	155	156	159	177	+11
Adj. + Trat.	150	142	146	160	156	185	+23

DL<sub>50</sub> (doza letală) de 576 mg/kg (între 384 și 769) pentru PL. De aici se poate calcula un indice terapeutic (DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>) extrem de favorabil (360).

Se poate constata că PL<sub>3</sub>, provenit dintr-o casină tehnică pentru uz industrial, are o acțiune mult redusă. Aceasta ridică problema unor aspecte legate de alegerea substanței de hidrolizat.

Fig. 1. — Artrita experimentală la sobolani. Modificări anatomopatologice după 56 de zile de la inocularea cu adjuvant Freund și protecția oferită de tratamentul cu PL. Medii pe 6 animale. Notatie convențională între 0,3 și 0,7, la ficat, plămâni glande suprarenale:

A-ficat, B-splina, C-rinichi, D-glande suprarenale, E-limba anterioară, F-limba posterioară, G-plămâni.

1. Infiltrat limfomonocitar.
2. Hiperplazie limforeticulară.
3. Distrofie granulară.
4. Necroza fibrinoidă.
5. Megakariocite.
6. Hiperplazie limforeticulară.
7. Hiperemie, edem.
8. Edem glomerular.
9. Distrofie glomerulară.
10. Tromboza glomerulară.
11. Hiperemie, edem al medularei.
12. Hiperemie, edem al corlicalei.
13. Edem, infiltrat hematic.
14. Infiltrat limfomonocitar.
15. Necroza fibrinoidă-muschi striat.
16. Edem, infiltrat hematic.
17. Infiltrat limfomonocitar.
18. Necroza fibrinoidă.
19. Edem articular și al capsulei articulare.
20. Infiltrat hematic.
21. Infiltrat limfomonocitar.

Tabel V

Evoluția volumului labei posterioare drepte (mm<sup>2</sup> medie pe 10 animale)

	Zile de experimentare							
	Inițial	5	10	15	20	30	56,	Creșteri %
Martori	38	38	38	38	39	39	40	+5
Adj. Freund	35	40	40	40	40	41	43	+23
Adj. + Trat.	39	38	38	38	39	42	42	+7

Tabelul V

Artrita experimentală la sobolani. **Modificări** anatomopatologice după 56 zile de la prima inoculare cu adjuvant Freund și protecția oferită de tratamentul cu PL. Notatie convențională. **Medie** pe 6 animale

Modificarea anatomopatologică	Adj. Fre.	A, F+ PL,	Mar -. ,	Organul cercetat
Hiperemie, edem, Infiltrat limfomonocitar, Hiperplazie limforeticulară Distrofie granulară Necroza fibrinoasă	1	1	0	Ficat
			6, 5	
	2	0	0, 7	
	2	1	0, 7	
	1	0	0,	
Megakariocite, Hiperplazie limforeticulară	2	1	0	Splina
	2			
Hiperemie, edem. Glomerulonefrită, Distrofie glomerulară Tromboza glomerulară	2	1	0	Rinichi
	0,7	0,3	0	
	1	0,5		
		0		
Infiltrat hematic. Infiltrat limfomonocitar	2	0,3	0,5	Plămân
	1,3	0,6	0,3	
Hiperemie, edem medular Hiperemie, edem cortical	1	0,5	0,3	Glande suprarenale
	1,5	0,2	0	
Inflamație cronică	1	1	0	Coadă
Edem, Infiltrat hematic Infiltrat limfomonocitar Necroza fibrinoasă — țesut striat	1	0,2	0	Laba anterioară
	1	0,2	0	
Edem, infiltrat hematic infiltrat limfomonocitar Necroza fibrinoasă — țesut striat Edem articular și al capsulei articulare	1	0,5	0	Laba posterioară
	5	1,5	0	
	2	0,5	0	
	2	0,2	0	
	1		0	

Rezultatele prezentate pe inflamația cronică cu adjuvant Freund la sobolani sunt prezentate în *tabelele III și IV*. Din evoluția curbei ponderale se constată că, după un tratament de

43

Tabelul VI

Miozita experimentală pe cobai. Modificările anatomopatologice la 14 zile de la prima administrare de adjuvant Freund și protecția oferită de tratamentul cu PL. Medii pe 5 animale. Notatie convențională.

Modificarea anatomopatologică	A F	AF+ PL	A/ar-tori	Organul cercetat
Hiperemie, edem	1	0,5	0	Ficat
Edem al hepatocitelor	1,5	0,7	0	
Intumescența clară a zonei centrolobulare	1	0,5	0	
Hiperemie glomerulară	2	0,5	0,5	Rinichi
Intumescența turburată a epiteliului tubilor renali	2	0,5	0	
Hiperemie	2	0,5	0	Splina
Infiltrat limfocitar submucos	2	0,5	0	
Bronsită hemoragică	2	0,7	0	Plămân ^
Hiperemie medulară	1	0,5	0	Glande suprarenale
Edem cortical	1	0,5	0	
Acantoză	2	0,5	0	Laba anterioară
Edem dermic și hiperemie	2	1	0	
Infiltrat limfocitar Necroza fibrinoasă — țesut atrial Edem fibrinoid interfascicular — țesut striat	2	0,5	0	
	1	0	0	
	2	0,5	0	
Edem interfascicular	2	1	0	Muschi pectoral
Edem interfascicular	2	1	0	Muschi abdominal
Acantoză	2	0,5	0	Laba posterioară
Edem dermic și hiperemie	1,5	0,5	0	
Infiltrat limfomonocitar	2	0,7	0	
Necroza fibrinoasă — țesut striat Distrofie mucofibrinoasă — țesut striat Edem limfotrombocitar	2	1	0	
	2	1	0	
Edem al cartilajului articular	2	0,5	0	
Edem al capsulei articulare	2	0,5	0	
	2	0,2	0	
Limfadenita sinusală	2	0,2	0	Ganglion inghinal

zile, apare un efect de protecție. Același efect de protecție se constată și față de inflamația articulației labei posterioare.

Modificările anatomopatologice determinate de adjuvantul Freund la sobolani și la cobai sunt arătate în graficele din fig. 1 și 2. Gravitatea leziunilor este exprimată printr-o notatie convențională de la 0 la 2. Protecția oferită de tratament este reprezentată de valori medii.

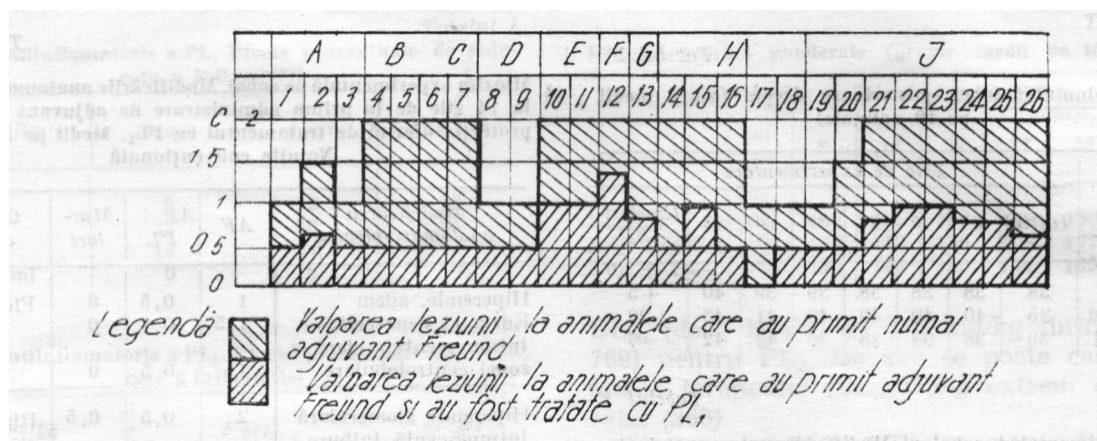


Fig. 2. — Miozita experimentală pe cobai. Modificări anatomopatologice la 14 zile de la administrarea de adjuvant Freund și protecția oferită de tratamentul cu PL., Medii pe 5 animale. Notatia convențională între 0 și 2. Animalele martore au avut leziuni minime (0,5) de hiperemie glomerulară. Ficat, rinichi, splina, plămâni, glande suprarenale, mușchi, ganglioni, laba anterioară, laba posterioară.

1. Hiperemie, edem.
2. Edem al hepatocitelor.
3. Intumescența tuburii a zonei centrolobulare.
4. Intumescența tuburii a epitelului și a tuburilor renale.
5. Hiperemie glomerulară.
6. Hiperemie.
7. Infiltrat limfocitar submucos.
8. Hiperemie medulară.
9. Edem cortical.
10. Edem interfascicular -dreptii abdominali.
11. Edem interfascicular-pectoral.
12. Adenita sinusală.
13. Acantoza.
14. Edem dermic și hipodermic.
15. Infiltrat limfomonocitar.
16. Necroza fibrinoidă-fibra striată.
17. Edem interfascicular fibrinoid-fibra striată.
18. Acantoza. Edem dermic și hipodermic.
19. Edem dermic și hipodermic.
20. Infiltrat limfomonocitar.
21. Necroza fibrinoidă-fibra striată.
22. Distrofie mucofibrinoidă-fibra striată.
23. Edem interfascicular fibrinoid.
24. Edem-cartilaj articular.
25. Edem-capsula articulară.
26. Bronșita hemoragică.

Se poate constata că administrarea de adjuvant Freund determină leziuni importante la nivelul ficatului, splinei, rinichilor, plămânilor, musculaturii și articulațiilor, caracterizate prin infiltrat limfomonocitar, distrofie, necroze. Aceste fenomene sînt mult atenuate la animalele care au primit concomitent tratament.

#### CONCLUZII

1. A putut fi confirmată ipoteza emisă inițial, ca o anumită categorie de polipeptide de mică greutate moleculară posedă proprietăți antiinflamatorii pe modelele experimentale ale inflamației cu caragenina la sobolani și cu adjuvant Freund la sobolani și la cobai. 2. Acțiunea este prezentată la o doză foarte mică, ceea ce sugerează o intervenție la nivel celular prin

corectarea dereglărilor chimice. Se poate lua în discuție o posibilă acțiune în stimularea reumplerii macrofagelor prezente în tesuturile inflamate cu macrocortin (proteina inhibitorie lipomodulin) și inhibiția consecutivă a fosfolipazei A. Astfel se va reduce hipereicosanoidia citolitică din musculatură, articulații și din diverse organe, după cum s-a văzut pe preparatele histologice. 3. Greutatea moleculară mică polipeptidelor și rezistența lor la sterilizarea prin căldură asigură administrarea parenterală a produsului care este lipsit de antigenicitate și de substanțe pirogene. 4. Credem că rezultatele obținute justifică interesul pentru această nouă cale terapeutică ce poate fi folosită în afecțiunile inflamatorii, în special în afecțiunile cronice inflamatorii reumatice.

## BIBLIOGRAFIE

1. BIRD J. si colab. — Antiinflammatory function of protein, Br. J. Pharmacol., 1979, 66, 455.
2. ANDREWS P., — Methods of Biochemical Analysis, sub redactia Glick D., Interscience Publ., 1970, vol. 18.
3. NEWBOULD B. B. — Brit. J. Pharmacol, 1963, 21, 127.
4. NUTA GH. si colab. — Investigatii biochimice, Edit. Didactica si Pedagogica, Bucuresti, 1977.
5. D'ATRI G., GOMARASCA P. — Attivita dei Ly -sartrosi o dei polipeptidi in esso contenuti sull in -fiammazione indotta da serotonina, Minerva Med., 1971, 62, 3—4, 71.
6. GOMARASCA P., D'ATRI G. — Attivita antisartrosi del Lysartrosi, Minerva Med., 1971, 62, 3—4, 153.
7. HOLLENDER J. L. — Arthritis and Allied Conditions, Lea & Febiger, Philadelphia, 1969.
8. KELLEY W. — Textbook of Rheumatology, Saunders Company, Philadelphia, 1981.
9. \* \* \* — Textbook of Immunopharmacology, sub redactia DALE M. M. si FOREMAN J. C., Black-well Scientific Publication, Oxford-London-Edinburgh-Boston-Melbourne.
10. OLINESCU R. — Peroxidarea în chimie, biologie si medicina, Edit. Stiintifica, Bucuresti, 1982.
11. SĂVULESCU A. — Le rhumatisme musculaire. Son traitement par desensibilisation régionale. Re-vue de sensibilisation, Bucuresti, 1935, 1 23.
12. SAVULESCU A. G., FLESCHEANU DORINA, VESCAN M, CRUCEANU AURELIA — Tratamento da Artrite com Lisados Proteicos, Acta Reuma. Port., vol. VII (Toma 1), nr. 23, marco 1979.
13. SAVULESCU A. G. — Imunoglobulinele plasmatice la bolnavii de spondilita anchilozanta tratati cu polipeptide injectabile. Comunicare la Simpozionul de Reumatologie, Suceava, sept. 1987. ^14. SĂVULESCU A. G., CAZAN MANUELA — Ni-velele de patogenitate în înțelegerea bolilor cronice reumatismale. Comunicare la Confresul Latin de Reumatologie, Bucuresti, sept. 1988.
15. SIMA I., CAZACU DOINA, NESTOR R. — Miozi-ta experimentală. Sesiunea stiintifică U.S.S.M., Reumatologie, Bucuresti, febr. 1981.

Articol intrat în redactie la 27.IX.1988

Indicele de clasificare : 615.739.65—017.59