

**VALORIFICAREA REZIDUURILOR DIN
VINIFICATIE CA ADITIVI ALIMENTARI SI
ANTIOXIDANTI IN INDUSTRIE**

**SINERGISME DE ACTIUNE BIOLOGICA „IN VITRO” IN
PROCESE PROLIFERATIVE CUTANATE CU
APLICABILITATE IN DEZVOLTAREA DE BIOPRODUSE**

Director proiect : CS I, Prof. Univ. Dr. Natalia Rosoiu

**Membru titular al Academiei Oamenilor de Știință din
Romania**

RAPORT INTERMEDIAR septembrie 2018

CSIII. Dr. Brindusa Dumitriu

CUPRINS

INTRODUCERE

CAPITOLUL I: MODULATORI AI PROCESELOR FIZIOLOGICE SI PATOLOGICE CU RELEVANTA IN REFACERE DERMICA SI PROGRESIE MELANOMICA

I.1. Refacere dermica – coordonare interdependentă unor factori celulari și moleculari

I.2. MELANOM – studiu de caz în dereglări hiperproliferative cutanate

CAPITOLUL II: MODELE EXPERIMENTALE

II.1 Model experimental de evaluare a in vitro a efectului de refacere tisulară prin tehnici de dozare a colagenului intracelular și prin evaluarea activității metaloproteinazelor matriceale – linia celulară HS27 (fibroblast uman dermic)

II.2 Model experimental de evaluare a statusului citotoxic – linia celulară B16-F10 (melanom murinic)

II.3 Model experimental de evaluare a procesului apoptotic – linia celulară B16-F10 (melanom murinic)

II.4 Model experimental de evaluare a statusului proliferativ în melanom – exemplificare linia celulară B16-F10 (melanom murinic)

CAPITOLUL III: STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND EFECTUL EXTRACTULUI BIOACTIV DE STRUGURI (TES) ASOCIAT CU EXTRACTUL DE TRIFOI ROSU (ET) ASUPRA TESUTULUI CUTANAT: REFACERE DERMICA VERSUS PROGRESIE MELANOMICA

III.1 Evidențierea procesului de refacere dermica prin determinarea colagenului intracelular/ biosintetizat și evaluarea activității metaloproteinazelor matriceale – linia celulară HS27 (fibroblast uman dermic)

III.2 Evaluare impact citotoxic asupra liniei celulare B16-F10 (melanom murinic)

III.3 Modularea statusului proliferativ și inducerea apoptozei în celule de melanom murin

CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE

INTRODUCERE

O tinta importanta in procesul de refacere dermica este regenerarea pielii degradate fara formare de cicatrici, greu de atins datorita complexitatii de factori si de cascade de semnalizare inter-relationate. In toate stadiile de vindecare, se manifesta impactul radicalilor liberi asupra interactiilor molecular, factori de crestere de tipul TGF- β , EGF, insulin-like growth factor-1, platelet-derived growth factor (PDGF), activatori-cheie ai fibroblastilor, celulelor endoteliale si macrofagelor din tesutul adiacent. Regenerarea unui tesut sanatos si functional ramane o provocare si datorita structurii multilamelare a pielii si a complexitatii celulare foarte bine organizate. In acest context, se impune evidentierea de noi agenti activi sau de combinatii de principii naturale care sa constituie tratamente moderne eficiente si lipsite de efecte adverse, atat in cazul agresiunilor mecanice, termice sau de alta natura la nivelul pielii, dar si reabilitarea unor conditii fiziologice.

Pe de alta parte, exista o serie de patologii ale tesutului cutanat, mai mult sau mai putin invazive si degradante la nivel dermo-epidermic. Dintre acestea, melanomul ocupa o pozitie aparte datorita invazivitatii, progresiei accelerate si metastazarii rapide. Exista diferite abordari terapeutice, dar problema rezistentei la terapie persista, precum si cea a raportului siguranta / eficienta pentru medicamentele aplicate. Exista multiple complexe farmaceutice anti-cancer derivate din surse naturale, botanice, marine sau microbiene. Printre cele mai importante mecanisme modulate ca eficienta anti-tumorală sunt inducerea apoptozei, proliferare celulara si inhibarea potentialului metastazant.

Considerand aceste argumente, cercetarile noastre vizeaza impactul extractului de struguri (TES), singular sau asociat cu alte componente vegetale din trifoi rosu, asupra unor mecanisme ce sustin regenerarea dermica: sinteza de colagen si modulare metaloproteinaze, dar si actiune anti-melanom prin inducerea apoptozei si efect anti-proliferativ.

Testarea acestor complexe vegetale este sustinuta de rezultate anterioare privind activitatea anti-oxidanta si anti-inflamatoare, de regenerare epidermala prin stimularea diferentierii keratinocitelor si stimularea turn-over-ului celular la nivel cutanat (efecte demonstrate pe linii celulare umane normale).

Se va investiga potentialul anti-tumoral al acestor extracte, avand in vedere si compozitia acestora - flavonoide, antociani, taninuri in compusul TES, respectiv isoflavone (genisteina, daidzeina, biochanina, formononetin) in extractul de trifoi, cu impact in modularea estrogenica a diferitelor tipuri de cancer.

CAPITOLUL I: MODULATORI AI PROCESELOR FIZIOLOGICE SI PATOLOGICE CU RELEVANTA IN REFACERE DERMICA SI PROGRESIE MELANOMICA

I.1. REFACERE DERMICA – COORDONARE INTERDEPENDENTA UNOR FACTORI CELULARI SI MOLECULARI

Proliferarea celulara si corelarea ei cu diverse cai metabolice (Calciu intracelular, protein kinaza C) este un parametru relevant atat pentru studii de fiziologie a pielii(Y. Soroka et al. / *Experimental Gerontology* 43 (2008) 947–957), cat si pentru explicarea unor procese la granita patologicului (ex. multiplicari aberante ale stratului corneum).

Derma este alcatuita in mare parte din fibre de collagen si elastina. Fibrele groase de collagen sustin pielea. Fibrele de elastina sunt foarte flexibile si confera rezistenta mecanica si elasticitate pielii. Derma are o grosime mult mai mare decat epiderma (3-4 mm fata de doar cei 1,5 mm ai epidermei), consta in mare parte din tesut conjunctiv / matrice extracelulara secretata de fibroblasti si alcatuita din proteine structurale: collagen si elastina, proteine specializate:fibrilina, fibronectina si laminina, si proteoglicani. Cele mai abundente tipuri de collagen din piele sunt I si III; fibrele lor formeaza retele responsabile de proprietatile mecanice ale pielii. Celelalte tipuri de collagen din piele sunt V, VI si XII si au rol de sustinere. (*J. Biol. Chem.*, Vol 274, Issue 51, 36083-36088, dec. 17, 1999)

In modelele experimentale de refacere dermica, se vor folosi agenti si tratamente pentru a **stimula sinteza** collagenului de tip I si III, tipuri dominante in piele. De asemenea, o alta cale de interventie terapeutica este **inhibarea degradarii** collagenului, eventual in combinatie cu stimularea sintezei. Astfel, preocupari stiintifice se axeaza pe gasirea unor inhibitori eficienti ai metaloproteinazelor (in particular: collagenaza).

Maladiile survenite in urma disfunctiei metabolismului collagenului in organismul uman se manifesta sub forma de procese degenerative apartinand unor domenii clinice diferite: dermatologie, chirurgie, cardiologie, reumatologie, gerontologie.

Collagenul, component ubicuitar si proteina cea mai abundenta din organismul uman (30% din masa proteica totala) este un biopolimer cu o structura interna deschisa, contine un numar mare de situsuri de legare disponibile interactiei cu diferite substante biologice active: hormoni, enzime, peptide, etc. Accesibilitatea acestora la situsurile de legare ale collagenului este facilitata de extraordinara capacitate hidrofila a acestuia. De asemenea, este implicat, direct sau indirect, in atasarea si diferentierea celulelor precum si in procese imunologice, astfel ca, in afara rolului sau structural, collagenul participa la procese complexe cum ar fi: dezvoltarea, morfogeneza si procesele patologice. Varietatea tipurilor de collagen nu este insa rezultatul exclusiv al diferentelor de structura la nivel molecular, ea aparand si ca rezultat al activitatii celulare in procesul de asamblare a moleculelor in structurile supramoleculare.

Din punct de vedere compositional, caracteristicile principale ale collagenilor sunt: proportia considerabila in care se gaseste glicina (Gly) (30-40%) si iminoacizii prolina (Pro) si hidroxiprolina (Hyp) (25-35%); aparitia formelor hidroxilate ale prolinei si lizinei (Lys) -Hyp si Hyl (hidroxilizina); glicozilarea variabila a anumitor resturi de Hyl cu glucoza (Glu) si

galactoză (Gal) în variantele Hyl-Gal și Hyl-Gal-Glu. La majoritatea tipurilor de collagen o porțiune însemnată a structurii primare este de tipul $-(\text{Gly-X-Y})_n-$, cu un conținut mare de aminoacizi în pozițiile X și Y. Variațiile în structura macromoleculară a collagenului, datorate diferențelor privind secvența de aminoacizi, gradele de glicozilare sau modificările post translationale duc la schimbări ale proprietăților lor biomecanice. La tipurile de collagen care au mai multe domenii triplu helicale, telopeptidele depășesc uneori, ca masă și volum, regiunea de triplu helix, ceea ce conferă moleculei o flexibilitate mult mai mare în raport cu cea a collagenilor fibrilari.

Collagenul se sintetizează intracelular (intrafibroblastic), sub forma unor molecule precursorare mari, solubile, denumite procollageni în care fiecare lanț prezintă în regiunile terminale peptide de extensie aditionale-propeptide. După secreția procollagenilor în spațiul extracelular, propeptidele sunt îndepărtate prin acțiunea unor procollagen metaloproteinaze. Moleculele care rezultă se autoasamblează spontan în imediată vecinătate a fibroblastelor pentru a forma fibrile, care la nivele superioare se pot organiza în fibre cu o dispunere în forme extrem de complexe. Sinteza moleculelor de collageni fibrilari și asamblarea extracelulară a acestora se realizează pe parcursul a două etape: una **intracelulară** (în care are loc sinteza lanțurilor polipeptidice de tipul lanțurilor pro- α ; hidroxilarea unor resturi de Pro și Lys; glicozilarea unor resturi de Hyl; adăugarea unui oligozaharid bogat în manoză; formarea moleculei de procollagen și secreția sa în spațiul extracelular) și una **extracelulară** (procesarea procollagenului în collagen; asamblarea moleculelor de collagen în fibrile; formarea fibrei de collagen). Pentru collagenii nefibrilari, biosinteza se realizează după aceleași etape ca la cei fibrilari existând însă diferențe notabile privind procesarea procollagenilor. Mulți collageni nefibrilari conțin propeptidele NH₂- și COOH-terminale neprocesate, iar collagenii FACIT prezintă situsuri de atașare pentru glicozaminoglicani.

În procesul de biosinteza a collagenului, a formării macromoleculei de collagen, a fibrilei, fibrilelor, țesutului collagenic, au loc o serie de reticulari, de reacții intra și intermoleculare, care asigură stabilitatea necesară fiecărui tip de țesut conjunctiv, numărul interacțiunilor variind în funcție de particularitățile metabolice și funcționale ale fibrilelor, astfel întâlnindu-se în fibrele de tendoane mai multe legături intermoleculare comparativ cu cele din derma (Chirita GH, 1993). Macromolecula de collagen devenită inertă din punct de vedere metabolic este supusă acțiunii unor agenți chimici sau produși intermediari de metabolism, care induc sau participă la formarea de noi legături intermoleculare, promovând în cursul vieții un proces lent de reticulare intermoleculară, precum și blocarea reactivității grupărilor implicate în aceste legături. Rezultatul acestor evenimente biochimice constă în scăderea volumului specific, a capacității de hidratare, a reactivității chimice, a posibilității de difuzie a solventilor, asociate cu o creștere a rezistenței mecanice.

Degradarea collagenului din matricea extracelulară se datorează în mare parte activității proteolitice a metaloproteinazelor (MMP-uri) ce sunt exprimate atât de fibroblastele dermice cât și de celulele inflamatorii, având un rol important în remodelarea matriceale de la nivelul pielii supuse unui proces inflamator de lungă durată (Kahari și Saarialho-Kere, 1997).

Familia metaloproteinazelor matriceale (MMP) este formată de 28 de metaloendopeptidaze Zn dependente, înrudite structural, secretate sau supraexprimate pe suprafața celulelor, ce mediază hidroliza la pH neutru a moleculelor structurale din matricea extracelulară (ME) -

colageni, proteoglicani si glicoproteine - atat *in vivo* cat si *in vitro* fiind implicate in procesele mediatorilor inflamatori si a factorilor de crestere (d'Ortho et al., 1997; McQuibban et al., 2000). In virtutea acestor proprietati, acest grup de enzime au o importanta deosebita in remodelarea tisulara si in vindecarea ranilor, dar sunt si un element important in progresia bolilor inflamatorii si in invazia tumorală cun sunt vindecarea ranilor sau invazia tumorală (activitatea proteolitica a protein enzimelor fiind corelata cu potentialul metastazic al celulelor tumorale) (Nelson et al., 2000). Ele sunt secretate in forme latente (*proMMP*) care sunt activate in spatiul extracelular prin scindarea unei propeptide N-terminale. Pe baza structurii domeniului catalitic si a specificitatii fata de substrat, componentii acestei clase de enzime este reprezentata de cel putin 19 produsi genici diferiti repartizati in 5 subfamili: collagenaze interstițiale (MMP-1, MMP-8, MMP-13, si MMP-18); collagenaze tip IV / gelatinaze (MMP-2 si MMP-9); stromelizine (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11 si MMP-12); metaloproteinaze matriceale de tip membranar (MMP-14, MMP-15, MMP-16 si MMP-17) si altele (MMP-19 si MMP-20). Domeniile distincte structural-funcțional homoloage între membrii familiei servesc ca factori determinanți în interacțiunile cu ligandi si în activitatea catalitica a enzimelor. Tintele proteolitice ale proteinazelor dependente de zinc (metzincine) includ: proteine extracelulare, alte proteinaze, inhibitori proteinazici, factori de coagulare, molecule chemotactice, factori de crestere în stare latentă, proteine de legare a factorilor de crestere, receptori localizati pe suprafața celulară, molecule de adeziune, mediatori apoptotici.

Majoritatea MMP-urilor contin un prodomeniu ce este îndepărtat în timpul activării enzimei, un domeniu catalitic, un domeniu de tip carboxiterminal hemopexin (domeniu homopexin) iar gelatinazele, MMP-2 si MMP-9, prezintă inserat în situsul catalitic un domeniu aditional de legare la molecula de collagen. Domeniul de legare la collagen din MMP-2 se atasează specific nu doar la collagenul de tip I, dar deasemeni si la o serie de tipuri de collagen si elastina în stare nativă sau denaturate devenind astfel substraturi pentru MMP-2.

În pielea umană, au fost evidențiate o serie de MMP-uri exprimate de HaCaT ce sunt activate pe parcursul procesului de re-epitelizare după vindecarea ranilor precum si în unele dermatoze (fibroza dermală, melanom). În general, procesele degradative ale pielii implică cel puțin trei membri ai familiei MMPs (Fisher si Voorhees, 1998):

- collagenaza care scindează collagenul tip I si III fibrilar;
- gelatinaza de 92 kDa care scindează mai departe produsii acțiunii collagenazei, degradând si collagenul tip IV si elastina;
- stromelisina, care degradează collagenul tip IV, elastina si alte molecule ale ME, ca proteoglicanii si lamininele.

MMP-1 (numită si collagenaza-1, collagenaza interstițială, collagenaza din fibroblaste) a fost detectată inițial în fibroblastele gingivale, prezentând două forme latente 57 kDa si 52 kDa (în raport de 1:4) iar formele active au 48 kDa si respectiv 42 kDa (enzima stabilă si activă). Gena pentru MMP-1 este transcrisă într-o specie moleculară mRNA de 2,5 kb. Regiunea promotor a genei umane ce codifică MMP-1 conține elemente AP-1 (activator protein-1), care sunt capabile să medieze procesul inductiv realizat de către PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). pro-MMP-1 de 57 kDa este rezultatul N-glicozilării formei de 52 kDa. Activitatea collagenolitica a MMP-1 este mediata de motivul 183RWTNRFREY191 din domeniul

catalitic in cooperare cu domeniul hemopexinic C-terminal. Enzima activa hidrolizeaza colagene tip I si III in fragmente N-terminale si C-terminale si catenele Y din collagenul de tip II, VII, X si VIII, Y2-macroglubulina, gelatina si cazeina, inhibitorul Y1-proteinazei, Y1-antichimotripsina, tenascina si IL-1 (Chung si colab., 2000). Tinand cont de faptul ca moleculele de collagen sunt proteinele cele mai abundente din organism atunci putem considera ca MMP-1 joaca un rol cheie in remodelarea tisulara care are loc atat in conditii patologice cat si fiziologice (Bauer, E.A. 2001). Identitatea collagenazei din piele umana cu cea din celulele sinoviale, precum si ubiquitatea acestei enzime si a substraturilor sale indica faptul ca mecanismul comun ce controleaza collagenoliza este operativ atat in conditii normale cat si patologice.

MMP-2 (gelatinaza A) este cunoscuta ca o gelatinaza cu o masa moleculara de 72kDa. Gena MMP-2 este alcatuita din 17kb si contine 13 exoni ce variaza in dimensiuni de la 110 la 901pb, precum si 12 introni de 175 pana la 4350pb (Bigg, H.F. 2003). Locatiile intronilor 1, 4, 8 si 12 ai genei MMP-2 coincid cu locatiile intronilor pentru collagenaza interstitiala si stromelizina, indicand o relatie structurala stransa a acestor metaloenzime. Datorita prezentei domeniului C-terminal hemopexin – like din MMP-2, a fost observata legarea cu inalta afinitate a progelatinazei A de TIMP-4 (Brooks, P.C., 2001). Aceasta enzima preinta capacitatea de a hidroliza gelatina, collagenul de tip I, IV, V, VII si XI, fibronectina, laminina, agregani si elastina (Nagase, H.; 1996)

MMP-3 (stromelizina) a fost purificata si caracterizata din fibroblaste sinoviale reumatoide umane si cele din piele, promotorul genei MMP-3 continand trei secvente pentru inducerea mitogenica:

- SPRE (stromelysin-1 PDGF-responsive element) - este un situs de legare a factorului transcriptional SPBP (SPRE-binding protein), ce induce transcrierea altor factori de transcripție (Rekdal si colab., 2000),
- PEA3 (polyomavirus enhancer A-binding protein-3 site) - TPA (12-OTetradecanoylphorbol 13-acetate) se leaga la situsul PEA3 si mediaza transcrierea genei MMP-3 umane
- AP-1 - mediaza exprimarea bazala a genei MMP-3.

pro-MMP-3 are 57 kDa si poate fi glicozilata la o forma moleculara de 60 kDa. Ea este procesata la o forma intermediara de 53 kDa, prin indepartarea unei pro-peptide de 35 aminoacizi. Autoliza formei intermediare are ca rezultat o forma MMP-3 activa de 45 kDa, ce poate fi procesata mai departe la o forma activa de 28 kDa. Formele enzimatiche latente si active a MMP-3 cu masa moleculara mare se pot lega la fibrilele de collagen si la alte componente ale MEC prin domeniul C-terminal, in timp ce formele active cu masa moleculara mica nu pot realiza acest lucru.

In timp ce MMP-1 scindeza numai collagenul tip I, MMP-3 releva cea mai larga specificitate de substrat scindand proteoglicanii din cartilaj, gelatina, colagene tip IV si IX, procollagenul tip III, laminina si fibronectina, actioneaza ca o telopeptidaza fata de colagene tip II si XI si hidrolizeaza collagenul tip X si agrecanul. Mai mult, MMP-3 degradeaza fibrinogenul si fibrina, IL-1, decorina, activatorul plasminogenului tip urokinaza si PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) si IgG. pro-MMP-3 activeaza plasminogenul prin

complexare cu acesta si cu t-PA (tissue-type plasminogen activator) (Arza si colab., 2000). Utilizand hibridizarea in situ si imunohistochimia s-a aratat ca stromelizinele I si II sunt produse de catre populatia de keratinocite intr-o varietate de boli ulcerative cronice (Humphries, S.E., 2002). Stromelizina I s-a detectat in keratinocitele bazale adiacente dar nu distale de locul injuriei care reprezinta probabil situsuri de proliferare ale epidermei. Stromelizina II a fost observata numai in keratinocitele bazale in timpul migrarii, in aceleasi populatii de celule epidermale care exprima si collagenazele (Gatti, R.A. 2000). Astfel Stromelizina I este produsa de keratinocitele aflate pe membrana bazala, in timp ce keratinocitele ce produc stromelizina II sunt in contact cu matricea dermala. Avand in vedere faptul ca stromelizina I este predominanta in fibroblastele dermale pe cand stromelizina II nu s-a observat in nici un tip de celule dermale se considera ca ele au roluri distincte in procesele de reparare tisulara, fiind produse de populatii diferite de keratinocite bazale ca raspuns la injuriile epidermice.

MMP-3 si MMP-1 prezinta o identitate de 54% a secventei proteice

MMP-9 (gelatinaza B) este o endopeptidaza zinc dependenta implicata in degradarea proteolitica a collagenului tip III, IV, V, XIV si a elastinei din matricea extracelulara (Woessner 2002). Ambele gelatinaze prezinta trei domenii repetitive omoloage cu domeniul de tip II din fibronectina. Aceste domenii sunt responsabile de abilitatea MMP-9 de a hidroliza gelatina, laminin, collagenul I si IV. Recent, s-a dovedit ca fibrilina este tinta atacului proteolitic a unor MMP-uri si serin-proteinaze ca elastaza din neutrofile (Scharffetter-Kochanek si colab., 2000).

Reglarea matricei extracelular implica un echilibru intre sinteza componentelor sale structurale si degradarea lor sub actiunea catalitica a MMP – urilor a caror functie biologica este modulata de inhibitori tisulari specifici ai metaloproteinazelor matriceale (TIMP). Suprareglarea activitatii MMP, favorizeaza degradarea proteolitica a membranei bazale si a matricei extracelulare, este corelata cu cresterea tumorală si metastaza, precum si cu angiogeneza asociata tumorilor, in timp ce inhibarea activitatii MMP pare a restrictiona aceste procese.

Culturi celulare de fibroblasti dermici

Fibroblastii sunt celulele cele mai numeroase care se gasesc în țesutul conjunctiv liber și sunt responsabile pentru producerea tuturor elementelor sale sau precursorilor acestora. Fibroblastii sunt celulele cel mai ușor de cultivat in vitro, cerințele lor de creștere sunt minime, în comparație cu alte tipuri de celule umane. Izolarea și propagarea lor au ajutat nu numai în înțelegerea biologiei acestor celule cat si a altora, servind ca celule de control pentru aproape toate activitățile de investigație făcute până acum. De asemenea, au fost folosite frecvent în teste farmacologice și in reconstrucția pielii. Fibroblastii sunt cultivati în mediu DMEM suplimentat cu L glutamină și 10% ser fetal de vițel. Ele pot fi, de asemenea, adaptate să crească într-un mediu de cultura fara ser .

Când sunt cultivati în monostrat, fibroblastii dermici au o formă alungită , cu un nucleu proeminent, sunt mici în diametru si au o rată ridicată de crestere.

Fibroblastii obținuți de la nou-născuți, în general, au răspuns mitogenic mai mare decat fibroblastii maturi și această imbatranire, asociata factorului de creștere ar putea contribui la

scăderea capacității de proliferare a celulelor donatoare -mature. S-a demonstrat că fibroblastii dermali posedă o capacitate limitată de replicare 5-10 dublări, și încetează apoi replicarea, ca răspuns la factorii de creștere. Celulele cultivate, până la sfârșitul duratei de replicare in vitro supraexprima activitățile metaloproteinazei care pot explica distrugerea progresivă, corelată cu vârstă, a componentelor de collagen și elastina ale matricei extracelulare .

În contrast cu fibroblastii dermali, fibroblastii lezați, cresc încet și au o formă de stea extinsă și cu fibre citoplasmice accentuate. α actina din mușchii netezi a fost detectată în citoplasma majorității fibroblastilor lezați. De asemenea fibroblastii contractează gelurile de collagen în primele zile, mai puternic decât fibroblastii dermali. Rezultatele arată că in vitro fibroblastii lezați au o capacitate contractilă mai mare decât celulele dermale. Cantitatea semnificativă de fibroblaști lezați ce conțin α actina din mușchii netezi, sugerează că această cantitate poate fi corelată cu concentrația leziunii.

Fibroblastii dermali sunt sursa de collagen și elastina a matricei extracelulare. Procolagenii sunt secretați prin aparatul Golgi în spațiul extracelular unde propeptidele N-terminal și C-terminal sunt clivate de proteaze specifice. Moleculele agregate de collagen matur prelucrate pentru a forma fibrele mai mari de collagen și de a ajuta la formarea matricei cu alte componente. Prin urmare, producerea și depunerea normală d.p.d.v. structural și funcțional a collagenului de tip I pentru realizarea țesutului conjunctiv normal d.p.d.v. fiziologic are nevoie de parcurgerea catorva etape. Anomaliile aparute în orice etapă pot provoca hipo-, hiper-, sau sinteza și acumularea de collagen deficitare în ECM, care la rândul lor, provoacă diverse boli la om, cum ar fi osteogeneza imperfectă, scorbut, sclerodermia sau scleroză sistemică, keloizii, și altele. Niveoul ridicat de collagen de tip I în fibroblaste pielii afectate de sclerodermie se datorează în primul rând creșterii ratei de transcriere a genei de collagen. Numeroase dovezi sugerează că TGF- β joacă un rol semnificativ în fibroză

Fibroblastii pielii sunt, de asemenea, o sursă importantă de diferite citokine, de exemplu, IL -1 și 6, chemokine, de exemplu, ciclooxygenazei 2 (COX-2) și factori de creștere, de exemplu, FGF, IGF-1 α , care au efecte autocrine și paracrine semnificative.

Interferonii α , β și γ suprimă sinteza de collagen de către fibroblastii dermici. În special, IFN- γ inhibă constitutiv sinteza crescută de collagen caracteristică a fibroblastilor proveniți de la leziuni ale pacienților cu sclerodermie. Inhibarea sintezei de collagen de IFN- γ este asociată cu o inhibare coordonată a transcrierii pentru collagenul de tip de I și III. Studiile pe animale au demonstrat că IFN- γ inhibă sinteza de collagen asociată cu răspunsul fibrotic la un corp strain implantat, bleomicina induse de fibroză pulmonară, și răspunsul la vindecarea arsurilor termice cutanate. Interferonul α poate reduce dimensiunea keloizilor incipienti

Hyaluronanul este o componentă omniprezentă a matricei extracelulare, și este prezent în concentrații mari în piele, articulații și cornee. În piele, este sintetizat în principal de fibroblastii dermici și într-o măsură mai mică, de keratinocitele epidermice. Este frecvent utilizat în produsele cosmetice și preparate de îngrijire a pielii

Fibroblastii pielii, joacă de asemenea un rol important în inflamație. Ei, în afară de neutrofile și macrofage, pot elabora matricea metaloproteinazelor proinflamatorii 1, 3 și 9, ca răspuns la agenții vătămatori, cum ar fi complexe imune, lipopolizaharidele și radiația UVB atât directă, cât și indirectă și IL-1 α și 6 eliberate de keratinocitele

Fibroblastii dermali pot contribui la hiperplazia epidermică de psoriazis prin promovarea proliferării keratinocitelor prin intermediul IGF-1, secreție ce ar putea fi modulată prin citokinele inflamatorii, cum ar fi IFN- α

Având în vedere faptul că substanțele de sinteză și semisinteză, utilizați pe scară largă în trecut au produs de multe ori efecte secundare nedorite, datorită lipsei de specificitate și efectelor de intoleranță cauzate de absorbția și/sau metabolizarea inadecvată, în prezent se constată o tendință accentuată, atât pe plan internațional cât și național, către terapiile bazate pe extracte din produse naturale.

Din marea varietate a substanțelor biologice active extrase din plante un loc aparte îl ocupă:

- fitohormonii - factori de creștere și modulatori enzimatici (de tipul auxinelor, giberelinelor și citokinetinelor) ce stimulează procesele de morfogeneza, biosinteza acizilor nucleici și proteinelor, cu efect inhibitor asupra procesului de îmbătrânire;

- pigmentii naturali (carotenoizii, flavonoizii, compuși chinonici și indolici) sunt: α , β , γ - carotenul, xantofilele, naftochinonele, antrachinonele, antocianidinele, melaninele având rol de antioxidanți și vitamine pe care le sintetizează organismul (de exemplu vitamina K) și care participă în sisteme redox celulare, ca și antibiotice naturale. La acestea se adaugă glicozidele (cardiotonicele, saponinele, tomatina și altele) care prin conținutul de sulf au un puternic efect antioxidant;

- taninurile, uleiurile eterice, alcaloizii și unele substanțe antibiotice (alicina din usturoi, acidul cafeic, acidul ferulic din morcov) cu acțiuni specifice.

În ceea ce privește efectul antioxidant al tocotrienolilor, s-a stabilit că sunt de 40-60 de ori mai puternici antioxidanți decât tocoferolii din Vitamina E, iar **catechinele, care se găsesc în strugurii roșii**, au o puternică acțiune antioxidantă prin captarea radicalilor liberi oxigenați.

Catechinele sau flavanolii: denumesc o familie de compuși polifenolici răspândiți predominant în ceaiul verde dar cantități mai mici din acești compuși flavonoidici se găsesc și în ceaiul negru (fermentat), vin și struguri. Datorită activității lor antioxidante puternice, de aproximativ 25-100 ori mai puternice decât cea a vitaminelor C și E, acești derivați au fost studiați în legătură cu proprietățile anticancerigene, cardio- sau imunoprotectoare. Polifenolii din alimente de origine vegetală și unele bauturi par a fi determinanți ai unui risc redus de cancer. Această ipoteză se bazează pe dovezi din ce în ce mai numeroase provenite din studii epidemiologice, studii pe animale și experimente *in vitro*. Astfel studiile pe animale purtătoare de tumori transplantate sau cărora li s-a indus tumori prin agenți chimici sau fizici sunt foarte utile pentru a constata care sunt efectele protectoare ale unor agenți antioxidanți *in vivo*.

A fost demonstrată capacitatea *Quercetinului* și a altor tipuri de flavonoide de a modifica biosinteza eicosanoidelor (răspuns antiinflamator), protejează lipoproteinele cu densitate mică (LDL) de procesele oxidative (prevenirea formării plăcii de aterosclerose), previne agregarea plachetelor (efect antitrombotic). Suplimentar flavonoidele au manifestat proprietăți antivirale, anticarcinogene și antihipertensive.

Efectul antioxidant al *carotenoidelor* a fost demonstrat în numeroase studii, dintre carotenoidele identificate cel mai activ fiind licopenul, prezent în extractul din flori de *C. officinalis* alături de alți pigmenti carotenoizi. Studii *in vivo* asupra licopenului au demonstrat corelația dintre efectul antioxidant și reducerea denaturării ADN și a peroxidării lipidice. De

asemenea a fost studiat fitosinergismul dintre β -caroten, acid ascorbic și α -tocoferol cu potentarea mutuală a efectului antioxidant (Kim et al., 2011). Ca agenți de chemoprevenție carotenoidale (licopenul) sunt implicate în modularea răspunsului inflamator mediat umoral (Annand et al., 2008).

Tocoferoli: efectul de stingere al radicalilor este comparabil pentru α -tocoferol și α -tocotrienol în soluție de hexan. În schimb în lipozomi constanta de viteză de reacție a α -tocotrienolului este de 1,5 ori mai mare ca a α -tocoferolului. În microzomii de ficat de sobolan eficacitatea α -tocotrienolului în protecția contra peroxidării lipidice (indusă cu $\text{Fe}^{2+} + \text{NADPH}$) a fost de 40 ori mai mare decât în cazul α -tocoferolului. De asemenea, α -tocotrienolul a fost de 65 de ori mai puternic în protecția citocromului P450 în oxidarea peroxidică.

Cisteina (acidul α -amino- β -propionic): este un aminoacid conținut într-o largă varietate de proteine care are acțiune antioxidantă. Mecanismul sugerat de mulți cercetători ar fi creșterea nivelului sintezei GSH și prin aceasta un efect de detoxifiere, dar și de stimulare a sistemului imunitar. Cisteina determină și efecte inhibitorii ale progresiei tumorale a angiogenezei atât în sisteme *in vitro* cât și *in vivo*.

I.2. MELANOM – studiu de caz în dereglări hiperproliferative cutanate

Melanomul este al doilea cel mai frecvent cancer invaziv, și a arătat o incidență crescândă la tineri adulți. (Mitchell E.Fane, Yash Chhabra, David E.J.Hollingsworth, Jacinta L.Simmons, Loredana Spoerri, Tae Gyu Oh, Jagat Chauhan, Toby Chin, Lachlan Harris, Tracey J.Harvey, George E.O.Muscat, Colin R.Goding, Richard A Sturm, Nikolas K.Haass, Glen M.Boyle, Michael Pipera, Aaron G.Smith, *NFIB Mediates BRN2 Driven Melanoma Cell Migration and Invasion Through Regulation of EZH2 and MITF*, *EBioMedicine* 16 (2017) 63–75)

Stressul oxidativ este implicat în dezvoltarea cancerului, și, de asemenea promovează migrația, invazia și metastazarea tumorală. (Simone Reuter, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi, and Bharat B. Aggarwal, *Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?* *Free Radic Biol Med.* 2010 December 1; 49(11): 1603–1616)

Există anumite produse cu potențial fito-terapeutic confirmat în chemo-prevenția tumorală, acțiunea lor bazându-se pe modularea unor mecanisme tinta de tipul: apoptoza, stress oxidativ, status proliferativ, invazivitate. Compusii fitochimici din surse naturale joacă roluri importante ca agenți antioxidanți, agenți anti-proliferativi ai celulelor tumorale și apoptoza celulelor canceroase induse. Compusii roșii și purpurii din produsele naturale sunt recunoscuți ca fitofenoli. Aceste substanțe fitochimice joacă un rol crucial ca proprietate anti-cancerigenă. (Zorița DIACONEASA¹, Florica RANGAI¹, Dumitrița RUGINĂ², Loredana LEOPOLD¹, Oana POP¹, Dan VODNAR¹, Lucian CUIBUS¹, Carmen SOCACIU^{*1} *Phenolic Content and Their Antioxidant Activity in Various Berries Cultivated in Romania*, *Bulletin UASVM Food Science and Technology* 72(1) / 2015; Hou DX, *Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins*. *Curr Mol Med.* 2003 Mar;3(2):149-59).

De exemplu, extractul de *Nymphaea stellate* s-a dovedit a avea un rol important în activitatea bioactivă ca agent chimic preventiv asupra modulației apoptozei induse de stres oxidativ celular și a apoptozei induse de stres oxidativ și suprimarea invaziei celulelor canceroase. Astfel extractul *Nymphaea stellate* prezintă un efect toxic semnificativ pentru

celule de melanomul B16 cu $IC_{50} = 814 \text{ pg/ml}$. Extractul la 800 și 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a demonstrat activitate pro-oxidantă legată de apoptoza celulară. Concentrațiile scăzute ale extractului la 200 și 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$ au arătat funcția antioxidantă asociată cu efectul inhibitor al invaziei celulelor melanomului. (Aimvijarn P., Palipoch S., Okada S., Suwannalert P., *Thai Water Lily Extract Induces B16 Melanoma Cell Apoptosis and Inhibits Cellular Invasion Through the Role of Cellular Oxidants, Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19 (1), 149-153*).

Flavonoidele, sunt un grup de compusi fenolici care sunt distribuite pe scară largă în plante și ciuperci. Ei au fost bine cunoscuți pentru beneficiile lor antioxidante, antimicrobiene și antiinflamatorii. Cercetările au pus accent pe o subclasă, izoflavone, care se găsesc în principal în boabele de soia, alimente din soia și legume. Este binecunoscut faptul că isoflavonele acționează ca fitoestrogeni pentru a exercita activitate pseudohormonală prin legarea la receptorii de estrogen (ER) la mamifere și au, de asemenea, activități antioxidante, anticanceroase, antimicrobiene și antiinflamatorii, la fel ca alte flavonoide. Daidzeina și genisteina sunt cele mai comune isoflavone, ale căror caracteristici chimice structurale (inelul B este legat de poziția C3 a inelului C în loc de poziția C2) seamănă cu structura estrogenilor, în special 17-estradiol.

Genisteina, unul dintre principalele izoflavone din soia, a primit multă atenție în ultimii ani, fiind un potențial agent anticancerigen datorită efectelor sale largi asupra unui număr de procese celulare. S-a dovedit a fi un agent antioxidant, cu proprietăți estrogenice sau anti-estrogenice slabe și cu efect inhibitor asupra activității de kinazei S6 ribozomale, tirozin-kinazei, topoizomerazei 11 și a angiogenezei in vitro. Genisteina, de asemenea, are proprietăți citostatice, posibil datorită capacității sale de a inhiba progresia ciclului celular în apropierea graniței S-G2, la G1A, precum și în G2. În plus, s-a raportat că genisteina a indus atât diferențierea celulelor cât și ruperea catenei ADN-ului în mai multe linii celulare. In vitro, celulele de melanom au prezentat o creștere a sensibilității la genisteină cu creșterea timpului de expunere, culminând cu o inhibare de creștere de 50% (IC_{50}) la 12,5 μM după 7 zile. Creșterea tumorilor solide implantate în șoareci femele C57BL/ 6J a fost inhibată cu 50% atunci când șoarecii au fost hrăniți cu genisteină timp de o săptămână înainte și timp de 1 săptămână după inocularea cu celulele melanom B16. Concentrațiile plasmatice de genisteină în momentul îndepărtării tumorii au fost de 1,1 μM , care sunt similare cu nivelurile raportate la consumul alimentar de către oameni cu conținut ridicat de soia sau produse din soia, în timp ce animalele de control nu aveau genisteină detectabilă în plasmă. Rezultatele noastre oferă dovezi suplimentare in vivo care sugerează că genisteina întârzie creșterea tumorilor implantate, adăugând în continuare studii care sugerează că acest isoflavonoid este o componentă biologic activă a alimentelor din soia. (Record IR¹, Broadbent JL, King RA, Dreosti IE, Head RJ, Tonkin AL. *Genistein inhibits growth of B16 melanoma cells in vivo and in vitro and promotes differentiation in vitro. Int J Cancer. 1997 Sep 4;72(5):860-4.*)

Genisteina a inhibat, de asemenea, creșterea celulelor de cancer mamar estrogen-independente. În ultimii ani, genisteina a atras atenția deoarece s-a demonstrat că fiind un inhibitor puternic al proteintirozin-kinazelor (PTK), cum ar fi receptorii pentru factorul de creștere epidermal și factor de creștere derivat din plachete. Deoarece fosforilarea tirozinei proteice dependentă de PTK joacă un rol crucial în proliferarea și transformarea celulelor, genisteina poate avea importante proprietăți anti-cancer. Pe lângă efectele inhibitorii asupra proliferării celulelor canceroase, genisteina poate induce apoptoza în celulele leucemice [S],

suprimă creșterea celulelor endoteliale vasculare și angiogeneza și previne transformările celulare induse experimental sau a cancerului de animale. Astfel,trebuie extinsa investigarea proprietăților anti-cancer și mecanismele moleculare ale genisteinei, pentru a evalua posibilitatea dezvoltării genisteinei ca medicament anti-canceros derivat din plante, cu un nivel scăzut de toxicitate. Aici raportăm efectele genisteinei asupra stării de diferențiere a celulelor canceroase epiteliale. Derivat de la melanomul de șoarece B16, celulele B16-BL6 sunt maligne astfel încât pot coloniza în plămânii animalelor atunci când acestea sunt transplantate subcutanat în șoarece C57 BL/6. După expunerea la genisteina, s-a găsit inducerea de fenotipuri diferențiate în aceste celule. Studiile mecanice au evidențiat modificări ale structurii asociate cu citoscheletul și fosforilarea protein-tirozinei și modificarea expresiilor genice legate de tumori. Ca inhibitor al PTK, genisteina poate servi drept un compus candidat pentru chimioterapia tumorilor solide. (*Chun-Hong Yan , Xiao-Guang Chen , Van Li & Rui Han (1999) Effects of Genistein, A Soybean-Derived Isoflavone, on Proliferation and Differentiation of B16-BL6 Mouse Melanoma Cells, Journal of Asian Natural Products Research, 1:4, 285-299)*

CAPITOLUL II: MODELE EXPERIMENTALE

II.1 Model experimental de evaluare a in vitro a efectului de refacere tisulara prin tehnici de dozare a collagenului intracelular si prin evaluarea activitatii metaloproteinazelor matriceale – linia celulara HS27 (fibroblasti umani dermici)

a. Determinarea collagenului total - marcare cu Sirius Red/Fast Green

Fibroblastii (HS27) au fost cultivati timp de 24 h in placi cu 12 de godeuri in mediu de cultura DMEM, suplimentat cu 10 % ser fetal bovin si 1% antibiotic. Celulele au fost tratate timp de 48h. Dupa cele 48h, se colecteaza mediul de cultura (se va determina spectrofotometric collagenul secretat in mediu precum si activitatea metaloproteinazelor).

Mod de lucru: celulele se spala de doua ori cu PBS rece (se lucreaza numai pe gheata); urmeaza fixarea cu metanol la -20°C timp de 20 min si colorare cu Sirius red/Fast green (Chondrex, Gentaur) timp de 30 min, la temperatura camerei, cu agitare usoara. Celulele se spala cu 0.01N HCl si se fotografiaza cu microscopul optic. Pentru cuantificarea collagenului total, colorantul reactionat cu collagenul a fost eluat cu 1 ml NaOH 0.1N, iar absorbantele solutiei obtinute au fost citite la spectrofotometru la lungimile de unda de 540 nm (colagen/Sirius Red) si la 605 nm (proteina non-colagenoasa/ Fast Green).

b. Identificare si dozare metaloproteinaze matriceale

Este o metoda de estimare a concentratiei de gelatinaze (MMP-2 si MMP-9) din mediul conditionat se bazeaza pe capacitatea acestor enzime de a se renatura dupa migrarea electroforetica in geluri de poliacrilamida-SDS copolimerizate cu gelatina si indepartarea SDS prin spalari repetate cu Triton X-100, enzimele exercitandu-si astfel activitatea proteolitica asupra substratului copolimerizat pe parcursul a 18 h de incubare la 37°C intr-un tampon format din 0.6055g Trizma base si 0,1472 g CaCl₂ (pH=8). Cu toate ca in mediul de cultura MMP-urile sunt frecvent asociate cu inhibitorii lor endogeni (TIMP), in timpul electroforezei inhibitorii disociaza de proteinenzime, astfel actiunea lor nu interfereaza in detectia activitatii enzimatice. Zimogramele au fost scanate si analizate semi-cantitativ cu softul ImageLab prin densitometria benzilor proteice cu activitate enzimatica ce apar ca plaje de liza, iar identificarea tipului de MMP s-a realizat pe baza maselor moleculare.

II.2 Model experimental de evaluare a statusului citotoxic – linia celulara B16-F10 (melanom murin)

Eliberarea lactat-dehidrogenazei în mediu celular, marker de citotoxicitate: Aceasta metoda se bazeaza pe degradarea membranei celulare, determinand eliberarea de citoplasma in mediul extracelular ca urmare a expunerii celulelor la actiunea compusilor/ produsilor testati.

Lactat dehidrogenaza (LDH) este o enzimă citosolică prezentă în toate celulele, care în condiții fiziologice normale ale membranei plasmatică rămâne în citoplasmă. Eliberarea *in vitro* a LDH asigură o modalitate precisă de măsurare a integrității membranei celulare și, implicit, a viabilității celulelor [1]. Eliberarea LDH în supernatantul culturii celulare se măsoară printr-un test în care au loc două reacții enzimatice cuplate, catalizate de LDH și diaforaza, ce determina conversia unei sari de tetrazolium într-un compus roșu de formazan [2].

Reducerea MTS, marker al viabilitatii celulare: Tratarea celulelor cu MTS, o sare de tetrazolium 3(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-H-tetrazoliu permite evaluarea metabolismului oxidativ si a raspunsului unei populatii celulare la factori externi ce pot avea un efect pozitiv sau negativ asupra vietii celulelor in cultura. Din acest motiv testul MTS este folosit in studiile de viabilitate și proliferare celulară [3]. Conversia MTS în formazanul solubil în apă are loc sub acțiunea enzimelor (dehidrogenaze) ce se găsesc în celulele metabolice active. Cantitatea de formazan produsă, măsurată ca absorbanță la 490 nm, e direct proporțională cu numărul de celule vii din cultura [4, 5].

Astfel, prin corelarea testului MTS cu cel de eliberare a LDH se poate cuantifica corect efectul unui compus/ produs asupra viabilitatii celulare.

II.3. Model experimental de evaluare a procesului apoptotic – linia celulara B16-F10 (melanom murinic) - Inducerea apoptozei – evidentiarea % celular de celule vii / moarte / apoptoza timpurie / apoptoza tarzie – prin citometrie in flux

Principiul metodei: In celulele apoptotice, fosfatidilserina (PS) este translocata de pe fata interna pe cea externa a membranei plasmatice. Anexina V este o proteina de 35-36kDa care leaga fosfolipidele intr-un proces dependent de Ca^{2+} si are afinitate crescuta pentru PS. Deoarece externalizarea PS are loc in stadii timpurii ale apoptozei, marcarea cu anexina detecteaza apoptoza in stadii anterioare fragmentarii ADN. Dubla marcarea fluorescenta FITC-A si PE_A si analiza statistica (softul FACS Diva 6) permit estimarea procentului de celule corespunzator unui anumit tip de moarte celulara. (fig.1)

Materiale: -kit ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION (BD PHARMINGEN)

Aparatura: Citometru in flux FACS Canto II, soft de achizitie si analiza a datelor: DIVA 6

Fig.1: Evidentiarea % celular de celule vii / moarte / apoptoza timpurie / apoptoza tarzie – prin citometrie in flux:

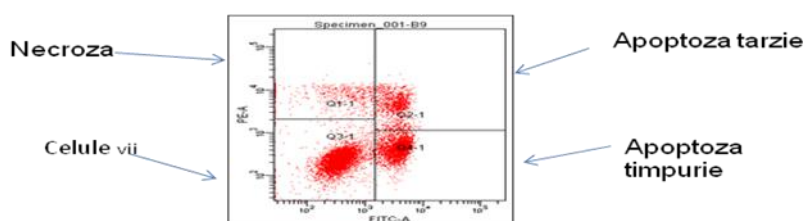


Fig.1: Model de analiza a apoptozei prin citometrie in flux

II.4. Model experimental de evaluare a statusului proliferativ in melanom – exemplificare linia celulara B16-F10 (melanom murinic)

a) Determinarea proliferarii celulare prin evidentiarea generatiilor succesive -

Principiul metodei: CFSE (carboxy fluorescein diacetat succinimid ester) este un colorant incolor, nefluorescent care difuzează pasiv în celulă. Aici, gruparea di-acetat este scindată de către esterazele intracelulare, rezultând forma puternic fluorescentă a compusului. Aceasta reacționează cu aminele intracelulare, formând conjugați fluorescenți care sunt reținuți în celulă. În timpul diviziunii celulare acești conjugați fluorescenți sunt distribuiți egal între

celulele fiice, permițând rezoluția generațiilor celulare formate succesiv până la 8 cicluri de diviziune. Intensitatea de fluorescență scade pe măsură ce generațiile sunt mai îndepărtate de populația mamă. Rezultatele se estimează ca Indice de Proliferare sau ca variație a procentului de celule în populația mamă.

Material si reactivi:

- Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen)
- Tampon fosfat salin
- Ser fetal bovin
- Mediu complet de crestere specific celulelor utilizate;
- Linii celulare standardizate sau culturi primare.

Echipament:

- Citometru in flux BD FACSCanto II cu interfata DIVA soft pentru achizitia si prelucrarea primara a datelor experimentale sub forma de reprezentari „dot-plot” si histograme.

Mod de lucru:

- După marcare cu CFSE 1 μ M (incubare 15 min. la 37°C, spălare cu mediu bogat în proteine pentru îndepărtarea colorantului din mediul extracelular), celulele se cultivă în prezența substanțelor de testat (24, 36, 48 h. – conform protocolului specific).
- La finalul cultivării se analizează prin citometrie în flux încorporarea colorantului fluorescent în generațiile succesive de celule.

Intensitatea de fluorescență a CFSE se achiziționează sub forma semnalelor emise de fotomultiplicatorii de tip fluorescență verde FITC – A, generația 0 având intensitate maximă de fluorescență.

Analiza raspunsului fluorescent pentru fiecare populatie celulara se face pe baza reprezentarilor de tip „punct cu punct” si a histogramelor in coordonate FITC (corespunzatoare emisiei CFSE) cu softul specific FCS Express – modulul de proliferare, conform modelului:

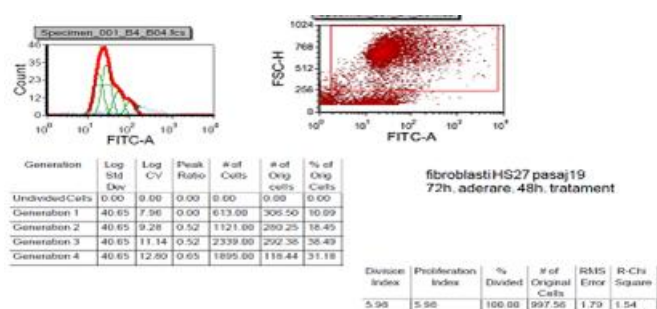


Fig.2: Reprezentarea succesiunii generatiilor proliferative prin marcare CFSE si analiza de citometrie in flux

b) Analiza secventialitatii ciclului celular se face conform urmatorului protocol:

Principiul metodei: dizolvarea membranei celulare cu un detergent neionic, eliminarea citoscheletului si a proteinelor nucleare cu tripsina, digestia enzimatica a ARN celular si stabilizarea cromatinei nucleare cu spermina. Iodura de propidiu (PI) este legata stoichiometric la ADN purificat, care este apoi analizat cu ajutorul citometriei in flux. Nucleii marcati cu PI emit fluorescent la lungimi de unda intre 580 si 650 nm.

Reactivi: kit Cycle TEST PLUS DNA Reagent (BD PHARMINGEN)

- Solutia A: - tripsina in tampon cu detergent si spermina.(HCl)₄ pentru dezagregarea enzimatica a fragmentelor solide de tesut si digestia membranelor celulare si citoscheletului.
- Solutia B: -inhibitor de tripsina si ribonucleaza A in tampon citrat stabilizant cu spermina. (HCl)₄ pentru a inhiba activitatea tripsinei si pentru a digera ARN.
- Solutia C: - iodura de propidiu (PI) si spermina (HCl)₄ in tampon citrat stabilizant. PI se leaga stoechiometric la ADN la o concentratie finala de cel putin 125 µg/mL.
- Solutie tampon: contine citrat de sodiu, sucroza si DMSO pentru colectarea si/sau congelarea suspensiilor celulare.

Mod de lucru

- Se spala suspensia de celule (centrifugare la 400xg 5 min la temperatura camerei);
- Se adauga 250 µL Solutie A la fiecare tub si se agita usor manual; se incubeaza 10 min;
- Se adauga 200 µL Solutie B la fiecare tub si se agita usor manual; se incubeaza 10 min
- Se adauga 200 µL Solutie C (racita pe gheata) la fiecare tub si se agita usor manual. Se incubeaza 10 min la intuneric pe gheata. Se analizeaza intr-un interval de 3 ore dupa marcare pe BD FACSCanto II.

Rezultatele de analiza a secventialitatii ciclului celular se obtin tot prin prelucrari cu softul FCS Express – modulul DNA cell cycle, imaginile de mai jos reprezentand un model in acest sens:

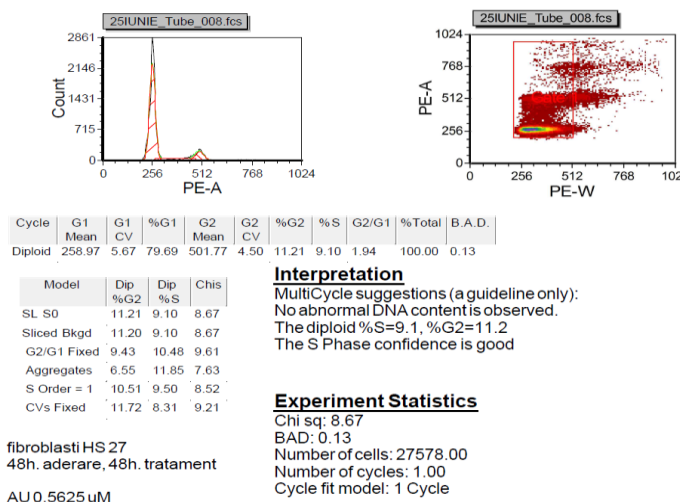


Fig.3: Reprezentarea secventialitatii ciclului celular si analiza de citometrie in flux

CAPITOLUL III: STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND EFECTUL EXTRACTULUI BIOACTIV DE STRUGURI (TES) ASOCIAT CU EXTRACTUL DE TRIFOI ROSU (ET)

Studiile experimentale din aceasta etapa reprezinta o continuare a experimentarilor din prima perioada de derulare a proiectului, in sensul evidentierii aspectelor fiziologice si patologice (melanoma) caracteristice tesutului cutanat si completarii screeningului anterior cu mecanisme relevante. Astfel, rezultatele intermediare anterioare au vizat limitele citotoxice la nivel de fibroblast dermic pentru combinatiile TES /ET, evidentierea efectului concertat de regenerare epidermala a complexului TES, supraexpresia integrinei $\alpha 1$ cu semnificatii in legaturi fibroblast – collagen si fibroblast – laminina, indusa in special de catre TES si toate variantele de combinatii ET/TES testate si vor fi completate cu explorari functionale la nivel de melanom (linia celulara B16-F10) si completari aduse in mecanisme fiziologice conexe proliferarii tesutului cutanat (sinteza de collagen, metaloproteinaze extracelulare).

Vor continua cercetarile pentru evidentierea efectelor extractului de tescovina (TES) si al extractului de trifoi rosu (ET) conditionat in propilen glicol, standardizat in fitoestrogeni de tipul daidzeina, genisteina, biochanina, formononetin, atat individual cat si asociate in patru variante cu proportii bine definite. Experimentarile sunt focusate asupra procesului de remodelare tisulara, prin evaluarea sintezei de collagen si activitatii matrix proteinazelor la nivelul fibroblastului uman dermic, dar si pe un screening celular al liniei standardizate de melanom murinic B16-F10, pentru a evidenta profilul citotoxic corelat cu efectele antiproliferative si pro-apoptotice.

Linii celulare standardizate utilizate in cadrul modelelor experimentale in vitro:

Fibroblast (linia celulara normala HS27) - capacitate proliferativa mare, culturile ajung la confluenta in aproximativ 7 zile. In monocultura, fibroblastele se aliniaza si formeaza clustere paralele. La microscopul optic, celulele au un aspect elongat, fusiform, cu unul sau doi nuclei eliptici proeminenti si cu un reticul endoplasmatic rugos bine dezvoltat. Functia principala a fibroblastelor este mentinerea integritatii structurale a tesutului conjunctiv prin sinteza componentelor matricei extracelulare si, in special, al collagenul de tip I, care este sintetizat in reticulul endoplasmatic rugos, in apropierea nucleului. Prin cultivarea fibroblastilor pana la densitati celulare foarte mari $>15 \times 10^4$ celule/cm² s-a observat stratificarea lor si transformarea in fibrocite, celule cu dimensiuni mai mici care nu se mai divid. Celulele HS27 au fost cultivate in mediu DMEM ce contine 10% SFB, 1% Antibiotic/antimicotic.

Celulele B16-F10 (melanom murinic) - Melanomul B16 este una dintre puținele linii melanom pigmentate disponibile pentru utilizare la șoareci, deși au fost dezvoltate recent modele transgenice în care incidența fiabilă a melanomului permite stabilirea de noi linii. A fost utilizată cu succes pentru a studia mecanismele tumorilor cutanate relevante pentru om, datorită relevanței sale și previzibilității bune. Celulele au fost cultivate în mediu de cultura DMEM cu 10% ser fetal bovin, 1% soluție antibiotic / antimicotic, în condiții standard (37°C, 95% aer umidificat și 5% CO₂) 24 de ore înainte de tratament si 48 de ore cu substanțe testate.

Prepararea probelor:

Extract de tescovina (TES): Se prepara o solutie stock de 100 mg/ml prin sonicare la treapta 5, 10 minute la temperatura camerei. Se centrifugheaza apoi 20 minute la 3500rpm. Supernatantul se testeaza in modelele experimentale descrise la Capitolul II.

Extract de trifoi rosu (ET), conditionat in Propilen glicol, standardizat in fitoestrogeni, cu urmatorul continut de principii active: Daidzeina = 0.8 mg/ml; Genisteina = 1.1 mg/ml; Biochanina = 1.7 mg/ml

Cele doua extracte de testat s-au combinat in urmatoarele proportii:

Amestec a – TES:ET = 1:9;

Amestec b – TES:ET = 1:5;

Amestec c – TES:ET = 1:3;

Amestec d – TES:ET = 2:10.

Experimentele s-au realizat in triplicate, datele prezentate fiind media valorilor obtinute in cele 3 serii experimentale successive.

III.1 Evidentierea procesului de refacere dermica prin determinarea collagenului intracelular/ biosintetizat si evaluarea activitatii metaloproteinazelor matriceale – linia celulara HS27 (fibroblast uman dermic)

Marcarea celulelor s-a facut conform protocolului de lucru descris in Capitolul II.

Vizualizarea collagenului total intracelular prin marcare cu kit Sirius Red/ Fast Green, s-a realizat la microscopul optic inversat, cu obiectiv 10x.

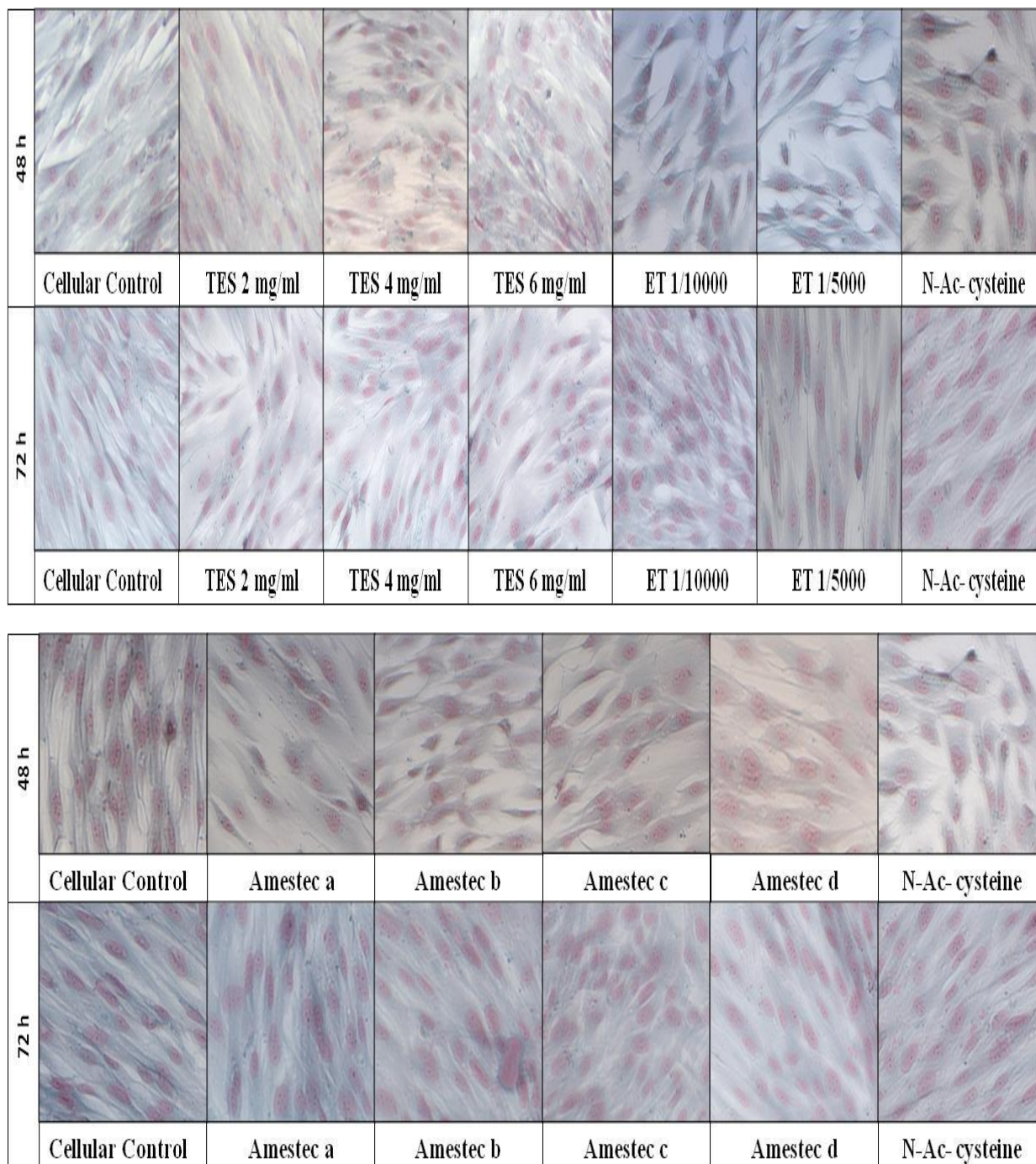


Fig.4: Formarea fibrelor de collagen si a proteinelor intracelulare: In imaginile captate pentru fiecare proba marcata cu kit Sirius Red/ Fast Green se poate observa collagenul total colorat cu roz, iar proteinele totale cu verde.

Pentru cuantificarea collagenului total, colorantul reactionat cu collagenul a fost eluat cu 1 ml NaOH 0.1N, iar absorbantele solutiei obtinute au fost citite la spectrofotometru la lungimile de unda de 540 nm (colagen/Sirius Red) si la 605 nm (proteina non-colagenoasa/Fast Green). Aceasta din urma a fost utilizata pentru normalizarea valorilor collagenului, pentru a tine cont de potentialele variatii in numarul de celule cauzate de diferitele tratamente.

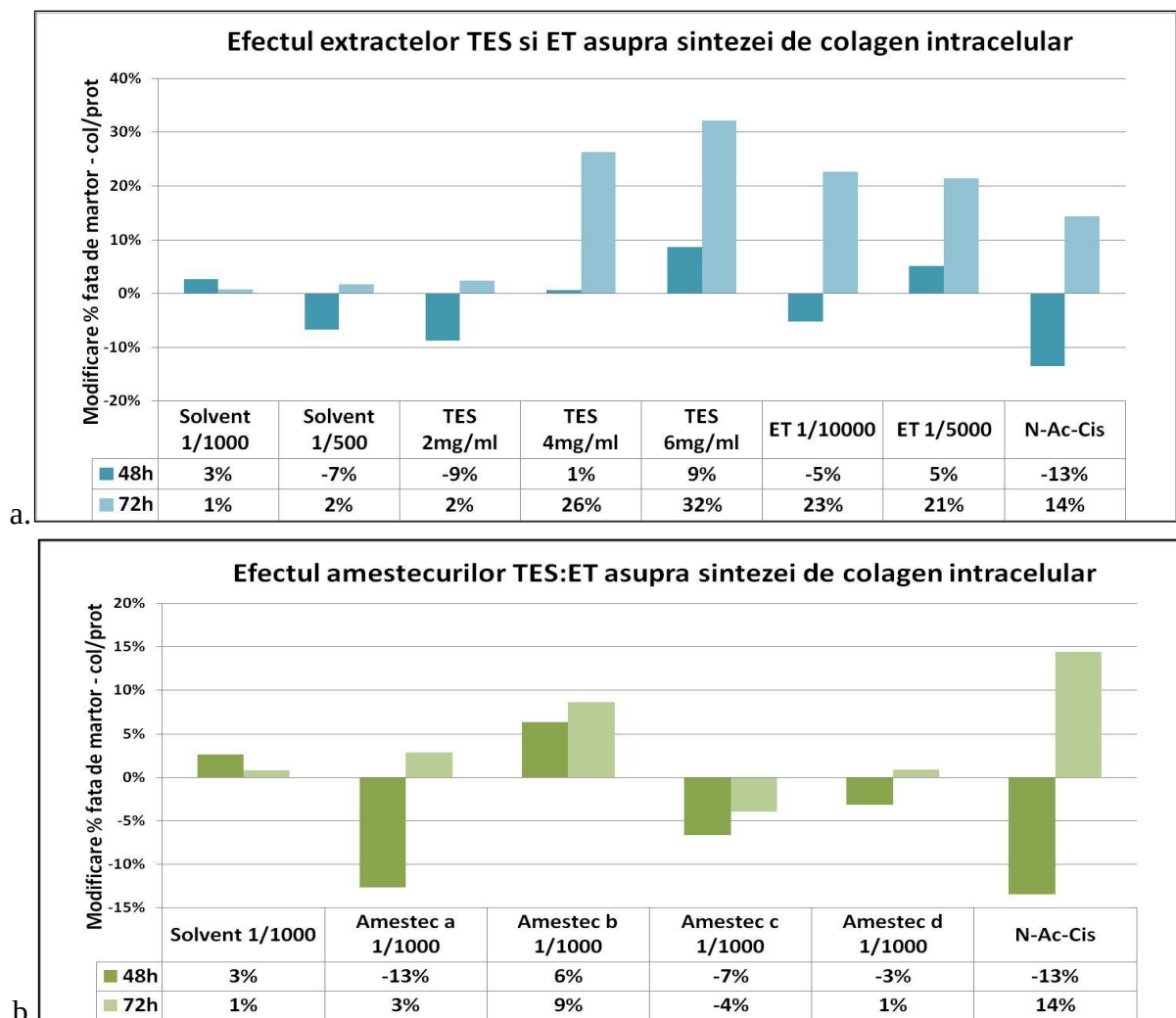


Fig. 5: Evaluarea nivelului de collagen biosintetizat de fibroblasti. Rezultatele reprezentate grafic reprezinta modificarea procentuala a raportului collagen total/proteina totala fata de matorul corespunzator, dupa 48h, respectiv 72h tratament.

Din analiza datelor experimentale, se observa modificari semnificative ale biosintezei de collagen dupa 72h de tratament, iar dintre compusii studiati se remarca extractul TES testat ca atare, care stimuleaza o crestere cu 32% a cantitatii de collagen intracelular la cea mai mare doza aplicata (6 mg/ml), in timp ce extractul ET prezinta o crestere de doar 23% la o concentratie de 1/10000 (0.01%) in mediu de cultura (fig. 3 - a). In cazul fibroblastilor tratati cu amestecul dintre cele doua extracte, doar Amestecul b stimuleaza cresterea cantitatii de collagen cu 9% dupa 72h incubare (fig. 3 - b).

Mediul de crestere colectat, a fost migrat electroforetic in gel de poliacrilamida copolimerizat cu gelatina, pentru a evidientia efectul extractelor testate individual sau asociate, asupra activitatii enzimelor matriceale (MMP-9 si MMP-2). Dupa etapele de incubare, colorare si decolorare pe suprafata gelurilor, se evidientiaza benzi de liza incolore pe fundal albastru care au fost cuantificate cu softul ImageLab. Rezultatele sunt prezentate in Fig. 6.

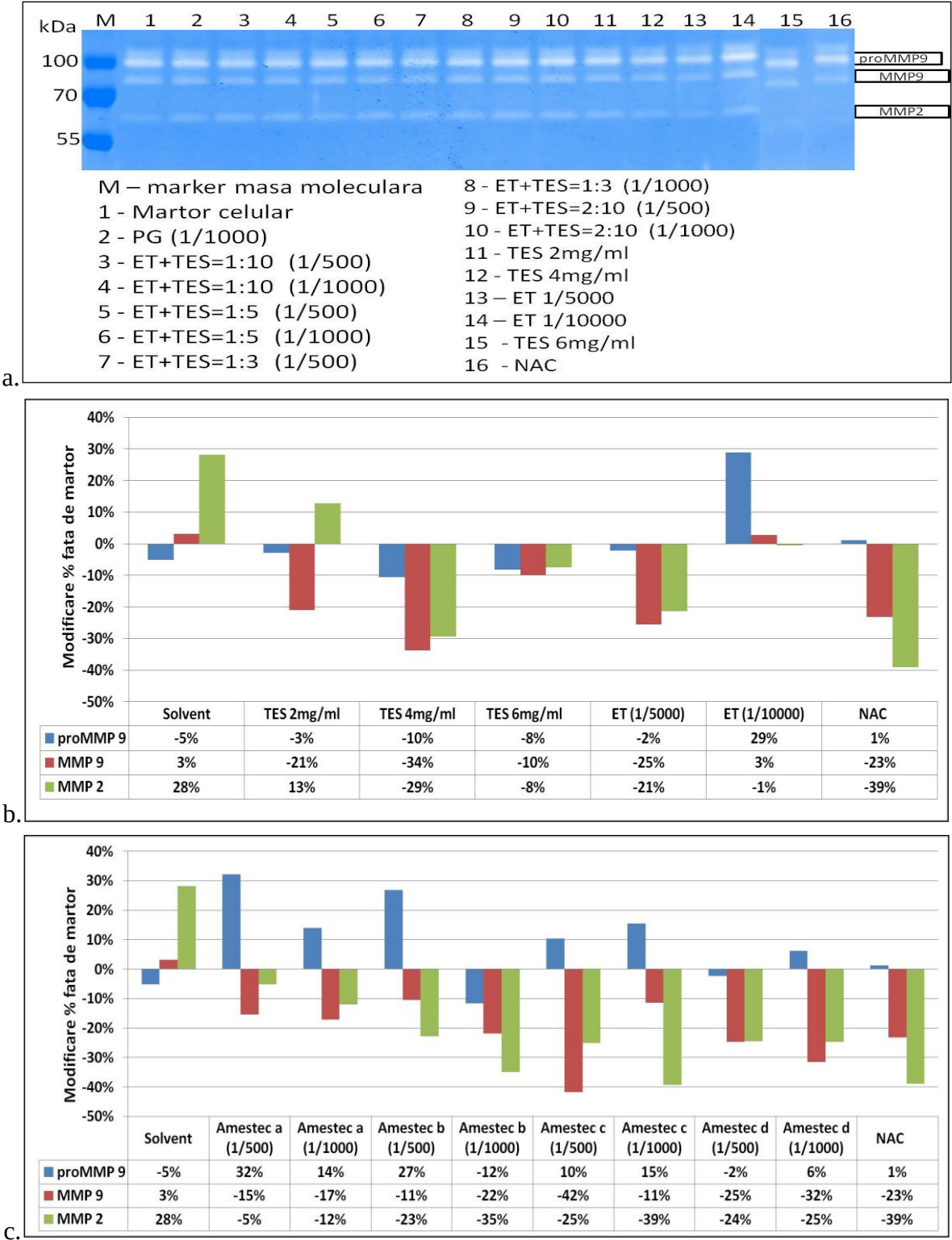


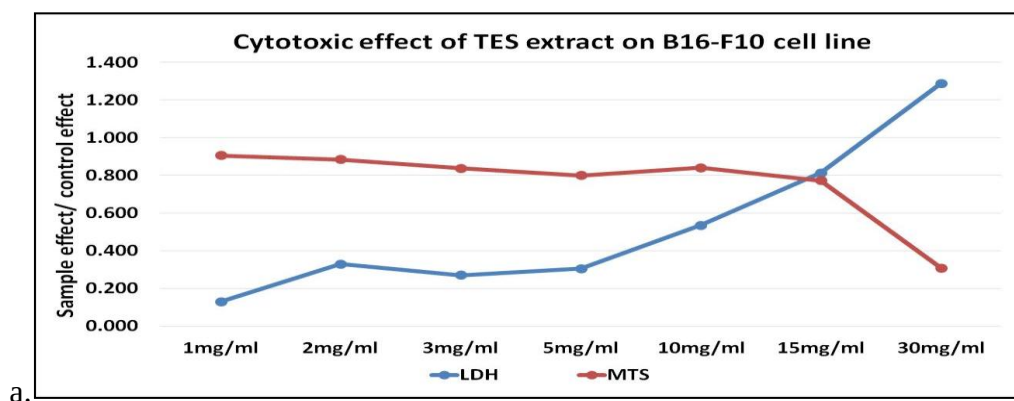
Fig. 6: Evaluarea activitatii enzimatice a MMP 9 si MMP 2 secretate de fibroblasti in mediul de crestere prin gelatin zimografie.

Dupa 48h de tratament, cele doua extracte testate individual, inhiba activitatea MMP-9 si 2 astfel: TES (4mg/ml) scade activitatea enzimatice cu 34%(MMP-9), respectiv 29% (MMP-2) iar ET(1/5000) cu 25% (MMP-9) si 21% (MMP-2). In cazul probelor testate cu amestecuri ale celor doua extracte, toate Amestecurile prezinta activitate inhibitorie asupra enzimelor proteolitice. Cele doua extracte testate TES si ET, si Amestecurile lor, induc asupra fibroblastilor testati in conditii normale de crestere, atat biosinteza colagenului cat si scaderea activitatii enzimelor proteolitice, ajutand astfel la remodelarea matriceala corecta a zonei afectate.

III.2 Evaluare impact citotoxic asupra liniei celulare B16-F10 (melanom murinic)

Pentru evaluarea citotoxicitatii probelor luate in studiu celulele au fost expuse la concentratii crescatoare ale produsilor de testat, pe o anumita perioada de timp, in functie de caracteristicile metabolice celulare. Au fost utilizate kit-urile CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) pentru determinarea activitatii metabolice (tehnica MTS) si CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay de la Promega pentru eliberarea lactat dehidrogenazei (LDH) in mediul extracelular.

Celulele au fost lasate la aderat 24h (7000 celule/godeu) si tratate timp de 24h cu substanta de testat, conform protocolului de lucru pentru trusa de reactivi specifici (MTS/LDH). Toate concentratiile de principiu active au fost testate in triplicat. Din valoarea medie a absorbantelor inregistrate pentru fiecare triplicat este scazuta media absorbantei blank-ului (mediu de cultura simplu, fara celule), ca ulterior valorile obtinute sa fie raportate la controlul celular (celule netratate cu substanta de interes) prelucrat in mod similar probelor, obtinandu-se astfel efectul compusului de testat asupra viabilitatii celulare (rezultatele testului MTS) si respectiv, citotoxicitatea acestuia (rezultatele testului LDH) in functie de concentratiile folosite.



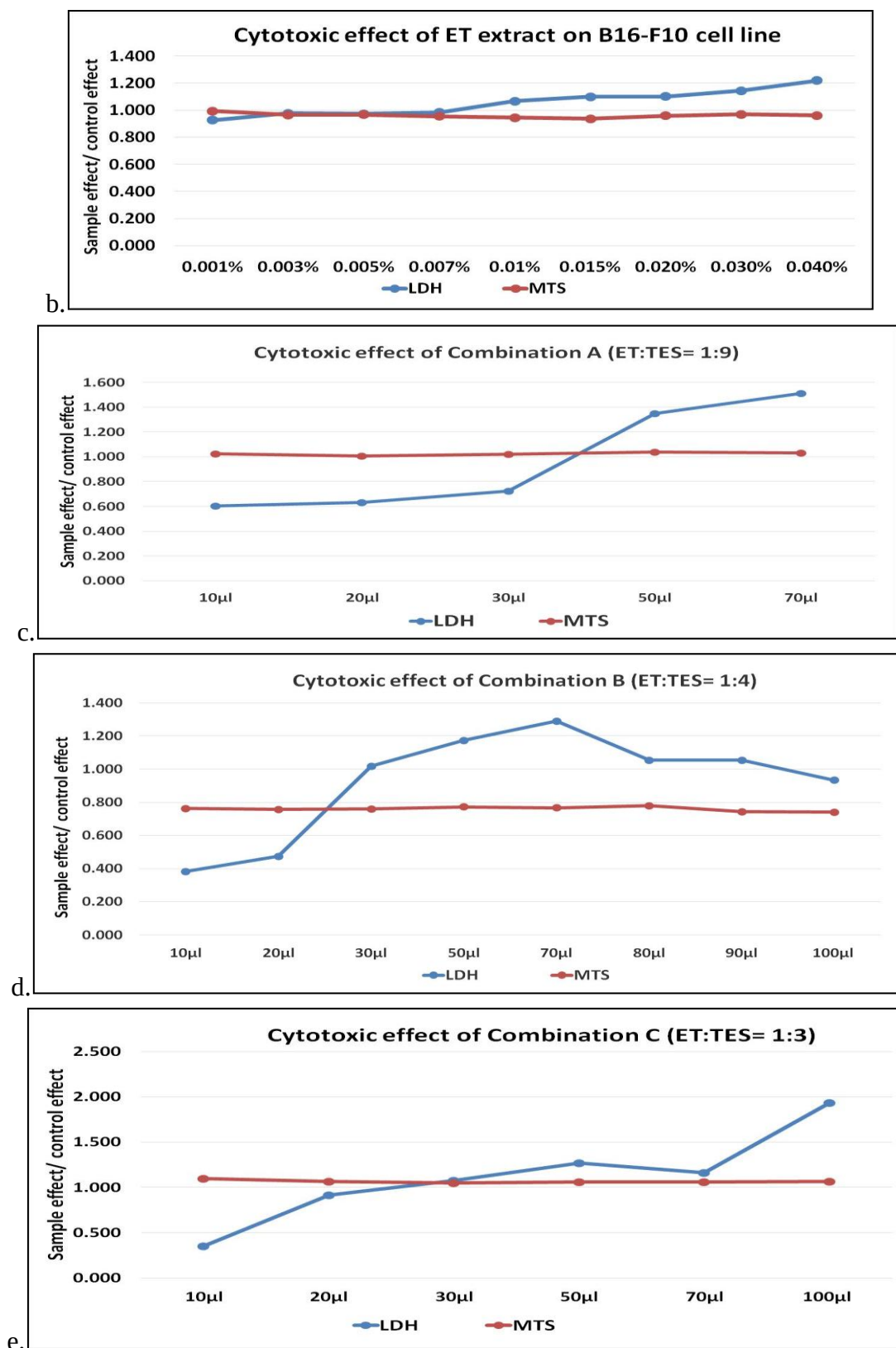


Fig. 7: Evaluarea potențialului citotoxic al TES (a.), ET (b), Amestecurile a (c.), b (d.) și c (e.) prin analiza MTS și LDH pe linia celulară de melanom B16-F10 .

Conform rezultatelor prezentate în fig.5, extractul TES prezintă un prag de citotoxicitate la o doză de 15 mg / ml, doza la care cantitatea de lactate-dehidrogenază

eliberată în mediu crește, ca indicator al permeabilizării membranei celulare, iar MTS scade indicând o activitate metabolică redusă. Complexul ET prezintă un efect citotoxic care începe la o concentrație de 0,001%. Peste această concentrație, există un raport superior ($\text{proba/control} > 1$) al activității metabolice evaluate prin tehnica MTS raportată, sugerând o activare a metabolismului celular indus de componentele extractului. În cazul celulelor tratate cu Amestecul a, pragul de citotoxicitate este de 20 $\mu\text{l/ml}$ mediu de cultură, în timp ce Amestecurile b și c prezintă un efect citotoxic începând cu doză de 20 $\mu\text{l/ml}$.

III.3 Modularea statusului proliferativ si inducerea apoptozei in celule de melanom murin

Fenomenul apoptotic joaca un rol important in preventia progresiei melanomice, precum si in directionarea responsivitatii la tratament in cadrul schemelor terapeutice pentru patologia metastatica. Un parcurs apoptotic incomplet poate conduce la selectionarea unor populatii celulare rezistente la stress, cu recurenta tumorală, rezistenta crescuta la apoptoza fiind o trasatura de baza a cancerului. In cadrul acestui studiu, s-a evaluat impactul celular al compusilor TES, ET si al combinatiilor acestora in procesul apoptotic tarziu si timpuriu al celulelor de melanom murin din linia celulara B16-F10. Metodologia de investigare a fost cea descrisa in capitolul II, dubla marcare cu anexina si iodura de propidiu si analiza prin citometrie in flux. Celulele au fost lasate sa adere 24h, apoi tratate 48h. cu TES, ET si combinatiile prezentate anterior (TES+ET). Martorul pozitiv testat a fost Metrotrexat 3 μ M, un agent antiproliferativ in cancer si maladii imunologice. Rezultatele sunt prezentate in tabelul de mai jos, raspunsul celular eficace fiind marcat cu verde.

	Celule vii (%Parent)	Apoptoza timpurie (%Parent)	Apoptoza tarzie (%Parent)	Necroza (%Parent)	% Apoptoza totala	% variatie apoptoza
Martor celular	79,1	8,8	10,8	1,3	19,6	100
Martor de solvent	78,6	7,4	12,4	1,7	19,8	100
ET 0.02%	67,8	12,4	17	2,8	29,4	148,48
ET 0.01%	67,9	15,4	14,8	1,9	30,2	152,53
ET 0.006%	69,8	10,6	17,4	2,2	28	141,41
TES 2mg/ml	75,2	7,2	14,7	2,9	21,9	111,73
TES 4mg/ml	66,8	16,7	15,4	1,1	32,1	163,78
TES 8mg/ml	67,3	16,9	14,1	1,7	31	158,16
Combinatie A 0.2%	69,5	14,4	14,3	1,8	28,7	146,43
Combinatie A 0.1%	69,2	15,6	13,7	1,4	29,3	149,49
Combinatie B 0.2%	73,9	12,9	11,8	1,5	24,7	126,02
Combinatie B 0.1%	71,3	13,8	13,8	1,1	27,6	140,82
Combinatie C 0.2%	70,2	14,1	13,8	1,9	27,9	142,35
Combinatie C 0.1%	67,3	18,9	12,6	1,2	31,5	160,71
Methotrexate 3μM	60,9	38,1	1	0	39,1	199,49

Tabel 1: Inducerea apoptozei in cellule de melanoma murin B16-F10 de catre TES si ET, singular si asociate

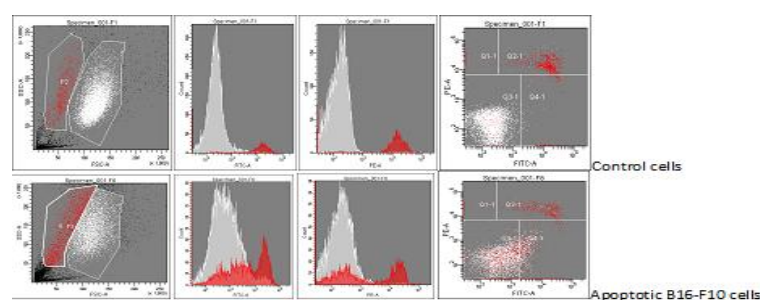


Fig. 8: Celule B16-F10 in apoptoza timpurie (FITC- pozitive) / tarzie (FITC si PE-pozitive) – detectie prin citometrie in flux

ET (0.02% - 0.006%) si TES (4-8mg/ml) induc apoptoza in celule de melanom murin, cu aproximativ 50% fata de celulele martor. Combinatiile celor 2 extracte, in special variant A si C actioneaza de asemenea ca inductor de apoptoza (40% - 60% fata de martor), fara a se remarca o potentare a eficacitatii prin asociere.

Status proliferativ (secventialitatea ciclului celular si succesiunea generatiilor proliferative) al melanomului murin – linia celulara B16 - F10.

Ciclul celular, ca eveniment al procesului proliferativ, parcurge o serie secventiala de evenimente biochimice convergente catre replicarea ADN si diviziunea celulara. Dupa finalizarea mitozei, celula intra in faza G1, iar replicarea ADN are loc in faza S; dupa duplicarea materialului genetic, celula intra in faza G2 care finalizeaza procesul de diviziune. In mitoza, celulele se divid in doua cellule fiice care pot reintra in faza G1 si initia un nou ciclu celular. Actiunea chemoterapeutica asupra celulelor de melanom se bazeaza in principal pe efecte anti-proliferative, exprimate de obicei de stoparea ciclului celular intr-una din fazele de multiplicare: S sau G2/M. Astfel, in cadrul acestui studiu, am evaluat efectul antiproliferativ prin suma % de celule aflate in fazele S si G2/M si respectiv prin indicele de proliferare (IP) estimat ca rezultat al succesiunii generatiilor proliferative.

Celulele de melanom murin B10-F16 au fost lasate sa adere 24h inainte de tratare cu extracte / combinatii de extracte. Dupa desprinderea cu tripsina au fost marcate pentru ciclu celular conform protocolului descris in capitolul II si analizate prin citometrie in flux. Pentru cuantificarea succesiunii generatiilor proliferative, celulele s-au marcat cu CFSE inainte de insamantarea placilor de cultura, apoi tratate si analizate dupa 48h incubare cu extracte / combinatii de extracte. Rezultatele sunt prezentate in tabelul 2:

% distributie in fazele ciclului celular	%G0/G1	%S	%G2/M	%S+%G2/M	% scadere S+G2/M	Indice proliferare (IP)	% scadere IP
Martor celular	69,58	23,23	7,18	30,41	0	3,23	0,00
Martor de solvent	68,63	26,9	4,48	31,38	0	3,49	0,00
ET 0.02%	73,54	21,89	4,57	26,46	15,68	2,62	24,93
ET 0.01%	76,98	20,45	2,57	23,02	26,64	2,26	35,24
ET 0.006%	77,19	20,07	2,74	22,81	27,31	1,75	49,86
TES 2mg/ml	69,59	24,01	6,04	30,05	1,18	3,03	6,19
TES 4mg/ml	73,11	25,9	0,99	26,89	11,58	2,57	20,43
TES 8mg/ml	73,87	20,03	6,1	26,13	14,07	2,18	32,51
Combinatie A 0.2%	75,27	17,74	7	24,74	18,65	1,89	41,49
Combinatie A 0.1%	77,13	18,43	4,4	22,83	24,93	2,47	23,53
Combinatie B 0.2%	75,71	18,81	5,48	24,29	20,12	1,96	39,32
Combinatie B 0.1%	78,7	17,61	3,69	21,3	29,96	1,71	47,06
Combinatie C 0.2%	74,37	19,47	6,16	25,63	15,72	1,77	45,20
Combinatie C 0.1%	73,96	17,12	8,92	26,04	14,37	1,86	42,41
Methotrexate 3µM	77,31	21,09	1,61	22,7	25,35	1,3	59,75

Tabel 2: Status proliferativ al celulelor de melanoma B16-F10, modulat de catre TES si ET, singular si asociate.

Ambele extracte, **ET (0.02% - 0.006%)** si **TES (4-8 mg/ml)** scad indicele de proliferare al melanomului murin si procentul de cellule in faza S a ciclului celular (replicare ADN), ET fiind mai activ decat TES. Ambele metode complementare utilizate in aceste experimentari descriu acelasi efect: normalizarea statusului proliferative, amplificat anterior prin procesul de malignizare. Sunt incetinite doua faze mitotic esentiale, S si G2/M, ceea ce genereaza mai putine generatii celulare proliferative. Combinatiile TES+ET conserva actiunea antiproliferativa a componentelor individuale, cu mentiune speciala pentru combinatia B (TES:ET = 1:5).

CONCLUZII

Actiunea antioxidanta a extractului TES demonstrata anterior este completata prin rezultatele cercetarilor noastre de modularea unor procese moleculare si celulare importante in refacerea dermica a tesutului cutanat lezat: supra-expresia proteinelor membranare – marker de diferentiere keratinocitara, amplificare turn-over keratinocit si fibroblast.

Acestea sunt sustinute si de efecte marcante ale TES, singular sau asociat cu extractul de trifoi rosu (ET) asupra sintezei de collagen dermic si a inhibitei MMP2 si MMP9, metaloproteinaze responsabile de degradarea proteinelor extracelulare (colagen de diferite tipuri, elastina, laminina, fibronectina), sugerand refacerea sau dupa caz conservarea matricei dermice.

La nivel de celula epiteliala transformata, extractul de struguri si cel de trifoi rosu sunt inductori de apoptoza si agenti anti-proliferativi in celule de melanom murin. De asemenea, combinatiile lor inhiba progresia melanomului. Actiunea concertata asupra apoptozei si a inhibarii proliferarii / stoparea fazelor de diviziune ale ciclului celular este sustinuta de complexitatea principiilor active (izoflavone din ET, antociani in TES, etc) din ambele complexe vegetale.

Avand in vedere actiunile demonstrate in cercetarile anterioare (ET- modulare estrogenica, TES – antioxidant si anti-inflamator), combinatia lor poate constitui o solutie adjuvanta in terapia melanomului, sporind eficacitatea anti-tumorală, cu prezervarea si regenerarea dermului sanatos adiacent.

Cercetarile prezentate in acest raport reprezinta inca o etapa in sustinerea valorificarii adecvate a deseurilor vegetale in general si in particular a celor de vinificatie, urmand a fi completate in ultima etapa a proiectului de explorarea unor factori de metastazare tumorală (ex. VEGF), a unor conditii particulare de stimulare celulara (radiatia UV) si a unor proteine cheie din patologia melanomului (exces melaninic / tirozinaza / melanogeneza).

Rezultatele obtinute pana in prezent au fost diseminate dupa cum urmeaza:

- Brandusa G. Dumitriu , Diana M. Ene , Laura Olariu , Natalia Rosoiu, Luiza M. Crăciun, Abdi ADIL, Gina Manda, Toma Papacoea, **Grape pomace and red clover extracts modulate the proliferative response of murine melanoma cells**, prezentare la CONFERINȚA ȘTIINȚIFICĂ DE TOAMNĂ a AOSR, Cercetarea științifică în serviciul dezvoltării durabile, 21-22 septembrie 2018, Târgoviște
- Luiza M. Crăciun, Brandusa G. Dumitriu, Laura Olariu, Stefana Jurcoane, Stelica Cristea , Abdi ADIL, Natalia rosoiu, Raluca Papacoea, **Regenerative and scare healing potential of active compounds from *Camelina sativa* oil and grape pomace, proved by cellular specific mechanisms**, trimisa spre publicare la Romanian Biotechnology Letters / factor de impact ISI