

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

**DEZVOLTARE LA NIVEL DE LABORATOR A UNUI PRODUS
REGENERATOR DERMO-EPIDERMIC, PRIN VALORIFICAREA
UNEI ASOCIERI INOVATIVE INTRE COMPLEXE ACTIVE DIN
DESEURI SI EXTRACTE VEGETALE**

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



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

RAPORT FINAL

noiembrie 2019

Drd. Adil Abdi 

REZUMATUL PROIECTULUI

Proiectul stiintific **„Dezvoltare la nivel de laborator a unui produs regenerador dermo-epidermic, prin valorificarea unei asocieri inovative intre complexe active din deseuri si extracte vegetale”** este o continuare a proiectului: **„Valorificarea reziduurilor din vinificatie ca aditivi alimentari si antioxidanti in industrie”**, cu scopul de a concretiza cercetarile efectuate in studii aplicative si tehnologice. Se vizeaza dezvoltarea la nivel de laborator a unui produs / produse originale de uz topic, cu adresabilitate in regenerarea pielii. Activitatile ce converg la realizarea acestui obiectiv se refera la selectia componentelor vegetale in concordanta cu sinergismul si complementaritatea actiunii biologice fata de extractul din reziduuri de vinificatie, caracterizarea analitica a compusilor activi, conditionarea unor variante de gel/ crema/ unguent si alegerea tipului de formulare optim, evaluarea compatibilitatii cu pielea umana si a efectului de produs. Realizarea acestui proiect deschide perspectiva concreta a transferului de cunostinte si tehnologie catre un nivel superior de maturitate si de exploatare, cu valorificarea deseurilor de planta si in mod special a celor rezultate din procesul de vinificatie in produs de uz topic eficient in perturbari ale statusului pielii cu larga incidenta (imbatranire, vindecare rani, etc). Proiectul are, de asemenea, in vedere diseminarea rezultatelor la nivel national si international prin comunicari si publicatii stiintifice.

ETAPA II. Studiu de formulare pentru realizarea unui produs de uz topic la nivel de laborator.

CAPITOLUL I: SELECTIE VARIANTE DE CONDITIONARE COMPATIBILE CU TRATAMENTUL DISFUNCTIILOR CUTANATE

CAPITOLUL I: EXTRACTE VEGETALE CU POTENTIAL ANTIOXIDANT; COMPLEMENTARITATE STRUCTURA – ACTIVITATE BIOLOGICA PENTRU COMPUSI NATURALI CU APLICATII TERAPEUTICE LA NIVEL CUTANAT

In cadrul acestui capitol ne propunem realizarea unor experimentari confirmatorii privind sinergismul si complementaritatea extractelor vegetale. Testele anterioare de citocompatibilitate, efect antioxidant multivalent si de stimulare a turn-over-ului celular vor fi completate cu elemente de inducere a regenerarii cutanate prin stimularea sintezei de colagen si modularea metaloproteinazelor - enzime degradative ale proteinelor structurale.

a. Evaluarea efectului principiilor active asupra activitatii enzimaticice a metaloproteinazelor implicate in procesul de regenerare cutanata

Datorită spectrului larg de specificitate la substrat, MMP-urile contribuie la mentinerea homeostaziei multor țesuturi și participă la mai multe procese fiziologice, cum ar fi remodelare osoasa, angiogeneză, imunitate și vindecarea rănilor. Activitatea MMP este strict controlată la nivel de transcripție, activare pro-peptidică și inhibare, de către inhibitorii lor tisulari. Dereglarea activitatii MMP duce la afectiuni patologice, cum ar fi artrita, inflamație și cancer, subliniind astfel MMP-urile ca ținte terapeutice promițătoare. Activitatea catalitică a MMP-urilor este puternic controlata la patru niveluri diferite: 1) expresia genelor cu regulare transcripțională și post-transcripțională; 2) localizarea extracelulara și tipul de țesut sau celulă cu eliberare de MMP; 3) activarea pro-enzimelor prin eliminarea pro-domeniului; și 4) inhibarea de către inhibitori specifici (inhibitori tisulari ai metaloproteinazelor matriceale (TIMPs)) și de către inhibitori nespecifici ai proteinazelor. Odată active, MMP-urile pot modula potențialul proteolitic global, în mediul extracelular prin zymogen (pro-forma MMP) activarea și degradarea inhibitorului sau inactivarea altor proteaze.

MMP-2 (gelatinaza A) și MMP-9 (gelatinaza B) sunt responsabile în principal pentru degradarea colagenului denaturat și a gelatinei. De asemenea, pot actiona asupra unor componente ale ECM, inclusiv mai multe tipuri de colagen (I, IV, V, VII, IX, și X), elastină, laminină, aggrecan, fibronectină, vitronectină și mai multe molecule non-ECM, inclusiv pro-TNF, TGF-β, pro-IL-1β și pro-IL-8. De asemenea, acestea sunt angajate în prelucrarea diverșilor factori pro și antiangiogeni în timpul vindecării rănilor, în special în primele etape ale acestui proces. Ambele gelatinaze sunt sintetizate constitutiv de multe celule, incluzând fibroblasti, keratinocite, celule endoteliale, leucocite polimorfonucleare și monocite. Expresia crescută a MMP-2 poate fi detectată în țesutul conjunctiv, fibroblasti și endoteliu la marginea

rănilor acute în toate etapele procesului de vindecare. MMP-2 induce migrația celulelor epiteliale prin clivarea specifică a lamininei -5, o componentă a membranei bazale epiteliale. MMP-9 contribuie la vindecarea rănilor prin inițierea migrației keratinocitelor și mobilizarea celulelor progenitoare endoteliale din măduva osoasă [Grzela et al.,2016].

Metoda de estimare a concentrației de gelatinaze (MMP2 și MMP9) din mediul condiționat ce se bazează pe capacitatea acestor enzime de a se renatura după migrarea electroforetică în geluri de poliacrilamida-SDS copolimerizate cu gelatina și îndepărtarea SDS-ului prin spălări repetate cu Triton X-100, enzimele exercitându-și astfel activitatea proteolitică asupra substratului copolimerizat pe parcursul a 18 h de incubare la 37°C într-un tampon de dezvoltare.

Extractele vegetale, TES (tescovina din struguri), Gb (extract de galbenele) și Cs (extract de castan), au fost asociate în diferite proporții (v/v) – vezi **tabel 1**:

Tabel 1. Asocierea biocompusilor active TES, Gb și Cs

	A1	B1	C1	A2	B2	C2
TES	1	1	9	1	1	9
Gb	9	1	1			
Cs				9	1	1

Evaluarea activității metaloproteinazelor s-a realizat din mediu de creștere colectat în urma tratării keratinocitelor umane normale și fibroblastilor umani normali, cultivate astfel: aderare 24h, tratare 48h în condiții normale de dezvoltare în prezența și absența compusilor investigați, cât și în cadrul unui model de inflamație nespecifică indusă de tratarea cu LPS și PMA (24h pretratare cu extract + 24h stimulare).

a.1. Evaluarea activității MMP 2 și 9 secretate de keratinocite în mediul de cultura extracelular:

Zimogramele sunt scanate și analizate semi-cantitativ prin densitometria benzilor proteice cu activitate enzimatică ce apar ca plaje de liză, iar identificarea tipului de MMP se realizează pe baza maselor moleculare – vezi **figura 1**.

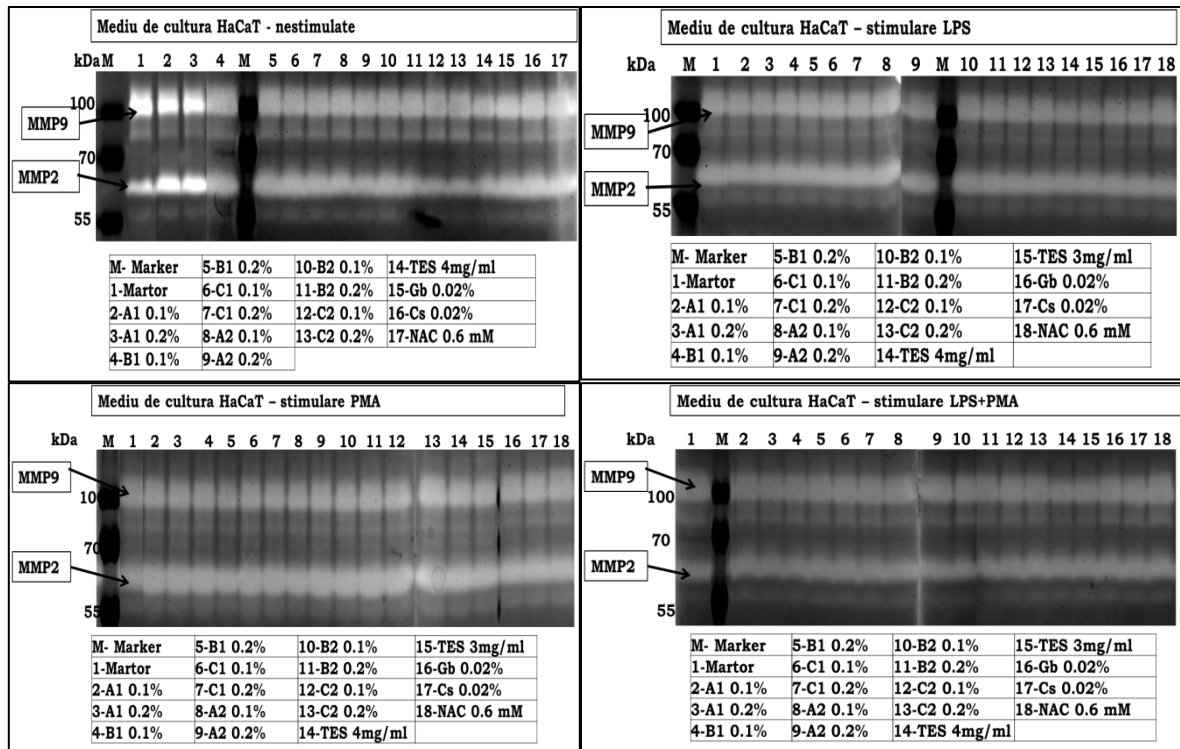


Figura 1. Expresia MMP2 si 9 evaluata prin gelatin-zimografie in prezenta biocomplexelor vegetale

Rezultatele sunt prezentate in **Tabelul 2**, ca procente de variatie a absorbantelor corespunzatoare activitatii enzimaticice a probelor tratate fata de martorul corespunzator.

Tabel 2. Variatia activitatii enzimaticice a MMP secretate de keratinocite tratate cu extractele de interes

Proba	MMP9				MMP2			
	ns	LPS	PMA	LPS+PMA	ns	LPS	PMA	LPS+PMA
Martor	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A1 0.1%	18%	-33%	-33%	9%	31%	-34%	22%	10%
A1 0.2%	26%	-3%	6%	-27%	6%	-5%	45%	10%
B1 0.1%	96%	-28%	-18%	-18%	25%	4%	31%	-26%
B1 0.2%	-27%	-36%	-53%	-2%	-2%	-8%	-26%	-3%
C1 0.1%	-3%	-30%	-27%	-13%	-26%	-1%	-20%	-6%
C1 0.2%	-15%	-31%	-24%	-4%	-8%	-6%	0%	-18%
A2 0.1%	4%	-20%	-36%	11%	13%	-9%	17%	14%
A2 0.2%	-21%	-24%	30%	29%	-23%	20%	67%	13%
B2 0.1%	-7%	-43%	-1%	-5%	-5%	2%	59%	-15%
B2 0.2%	-23%	-51%	-8%	-1%	-48%	-29%	14%	0%
C2 0.1%	-17%	-46%	25%	-25%	-27%	-32%	33%	-4%

C2 0.2%	-21%	-39%	-26%	-8%	-35%	-15%	-12%	-24%
TES 4mg/ml	9%	-58%	-9%	-38%	-29%	-41%	1%	-19%
TES 3mg/ml		-57%	-40%	-21%		-32%	-40%	-9%
Gb 0.02%	2%	-60%	-56%	-19%	-20%	-43%	-45%	-11%
Cs 0.02%	7%	-61%	-16%	-31%	-1%	-44%	-21%	-26%
NAC 0.6 mM	39%	-52%	-14%	-20%	9%	-51%	-5%	27%

Ca si in cazul celulelor epidermice tratate cu extractele bioactive singulare, activitatea enzimatica a MMP 9 si MMP 2 este inhibata in cazul keratinocitelor tratate cu amestecul de TES si Gb in raport de 1:1 - (B1) si 9:1 - (C1), in toate cele trei conditii de stimulare. De asemenea, acelasi efect inhibitor se remarca si in cazul keratinocitelor stimulate proinflamator si bacterian si tratate cu amestecul TES:Cs in raport 1:9 (C2). Rezultatele obtinute, confirma rolul protector al principiilor active testate singular sau asociate, impotriva degradarii proteinelor matricei extracelulare, contribuind la mentinerea integritatii tesutului cutanat, in conditiile unui raspuns inflamator asociat atacului bacterian.

a.2. Evaluarea activitatii MMP 2 si 9 secretate de fibroblasti dermici in mediul de cultura extracelular:

Zimogramele sunt scanate si analizate semi-cantitativ prin densitometria benzilor proteice cu activitate enzimatica ce apar ca plaje de liza, iar identificarea tipului de MMP se realizeaza pe baza maselor moleculare – vezi **figura 2**.

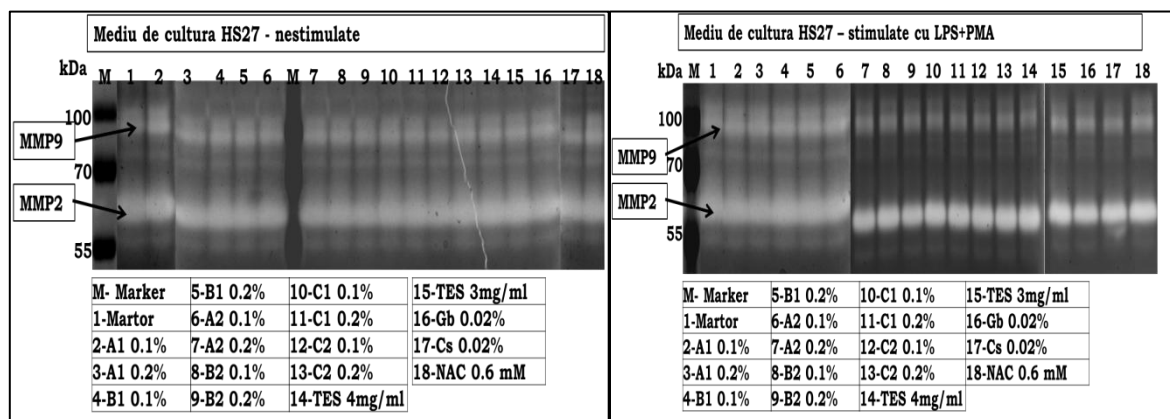


Figura 2. Expresia MMP 2 si 9 evaluata prin gelatin-zimografie in prezenta biocomplexelor vegetale

Rezultatele sunt prezentate in **Tabelul 3**, ca procente de variatie a absorbantelor corespunzatoare activitatii enzimatice a probelor tratate fata de martorul corespunzator.

Tabel 2. Variatia activitatii enzimatice a MMP secretate de fibroblasti tratati cu extractele de interes

Proba	MMP9		MMP2	
	ns	LPS+PMA	ns	LPS+PMA
Martor	NA	NA	NA	NA
A1 0.1%	9%	-19%	13%	-24%
A1 0.2%	-15%	-21%	-26%	-15%
B1 0.1%	-1%	-18%	-7%	45%
B1 0.2%	-8%	13%	-7%	3%
A2 0.1%	7%	-6%	-14%	4%
A2 0.2%	-8%	-8%	-29%	-21%
B2 0.1%	6%	-28%	-25%	-34%
B2 0.2%	-6%	-16%	-17%	-38%
C1 0.1%	29%	-25%	-8%	1%
C1 0.2%	7%	-17%	-21%	0%
C2 0.1%	33%	-2%	-10%	8%
C2 0.2%	27%	-1%	3%	-3%
TES 4mg/ml	-24%	-24%	-9%	-7%
TES 3mg/ml	29%	-24%	2%	-3%
Gb 0.02%	-10%	-7%	-23%	-9%
Cs 0.2%	26%	-13%	2%	-8%
NAC 0.6 mM	60%	14%	25%	12%

În urma evaluării activității enzimatice a metaloproteinazelor matriceale secretate în mediul de cultură extracelular de către fibroblaștii dermici în prezența extractelor bioactive, se remarcă următoarele:

- extractele **TES si Cs** acționează în condiții proinflamatoare preponderent asupra MMP 9 în sensul scăderii activității acestora

- Asocierea celor două extracte **TES si Cs în raport 1:1 – (B2)**, induce efect inhibitor pronunțat asupra celor două enzime matriceale implicate în degradarea componentelor structurale din derm;

- asocierea principiilor active din extractele **TES si Gb în raport 1:9 (A1)** generează la nivelul fibroblastilor stimulați proinflamator și bacterian o scădere a activității enzimatice a metaloproteinazelor matriceale.

b. Evaluarea *in vitro* a efectului de refacere tisulara prin dozarea colagenului intracelular la nivelul fibroblastilor dermici

Fibroblaștii (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 in conditii normale de dezvoltare in prezenta si absenta compusilor investigati, cat si in cadrul unui model de inflamatie nespecifica indusa de tratarea cu LPS si PMA (24h pretratare cu extract + 24h stimulare)..

Mod de lucru: celulele se spăla de doua ori cu PBS rece; urmează 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 fotografiază cu microscopul optic. Pentru cuantificarea colagenului total, colorantul reactionat cu colagenul 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 concentratiei de colagen, pentru a tine cont de potentialele variatii in numarul de celule cauzate de diferitele tratamente.

Rezultatele reprezentate grafic reprezinta modificarea procentuala a raportului colagen total/proteina totala fata de martorul corespunzator

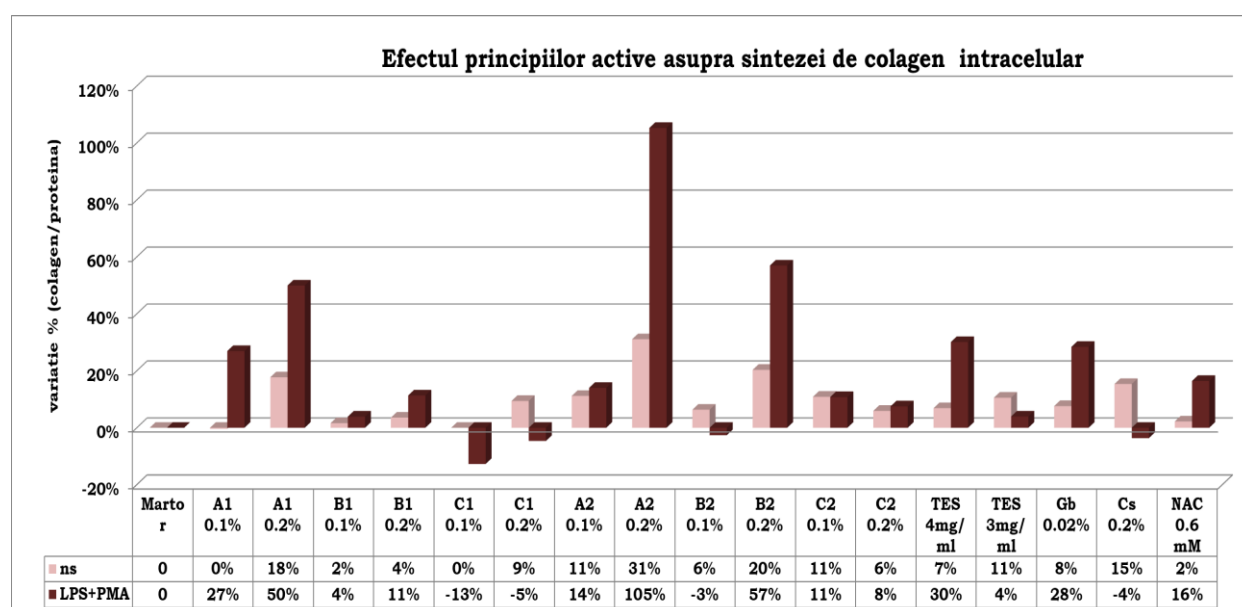


Figura 3. Evaluarea nivelului de colagen biosintetizat de fibroblasti.

Din analiza datelor experimentale se observa modificari semnificative ale biosintezei de colagen dupa 48h de tratament, iar dintre compusii studiati se remarca **extractele TES** si

Gb, care genereaza o crestere cu 30%, respectiv 28% a cantitatii de colagen intracelular in fibroblastii stimulati cu LPS si PMA. In cazul fibroblastilor tratati cu amestecul dintre cele doua extracte, **TES si Gb in raport 1:9 – A1**, se observa o crestere a cantitatii de colagen de pana la 50%. La nivelul fibroblastilor tratati cu extractele **TES si Cs asociate in raport 1:9 – A2, respectiv 1:1, se remarca o crestere considerabila a colagenului intracelular (105% - A2 si 57% - B2)**, demonstrand astfel rolul lor in mentinerea homeostaziei tesutului cutanat si in prevenirea proceselor degenerative.

Avand in vedere rezultatele anterioare privind actiunea antioxidanta a extractului din deseuri de struguri asociat cu extractele de galbenele si castan, precum si potentarea eficacitatii principiilor active complementare din cele trei extracte in regenerarea cutanata, se vor selecta variante de combinatii de principii active care sa reuneasca in mod optim ambele caracteristici:

- **C1_TES:Gb (9:1)** – stimuleaza protectia antioxidanta intrinseca si extrinseca prin activarea glutathionului intracelular si reducerea radicalilor liberi oxigenati;
- **B2_TES:Cs (1:1)** – activeaza intracelular enzimele de aparare antioxidanta, catalaza si superoxid-dismutaza, cu reducerea radicalilor liberi oxigenati.

