

PN-III-P2-2.1-BG-2016-0369

Transferul cunoașterii privind investigarea proprietăților antiinfecțioase și antitumorale ale unor noi formulări cosmetice și farmaceutice pe bază de extracte naturale
Raport științific de fază 2016

Introducere

Plantele au fost utilizate încă din cele mai vechi timpuri pentru tratarea sau prevenția diferitelor tipuri de afecțiuni, fiind folosite, conform datelor furnizate de Organizația Mondială a Sănătății de 65-80% din populația lumii (Marinaș, 2015). Cu toate acestea, studiul mecanismelor intime, la nivel molecular și celular, responsabile de multiplele efecte benefice ale plantelor medicinale, cu ajutorul metodelor avansate de cercetare actuală este absolut necesar pentru fundamentarea științifică a observațiilor empirice precedente, ceea ce va favoriza pe de parte creșterea nivelului de încredere a medicilor și populației în aceste remedii, iar pe de altă parte, va permite descoperirea de noi proprietăți și noi utilizări, compuși naturali cu acțiune terapeutică devenind materie primă sau modele structurale pentru industria farmaceutică modernă (Temelie, 2005).

În același timp, aproape jumătate din medicamentele folosite în prezent sunt agenți de semisinteză, având ca materii prime fitocomponente specifice, iar un sfert din ele conțin extracte sau compuși chimici activi din plante (Chopra și colab., 1997; Rios, 2005; Cowan, 1999).

Astfel, scopul proiectului este elaborarea unei metodologii inovative de testare a activității antiinfecțioase, antitumorale și imunomodulatoare, precum și de elucidare a mecanismelor de acțiune la nivel celular și molecular a unor extracte naturale vegetale și pe bază de propolis, în scopul introducerii acestora în noi formulări cosmetice și farmaceutice.

Punerea în practică a soluțiilor propuse este benefică pentru menținerea sănătății umane și optimizarea calității vieții prin reducerea administrării substanțelor de sinteză în tratamentul și/sau profilaxia infecțiilor și a afecțiunilor tumorale.

Beneficiile aduse de proiect sunt legate de posibilitatea de a introduce pe piață noi formulări antimicrobiene bazate pe compuși naturali, cu un spectru de activitate superior, cu risc scăzut de selectare a mecanismelor de rezistență; posibilitatea dezvoltării de noi tratamente antivirale eficiente, precum și dezvoltarea de produse naturale cu eficiență terapeutică sau

preventivă antitumorală. Introducerea de produse noi și competitive va facilita accesarea unei piețe noi, extinderea activității corelat cu crearea de noi locuri de muncă cu posibilitatea angajării de tineri absolvenți instruiți în cadrul proiectului.

Activități prevăzute pentru perioada raportată

Activitate 1.1. Obținerea extractelor vegetale și apicole

Hofigal detine un istoric propriu al cercetării, brevetat până la faza de materie primă activă, de origine vegetală, cu proprietăți antivirale (Brevet nr. 101730/1980; Brevet nr. A/00721/2010). Caracteristicile fizico-chimice ale extractelor de armurariu, cățina roșie, lemn dulce, propolis, rostopască, rozmarin sunt prezentate în Tabelele 1-6.

Tabelul 1. Caracterizarea fizico-chimică a extractului de armurariu

Caracteristici	Condiții de admisibilitate
Aspect	Lichid limpede
Culoare	Brun-roscat
Miros	caracteristic
Densitate relativă, d_{20}^{20}	0.880-0.930
Conținut în etanol, % m/m, min.	50.0
Metanol și 2-propanol: - metanol, % v/v, max. - 2-propanol, % v/v, max.	0.05 0.05
Reziduu prin uscare, %, min.	2.0
Conținut în silimarina, % min.	0.15
Contaminare microbiană: - Număr total de microorganisme aerobe (TAMC) UFC/mL - Număr total de levuri și fungi filamentosi (TYMC) UFC/mL - Bacterii Gram-negativă tolerante la sărurile biliare UFC/mL - <i>Escherichia coli</i> /mL - <i>Salmonella</i> sp. /25 mL	10 ⁴ 10 ² 10 ² absent absent

Tabelul 2. Caracterizarea fizico-chimică a extractului de cățină roșie

Caracteristici	Condiții de admisibilitate
Aspect	Lichid opalescent
Culoare	Brun-roscat
Miros	caracteristic
Densitate relativă, d_{20}^{20}	1.000-1.1500

Metanol si 2- propanol: - metanol, % v/v, max.	0.05
- 2-propanol, % v/v, max.	0.05
Reziduu prin uscare, %, min.	20.0
Continut in: - polifenoli exprimati in acid cafeic, % min.	10
- flavone exprimate in rutin, % min.	5.0
Contaminare microbiana: - Numar total de microorganisme aerobe (TAMC) UFC/mL	10 ⁴
- Numar total de levuri si fungi filamentosi (TYMC) UFC/mL	10 ²
- Bacterii Gram-negative tolerante la sarurile biliare UFC /mL	10 ²
- <i>Escherichia coli</i> /mL	absent
- <i>Salmonella</i> sp. /25 mL	absent

Tabelul 3. Caracterizarea fizico-chimică a extractului de lemn dulce

Caracteristici	Conditii de admisibilitate
Aspect	lichid limpede
Culoare	brun-roscat
Miros	caracetristic
Densitate relativa, d_{20}^{20}	0.890-0,920
Conținut în etanol, % m/m, min.	50.0
Metanol si 2- propanol: - metanol, % v/v, max.	0.05
- 2-propanol, % v/v, max.	0.05
Reziduu prin uscare, %, min.	2.0
Dozare: - acid glicirizic, % , min.	0.4
Contaminare microbiana: - Numar total de microorganisme aerobe (TAMC) UFC/mL	10 ⁴
- Numar total de levuri si fungi filamentosi (TYMC) UFC/mL	10 ²
- Bacterii Gram-negative tolerante la sarurile biliare UFC /mL	10 ²
- <i>Escherichia coli</i> /mL	absent
- <i>Salmonella</i> sp. /25 mL	absent

Tabelul 4. Caracterizarea fizico-chimică a extractului de propolis

Caracteristici	Conditii de admisibilitate
Aspect	lichid limpede
Culoare	brun-roscat
Miros	caracetristic
Densitate relativa, d_{20}^{20}	0.890-0,920
Conținut în etanol, % m/m, min.	60
Metanol si 2- propanol: - metanol, % v/v, max. - 2-propanol, % v/v, max.	0.05 0.05
Reziduu prin uscare, %, min.	25
Continut in : - flavone exprimate in rutin % min - polifenoli totali exprimate in acid galic %, min - CAPE (caffeic acid phenethyl ester), % min.	2,5 8.0 0.5
Contaminare microbiana: - Numar total de microorganisme aerobe (TAMC) UFC/mL - Numar total de levuri si fungi filamentosi (TYMC) UFC/mL - Bacterii Gram-negative tolerante la sarurile biliare UFC /mL - <i>Escherichia coli</i> /mL - <i>Salmonella</i> sp. /25 mL	10 ⁴ 10 ² 10 ² absent absent

Tabelul 5. Caracterizarea fizico-chimică a extractului de rostopască

Caracteristici	Conditii de admisibilitate
Aspect	lichid limpede
Culoare	brun-verzui
Miros	caracetristic
Densitate relativa, d_{20}^{20}	0.890-0,930
Conținut în etanol, % m/m, min.	50.0
Metanol si 2- propanol: - metanol, % v/v, max. - 2-propanol, % v/v, max.	0.05 0.05
Reziduu prin uscare, %, min.	2.0
Continut in: - alcloizi totali exprimate in chelidonina, % , min.	0.03
Contaminare microbiana: - Numar total de	10 ⁴

microorganisme aerobe (TAMC) UFC/mL	10 ²
- Numar total de levuri si fungi filamentosi (TYMC) UFC/mL	10 ²
- Bacterii Gram-negative tolerante la sarurile biliare UFC /mL	absent absent
- <i>Escherichia coli</i> /mL	
- <i>Salmonella</i> sp. /25 mL	

Tabelul 6. Caracterizarea fizico-chimică a extractului de rozmarin

<i>Caracteristici</i>	<i>Conditii de admisibilitate</i>
Aspect	lichid limpede
Culoare	brun-verzui
Miros	caracteristic
Densitate relativa, d ₂₀ ²⁰	0.920-0,960
Conținut în etanol, % m/m, min.	20.0
Metanol si 2- propanol:	
- metanol, % v/v, max.	0.05
- 2-propanol, % v/v, max.	0.05
Reziduu prin uscare, %, min.	2.0
Continut in :	
- derivati hidroxicinamici totali exprimati in acid rozmarinic, %, min.	0.25
Contaminare microbiana:	
- Numar total de microorganisme aerobe (TAMC) UFC/mL	10 ⁴ 10 ²
- Numar total de levuri si fungi filamentosi (TYMC) UFC/mL	10 ²
- Bacterii Gram-negative tolerante la sarurile biliare UFC /mL	absent absent
- <i>Escherichia coli</i> /mL	
- <i>Salmonella</i> sp. /25 mL	

Activitate 1.2. Selectarea protocoalelor care vor fi utilizate pentru studiul extractelor vegetale si apicole

În vederea **testării eficienței antimicrobiene a fitoproduselor** obținute față de celulele microbiene în suspensie și aderate, Universitatea din București, va aplica **metode calitative și cantitative**. Metodele calitative adaptate după metoda difuzimetrică constau în depunerea /

încorporarea pe / în mediul de cultură însămânțat cu microorganismele de testat a produselor testate, urmată de cuantificarea efectului inhibitor asupra creșterii microbiene pe mediul solid.

Prin metoda calitativă se va determina de asemenea **acțiunea sinergică dintre antibiotice din diferite clase și extractele vegetale.**

Metodele cantitative constau în realizarea de diluții seriale în mediu lichid, ce va permite stabilirea valorii **concentrației minime inhibitorii (CMI)**, și respective a **concentrației minime de eradicare a biofilmelor (CMEB) (metoda microtitrării).**

Stabilirea indicelui de concentrație inhibitorie fracționată FICI/ FIC (*fractionary inhibitory concentration index/ fractionary inhibitory concentration*) va fi evaluată consecutiv protocolului de determinare a CMI prin metoda microdiluțiilor.

Algoritmul de calcul se bazează pe utilizarea unor formule, adaptate după modelul metodei ”tablei de șah” (Mun, S.H., 2014).

Determinarea mecanismelor de acțiune antimicrobiană a extractelor active se va realiza prin tehnica dinamicii efectului microbicid (principiul metodei constă în menținerea în contact a tulpinilor microbiene cu soluția stoc de de testat după realizarea unei concentrații de testare cu efect microbicid predictibil, timp de 5 min, 30 min, 3h, 6h și 24h), **evidențierea modificărilor hidrofobității celulelor planctonice și a celor incluse în biofilme** (protocol adaptat după Gora, 2010; Qiao, 2012), **evidențierea modificărilor de permeabilitate celulară și influenței asupra activității pompelor de eflux prin citometrie în flux**, **evidențierea modulării expresiei unor factori de virulență la nivel fenotipic și a expresiei genelor codificatoare sau reglatoare ale virulenței (gene de *quorum sensing*).**

În vederea realizării obiectivelor propuse în proiect, **Institutul de Virusologie Stefan S Nicolau va evalua** efectele antivirale, antitumorale și imunomodulatorii ale unor extracte naturale *in vitro* (pe culturi de celule) și *in vivo* utilizând modele murine.

Evaluarea efectelor toxice/genotoxice/imunomodulatorii/ iritante/ etc. produse de către extractele naturale se vor realiza în conformitate cu standardul ISO 10993 partile 3, 4, 5, 6, 10, 11, 20. Efectele dezinfectante/ antiseptice/ virulicide se vor testa în conformitate cu standardul SR EN 14476+A1:2016

De asemenea, efectul toxic al extractelor se va urmări utilizând kitul **CellTox Green Cytotoxicity Assay**, care cuantifică afectarea integrității membranare ca urmare a morții celulare. Astfel, permeabilitatea membrana produsă de compusul testat permite colorantului să

patrunda in interiorul celulei marcand doar moleculele de ADN din celule apoptotice si astfel fluorescanta emisa creste apreciabil, in timp ce in cazul celulelor viabile, acestea raman necolorate fara a creste fluorescanta emisa. Aceasta proprietate face ca semnalul de fluorescanta emis sa fie direct proportional cu citotoxicitatea. In plus, colorantul nu este toxic pentru celule, iar semnalul ramane constant si dupa o expunere de 72 de ore, iar din acest punct de vedere este ideal pentru determinarea in dinamica a citotoxicitatii in urma unor tratamente fiind posibila dilutia colorantului direct in mediu. De asemenea, testul ofera posibilitatea de multiplexare cu alte teste, obtinându-se un spectru mai larg de informatii asupra efectelor la nivel celular produse de diversele tratamente.

Evenimentele intracelulare specifice apoptozei timpurii, asociata cu perturbarea potentialului transmembranar mitochondrial, vor fi urmarite utilizand **MitoCapture™ Apoptosis Detection Kit**. Metoda se bazeaza pe utilizarea unui colorant cationic care emite diferite fluorescente in celulele viabile fata de cele apoptotice. In celulele santease, colorantul se acumuleaza si formeaza agregate in mitocondrie emitand o fluorescanta rosie, iar in cele apoptotice nu se poate acumula si agregata in mitocondrie datorita afectarii membranelor si astfel ramane in citoplasma in forma de monomer emitand fluorescanta verde. Se folosesc circa 1×10^6 celule, iar rezultatele pot fi observate atat in microscopie folosind filtrele pentru FITC si rodamina sau in plus, in citometrie in flux folosind canalele FITC (Ex/Em = 488/530 + 30 nm), pentru monomeri verzi si optional, cel pentru Iodura de Propidiu (Ex/Em = 488/590 + 42 nm), pentru agregatele rosii.

Analiza specifica a cailor de semnalizare posibl afectate /stimulate de tratamentul cu extracte natural si apicole se va realiza la nivel de ARNm (utilizand RT-PCR si assay-uri taqman specific) și la nivel de proteina (utilizand anticorpi specifici).

Analiza profilului de expresie a proteinelor cu rol in apoptoza se va utiliza **Proteome Profiler™ Human Apoptosis Array Kit**. Testul ajuta la stabilirea unui profil prin detectarea simultana a expresiei a 35 de proteine cu rol in procesul de apoptoza. Anticorpi specifici spotati in duplicat pe o membrane nitrocelulozica capteaza, legand specific proteinele tintaprezente in proba (celulele tratate/netratate cu extracte naturale perioade diferite de timp si apoi celule lizate). Detectia proteinelor captate se realizeaza cu anticorpi biotinilati, vizualizati in chemiluminescenta. Semnalul produs este direct proportional cu cantitatea de analit legata. Kit-ul contine 4 membrane si permite detectia urmatoarelor tinte: Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-x, Pro-

Caspaza-3, Caspase Clivata-3, Catalaza, cIAP-1, cIAP-2, Claspin, Clusterin, Citochromul c, TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5, FADD, Fas/TNFSF6, HIF-1 alpha, HO-1/HMOX1/HSP32, HO-2/HMOX2, HSP27, HSP60, HSP70, HTRA2/Omi, Livin, PON2, p21/CIP1/CDNK1A, p27/Kip1, Fosfo-p53 (S15), Fosfo-p53 (S46), Fosfo-p53 (S392), Fosfo-Rad17 (S635), SMAC/Diablo, Survivin, TNF RI/TNFRSF1A, XIAP.

Statusul de metilare /demetilare produs de tratamentul cu extracte naturale si apicole va fi cuantificat utilizand **HDAC-Glo I/II kit**, care determina activitatea enzimelor HDAC din clasele I și II. Reactivul contine un substrat peptidic, o secventa peptidica de lizina acetilata, derivata din histona 4, cuplata cu aminoluciferina. Acest reziduu de lizina este astfel susceptibil de acetilarea de catre enzimele HDAC masurand activitatea enzimatica a acestora. Reactia devine vizibila prin clivarea peptidului de aminoluciferina enzimatic, iar aminoluciferina serveste ca substrat pentru Luciferaza Ultra-Glo. Semnalul luminescent este direct proportional cu activitatea deacetilaza HDAC.

Activitatea antivirala / virulicida va fi evaluate in culturi de celule prin urmarirea efectului citopatic si imunofluorescenta cu anticorpi specifici. De asemenea se va utiliza kitul **Viral toxglo assay**, o metoda simpla, cuantificabila prin care se determina efectul citopatic indus la nivelul celulelor gazda aplicabil in cazul virionilor litici. Kitul va fi utilizat pentru a determina scaderea infectivitatii virale dupa tratamentul cu extracte naturale si apicole. Principiul se bazeaza pe masurarea ATP celular. Cand efectul citopatic apare datorita infectiei virale, scaderea nivelului ATP poate fi masurat si corelat cu incarcatura virala. Cantitatea de ATP detectata este direct proportionala cu numarul de celule gazda viabile in cultura si poate fi folosita ca o metoda simpla de a cuantifica efectul citopatic indus de virus. Sistemul are o sensibilitate crescuta, detecteaza incepand cu 15 celule/godeu dupa o incubare de 10 minute de contact cu reactivul. Semnalul de luminiscenta este foarte stabil, cu timp de injumatatire de peste 5 ore, depinzand de tipul de celule si de mediul folosit.

Pentru evaluarea efectelor imunomodulatorii induse de tratamentul celulelor cu extracte naturale si apicole se va utiliza Human Inflammatory Cytokines multi-analyte ELIS Array Kit MEH-004A, care analizeaza un panel de 12 citokine pro-inflamatorii, folosind un protocol ELISA conventional. Citokinele și chemokinele continute in acest panel sunt: IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17A, IFN γ , TNF α și GM-CSF.

Pentru studiile *in vivo* vor fi utilizate animale de laborator (*Mus musculus*) in scopul de a evalua efectele antimicrobiene, antitumorale si imunomodulatoare ale unor extracte naturale. In acest studiu vom utiliza soareci albi de laborator CD1 si soareci CD1-Nude (CD1-Foxn1^{nu}).

La finalul experimentelor soarecii utilizati vor fi sacrificati conform procedurilor operationale specifice de eutanasiere, prin hipoxie, cu expunere la CO₂, urmata de dislocare cervicala.

Animalele sunt gazduite in custi conforme cu reglementarile legale da asigurare a spatiului. Accesul la hrana si apa este liber, *ad libitum*. Animalele sunt gazduite in custi ventilate individul, iar conditiile specifice de mediu (temperatura, umiditate, schimburi de aer) sunt asigurate prin centrala termica individuala a biobazei si monitorizate prin sistemul de control *Techniplast Touch Slim Plus IVC SealSafe*. Iluminarea este naturala. Starea de sanatate a animalelor este monitorizata zilnic de personalul de specialitate.

In realizarea acestui proiect se are in vedere aplicarea principiului inlocuirii, reducerii utilizarii animalelor in proceduri si imbunatatirea metodelor de crestere, adapostire, ingrijire si utilizare a animalelor in proceduri.

Acest proiect reuneste mai multe echipe de cercetare cu o experienta vasta in testarea activitatii antiinfecțioase, antitumorale și imunomodulatoare a unor extracte naturale. Expertiza echipei implicate in realizarea obiectivelor propuse ne ajuta sa reducem la minimum numarul de animale utilizate, fara a compromite obiectivele proiectului. Testarea compusilor naturali se va realiza in primul rand *in vitro*, pe linii celulare, astfel că vor fi testati pe model murin doar compusii naturali care se dovedesc in testarile pe culturi de celule ca au efect terapeutic. Datorita similaritatilor cu organismul uman, modelul murin permite o validare adecvata a eficacitatii si toxicitatii, precum si a efectului imunomodulator a produselor.

Experimentele in care se vor utiliza soareci (*Mus musculus*) se vor desfasura in cadrul unei biobaze autorizate. In aceasta etapa, lucrarile proiectului privind experimentele pe animale au fost avizate de catre Comisia de Etica a Institutului de Virusologie (**Aviz nr 1138 din 19.10.2016** /proiect BeeHerEsi de catre Directia Sanitar Veterinara si pentru Siguranta Alimentelor (**Autorizatie nr312 din 31.10.2016** /proiect BeeHerE).

Bibliografie selectivă

- Gora A.B., Yao J., Sandy E.H., Zheng S., Zaray G., Koroma B.M., Hui Z., 2010, Cell surface hydrophobicity (CSH) of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger* and the biodegradation of Diethyl Phthalate (DEP) via microcalorimetry, *Journal of American Science*, 6(7): 78-88
- Mun S.H., Kang O.H., Joung D.K., Kim S.B., Choi J.G., Shin D.W., Kwon D.Y., 2014, *In vitro* anti MRSA activity of carvone with gentamicin, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7, 891-896
- Qiao G., Li H., Xu D.-H., Il Park S., 2012, Modified a colony forming unit microbial adherence to hydrocarbons assay and evaluated cell surface hydrophobicity and biofilm production of *Vibrio scophthalmi*, *Bacteriology & Parasitology*, 3(1): 130 doi:10.4172/2155-9597.1000130
- Temelie M., 2006, Enciclopedia plantelor medicinale spontane din Romania, *Ed. Rovimed Publishers*
- Rios J.L., Recio M.C., 2005, Medicinal plants and antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol*, 100: 80-84
- Cowan M.M., 1999, Plant products as antimicrobial agents, *Clin Microbiol Rev*, 12(4): 564-582
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G., 2000, Natural Products (Secondary Metabolites), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists*, 1250-1318
- Chopra I., Hodgson J., Metcalf B., Poste G., 1997, The search for antibacterial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother*, 41(3): 497-503
- Marinas, O. Teza de doctorat. Caracterizarea fizico-chimică și evaluarea potențialului terapeutic al amestecurilor fitochimice și al altor fracții extrase din diferite plante invazive. Școala Doctorală de Biologie a Universității din București, 2015.