

**UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE
DOMENIUL DE DOCTORAT: BIOLOGIE**

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND MODULAREA PROCESELOR “IN VITRO” DE CĂTRE
ANUMIȚI FITOCOMPUȘI ÎN ALGORITMUL FUNCȚIONALITĂȚII ȚESUTULUI
CUTANAT**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT,

Prof. Univ. Dr., C.S. I, Natalia Roșoiu

Membru titular al Academiei Oamenilor de Știință din Romania

STUDENT - DOCTORAND,

Brîndușa Georgiana Marinescu (cas. Dumitriu)

CONSTANȚA 2013

C U P R I N S

	Pagina teza	Pagina rezumat
OBIECTIVELE SI SCOPUL LUCRĂRII	1	4
PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII	3	5
Capitolul 1: Mecanisme celulare implicate în funcționalitatea țesutului cutanat	3	5
1.1. Considerații generale - Noțiuni de fiziologie a pielii	3	
1.2. Îmbătrânirea – modificări ale turn-over celular și proteic	11	
1.3. Molecule semnal în menținerea fermității țesutului cutanat	12	
1.4. Procese inflamatorii cutanate	15	
1.5. Radiația UV- Mecanisme de protecție celulară	18	
Capitolul 2. Compuși naturali implicați în modularea proceselor celulare dermo-epidermice	22	6
2.1. Considerații generale	22	
2.2. Compuși fenolici	22	
2.3. Saponine	30	
Capitolul 3. Menținerea funcționalității țesutului cutanat ca urmare a tratamentului activ la nivelul pielii	32	7
3.1. Considerații generale	32	
3.2. Mecanisme fundamentale de menținere a status-ului funcțional al pielii	33	
3.3. Ingredienți activi la nivelul pielii prin acțiuni țintă la nivel celular și molecular	40	
PARTEA a II-a. CONTRIBUȚII PERSONALE	45	8
Capitolul 4. Introducere	45	9
Capitolul 5. Materiale și metode	47	9
5.1. Culturi celulare	47	9
5.2. Componente biologice active testate	49	9
5.3. Citotoxicitate evaluată prin determinarea activității metabolice (tehnica MTS) și eliberarea lactat dehidrogenazei (LDH) în mediul extracelular ca răspuns la un stimul toxic	54	9
5.4. Determinarea secvențialității ciclului celular prin citometrie în flux	57	9
5.5. Evidențierea succesiunii generațiilor proliferative prin marcarea fluorescența cu CFSE (carboxi-fluorescein-succinimidil ester)	59	9
5.6. Evaluarea statusului apoptotic prin dublă marcarea fluorescența și citometrie în flux	61	9
5.7. Tehnica de detecție flow-citometrică a analitelor solubili „Beads-based assay”	63	9
5.8. Evidențierea supra-expresiei moleculelor de adeziune ICAM, VCAM, PRECUM și a lanțurilor glico-proteice $\alpha 1$, $\alpha 2$, și $\beta 1$ ale integrinelor prin marcarea cu anticorpi	69	9

fluorescenți		
5.9. Determinarea apei oxigenate și a anionului superoxid intracelular prin citometrie în flux	74	9
5.10. Determinarea calciului intracelular prin citometrie în flux (marcare fluorescența cu FLUO 4)	76	9
CAPITOLUL 6. REZULTATE ȘI DISCUȚII	78	10
6.1. Stabilirea limitelor de citotoxicitate pentru principiile active studiate în funcție de tipul de celulă țintă	78	10
6.2. Acțiunea unor compuși obținuți din <i>Trigonella foenumgraecum</i> și <i>Trifolium pratense</i> asupra statusului proliferativ celular al fibroblastilor dermici în condiții normale de cultivare precum și în depleție estrogenică; Corelații cu modularea calciului intracelular	87	11
6.3. Modularea moleculelor –semnal implicate în fermitatea țesutului cutanat (integrine $\alpha 1\beta 1$ și $\alpha 2\beta 1$, TGF- β) de către compuși izolați din <i>Trigonella foenumgraecum</i> și <i>Trifolium pratense</i>	97	16
6.4. Activitatea antiinflamatoare la nivel de endoteliu vascular a unor fitocompuși din <i>Aesculus hippocastanum</i> , <i>Hedera helix</i> și <i>Trigonella foenumgraecum</i>	102	18
6.5. Protecție celulară cumulată față de radiația UV indusă de extracte vegetale din <i>Trifolium pratense</i> , <i>Trigonella foenumgraecum</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Medicago sativa</i> și <i>Crataegus monogyna</i> .	121	21
CONCLUZII	146	24
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	151	27
LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE DE DOCTORAND	166	
A. Lucrări științifice publicate în reviste recunoscute C.N.C.S.I.S.	166	
B. Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale și publicate sub formă de rezumat	167	
C. Participări la congrese științifice internaționale	168	
D. Participări în calitate de director sau membru în contracte de cercetare	169	
E. Brevete de invenție	170	

CUVINTE CHEIE: țesut cutanat, îmbătrânirea pielii, fotoprotecție, inflamație vasculară, fitocompuși, mecanisme celulare, *Trifolium pratense*, *Trigonella foenumgraecum*, *Triticum aestivum*, *Medicago sativa*, *Crataegus monogyna*, *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII

În domeniul dezvoltării cosmeticelor moderne, un obiectiv principal îl reprezintă crearea unor strategii terapeutice care să aducă beneficii majore asupra statusului țesutului cutanat, prin acțiunea ținta a unor ingrediente active la nivel de genă sau receptor celular, delimitându-se de efectul de curățare și înfrumusețare aparentă caracteristic până acum pentru acest tip de produse.

În acest context, scopul cercetărilor realizate îl reprezintă **evidențierea unor mecanisme de reglare a funcționalității dermo-epidermice care stau la baza homeostaziei țesutului cutanat și modularea acestor procese prin acțiunea unor compuși de origine vegetală.**

Unul dintre obiectivele principale ale acestor studii s-a axat pe **definirea principalelor procese celulare în funcție de ținta terapeutică**, după cum urmează: la nivel de epiderm, primul strat cu funcție de barieră a pielii față de agresiunea mediului extern (keratinocite) – inflamație, stres oxidativ, inițierea apoptozei în condițiile impactului cu radiația UV; la nivel de derm, regiune responsabilă de apariția ridurilor (fibroblaști) - status proliferativ, sinteza proteinelor din matrixul extracelular, expresia moleculară a integrinelor de tip $\alpha1\beta1$ și $\alpha2\beta2$; la nivel de endoteliu vascular, cu rol major în homeostazia pielii prin furnizarea de oxigen, nutrienți și hormoni (celule endoteliale umane) – inflamație, angiogeneza.

Un alt obiectiv a fost **dezvoltarea de strategii terapeutice diferențiate** în funcție de specificitatea mecanismului ținta definit anterior, **bazate pe valorificarea unor specii de plante medicinale indigene** în sensul obținerii unor **clase de compuși bioactivi cu eficacitate demonstrată**. Modularea mecanismelor de protecție față de agresiunea mediului extern și reconstrucție cutanată anti-îmbătrânire s-a realizat prin utilizarea individuală sau în asociere a principiilor active de tip saponine, flavone și izoflavone, acizi polifenolicarboxilici, din următoarele specii de plante: *Trifolium pratense*, *Medicago sativa*, *Crataegus monogyna*, *Trigonella foenumgraecum*, *Triticum aestivum*, *Hedera helix* și *Aesculus hippocastanum*.

Modelele experimentale concepute și aplicate în testarea acestor principii active demonstrează eficacitatea strict direcționată a principiilor bioactive în funcție de specificitatea indusă în procesele de dinamică celulară monitorizate.

Metodele experimentale utilizate în definirea mecanismelor de acțiune a compușilor bioactivi sunt tehnici moderne de investigare celulară multiparametrică (citometria în flux orientată atât spre marcarea și analiză fluorescență a parametrilor celulari, cât și spre detecția proteinelor solubile din mediul de cultură prin tehnică bazată pe particule fluorescente cuplate cu anticorpi – „beads-based assay”; analiză de morfologie celulară prin microscopie optică inversată, spectrofotometrie). Acestea reunesc metodologii complementare și corelative de caracterizare a unor procese celulare, analiză simultană complexă a principalilor parametri de funcționalitate a pielii creând premisele definirii corecte a țintelor terapeutice pentru fiecare compus și a îmbunătățirii eficacității produselor dermatocosmetice viitoare.

PARTEA I. STADIUL CUNOAȘTERII

Capitolul 1.

MECANISME CELULARE IMPLICATE IN FUNCȚIONALITATEA ȚESUTULUI CUTANAT

Pielea este unul dintre cele mai mari organe, având o suprafață de aproximativ 2m^2 și cântărind 16% din greutatea corpului. Funcțiile ei sunt variate: strat protector față de agresiunea microorganismelor; previne deshidratarea; organ senzorial; participă la termoreglare. Epiderma este un strat epitelial de suprafață, derma este un țesut conex situat sub epidermă, iar hipoderma este un țesut conjunctiv subcutanat. (YOUNG, 2000; FAWCETT, 2002)

În cadrul procesului de îmbătrânire, au loc o serie de evenimente celulare și moleculare complexe și diferențiate în funcție de agresiunea mediului extern (foto-îmbătrânire), dar și de specificitatea intrinsecă a organismului respectiv (îmbătrânirea cronologică). **Proliferarea celulară** și corelarea ei cu diverse căi metabolice (Calciu intracelular, protein kinaza C) este un parametru relevant pentru studii de tip „anti-ageing” la nivelul pielii (SOROKA et al., 2008), fiind cunoscută scăderea ratei de multiplicare și a turn-overului celular ale fibroblastului asociate cu îmbătrânirea.

Derma este alcătuită în mare parte din fibre de collagen și elastină. Fibrele groase de collagen susțin pielea. Fibrele de elastină sunt foarte flexibile și conferă rezistență mecanică și adaptabilitate la modificările conformaționale ale pielii. Derma constă în mare parte din țesut conjunctiv, cunoscut și ca matrice extracelulară (ECM) secretată de fibroblaști. ECM-ul este alcătuit din 3 clase de biomolecule, cu o mare varietate de forme și mărimi: proteine structurale: collagen și elastină, proteine specializate: fibrilină, fibronectină și laminina, proteoglicani. Considerând că dominant în piele collagenul de tip I și III, se vor folosi agenți și tratamente pentru a **stimula sinteza acestor tipuri de collagen**. De asemenea, se poate apela la **inhibarea degradării** collagenului ca metodă unică sau în conjuncție cu stimularea sintezei. Multe cercetări s-au axat pe găsirea unor inhibitori topici eficienți ai metaloproteinazelor (în particular: collagenaza), în timp ce modulatori la nivel molecular și chiar genic (ex. **activarea/ inhibiția expresiei TGF- β**) reprezintă ținta cea mai recentă a formulelor inovatoare de dermatocosmetice anti-ageing. Efectul profund al TGF- β în homeostazia matrixului extracelular se datorează abilității sale de alterare a balanței activare/inhibiție matrix metaloproteinaze (MMP) la nivel de expresie genică. TGF- β 1 este izoforma majoră preponderentă în țesuturi, și în fluidul intercelular implicat în procesul de vindecare al rănilor, cu rol în stimularea sintezei de collagen, modularea turn-overului matrixului prin efecte inhibitoare asupra MMP, precum și prin inducerea diferențierii miofibroblaștilor, un tip de celulă care intervine în procesul de contracție a rănilor, în sinteza constituenților țesutului de granulație, inclusiv formarea collagenului și fibronectinei în noul compozit dermic (RHEIN, 2010)

Un alt aspect important este **cicatrizarea imperfectă** după expunere solară sau traume minore, datorată depozitelor de collagen și elastină formate din fibre dezorganizate. Intervenția terapeutică în acest caz trebuie să aibă loc pe două căi: **degradare enzimatică** a acestor aglomerări fibrilare sub **acțiunea metaloproteinelor activate** și **stimularea sintezei proteice** pentru regenerarea suportului structural din matrixul extracelular. Pe lângă acest proces, recent a fost descoperit un mecanism convergent la nivelul **integrinelor α 1 β 1** și **α 2 β 1** cu rol în realizarea legăturilor celulă – matrice proteică extracelulară, amplificarea expresiei acestora la nivel de fibroblast dermic susținând restabilirea fermității pielii.

Rolul estrogenilor în piele este recunoscut, aceștia acționând prin receptori celulari asupra proliferării și sintezei de collagen (EUI DONG SON et al., 2005).

Pielea poate fi considerată o interfață între corp și mediul înconjurător, acționând ca o barieră față de efectele dăunătoare ale agenților fizici și chimici exogeni, inclusiv radiația UV. (CARINI et al., 2000) Stresul foto-oxidativ, originar din speciile de oxigen reactive formate în pielea expusă la soare reprezintă un mecanism patologic cheie, având consecințe atât la nivelul degradării matricei extracelulare și formarea ridurilor, cât și în foto-mutageneza celulară implicată în carcinogeneza pielii. Foto-îmbătrânirea, cauzată de acțiunea radiațiilor UV generatoare de radicali liberi la nivel celular are caracteristici fiziologice distincte față de îmbătrânirea cronologică. Având în vedere cele prezentate, una dintre acțiunile țintă ale unui ingredient dermatocosmetic ar trebui să fie cea de **reducere a stresului oxidativ celular și a reacțiilor în lanț declanșate de acesta**: inducerea apoptozei, a secreției citokinelor pro-

inflamatorii, vascularizare aberantă promovată la nivel molecular de factorul VEGF (WONDRAK, 2007).

Abordările tradiționale asupra îmbătrânirii pielii par incomplete, în special datorită modificărilor importante la joncțiunea dermo-epidermică, la nivelul evaluării proteinelor cheie.

Din această clasă de proteine fac parte și integrinele, receptori de suprafață celulară responsabili de transferul informațiilor între interiorul și exteriorul celulei. Integrinele sunt implicate în diferite funcții celulare, de la creștere și dezvoltare, la răspuns imun și vindecarea rănilor. Integrina $\alpha 1\beta 1$ mediază feed-back-ul de reglare a sintezei de collagen, realizând legături de tip celulă–collagen sau celulă–laminina1 din matrixul extracelular, iar integrina $\alpha 2\beta 1$ mediază stimularea collagenazei de tip I (MMP1) cu rol în fibrilogeneza (organizarea collagenului în fibrile), leagă collagenul de tip I. Balanța între integrina $\alpha 1\beta 1$ și integrina $\alpha 2\beta 1$ este importantă pentru menținerea echilibrului între degradarea și sinteza de collagen. (RIIKONEN et al., 1995; ZHANG et al., 2006; FUJIMURA et al., 2007).

Celulele endoteliale din dermă sunt implicate în vindecarea rănilor, inflamații, angiogeneza tumorală, și sunt predominant de origine micro-vasculară, fiind de proveniență și funcționalitate distincte față de celulele endoteliale din vasele mari, utilizate pentru cercetarea *in vitro* vasculară. Creșterea și turnoverul celulelor endoteliale în piele este fundamentală nu numai în cadrul dezvoltării normale, dar și în vindecarea rănilor, ciclul foliculilor piloși, metastaza celulelor tumorale, și a diferitelor stadii ale patologiei cutanate. Există mai multe aspecte privind fiziologia vasculaturii dermice și implicarea acestora în homeostazia țesutului cutanat. Dintre acestea enumerăm: *inflamația vasculară*, caracterizată de adeziunea între limfocit și endoteliu declanșată de exprimarea unor molecule de adeziune –markeri de inflamație și secreția de citokine pro-inflamatorii; *implicarea anumitor citokine*, esențială în cadrul activării endoteliale, a vindecării leziunilor provocate de radiația UV sau a rănilor cutanate; *fenomenul de angiogeneză* și proliferare celulară.

Capitolul 2.

COMPUȘI NATURALI IMPLICAȚI ÎN MODULAREA PROCESELOR CELULARE DERMO-EPIDERMICE

Plantele sintetizează o gamă largă de compuși organici ce sunt clasificați în mod obișnuit în metaboliți primari și secundari. Metaboliții primari sunt compuși ce au un rol esențial în fotosinteză, respirație, creștere și dezvoltare. Aceasta clasificare poate include : fitosterolii, lipidele acilate, nucleotidele, aminoacizii, acizii organici.

Ceilalți compuși ce sunt de obicei în cantități foarte mici dar care în unele specii în mod surprinzător se acumulează în concentrații foarte mari, sunt metaboliții secundari. Aceștia au structuri diverse (unele distribuite într-un număr limitat de specii din lumea plantelor) și au fost ignorate mult timp, dar în ultima perioadă au devenit de interes, având rol cheie în protecția plantei față de infecțiile microbiene, în atragerea polenizatorilor, în protecția UV, în fixarea azotului. De asemenea acești metaboliți sunt interesați datorită posibilităților de utilizare drept coloranți, fibre, agenți de lipire, uleiuri, ceruri, agenți de parfumare și reprezintă noi surse naturale pentru obținerea de noi medicamente, antibiotice, insecticide, ierbicide.

Pe baza structurii lor, metaboliții secundari pot fi clasificați în trei mari grupe:

- **compuși fenolici: flavonoidici și non-flavonoidici;** *flavonoide:* flavone, izoflavone, proantociani; *non-flavonoidici:* acizi polifenolici, stilbeni, chalcone;
- **compuși triterpenoidici**
- **alcaloizi cu azot sau cu sulf**
- **saponine:** steroidice și triterpenice cu agliconii corespunzători;

Numeroase substanțe biologic active cu efecte cunoscute asupra fiziologiei umane au fost identificate pornind de la datele oferite de medicină tradițională și utilizate în ultima vreme atât în scop terapeutic cât și în scop cosmetic. Chimia compușilor naturali nu formează doar baza științifică a utilizării plantelor medicinale, ci joacă un rol important în descoperirea ingredientelor active cosmetice, farmaceutice și nutraceutice.

Capitolul 3.

MENTINEREA FUNCȚIONALITĂȚII ȚESUTULUI CUTANAT CA URMARE A TRATAMENTULUI ACTIV LA NIVELUL PIELII

Status-ul pielii este definit în general ca o combinație a caracteristicilor fiziologice, de culoare și textură date de conținutul de sebum, de nivelul de hidratare, de pH-ul suprafeței epidermei. Prezența unei cantități adecvate de apă în stratul corneum este importantă pentru aspectul neted și catifelat al pielii. Sebumul, secretat de glandele sebacee împreună cu alte lipide epidermale ajută la menținerea hidratării prin crearea unui strat protector la suprafața pielii care reduce pierderea de fluid prin epidermă. De asemenea, lipidele împreună cu aminoacizii contribuie la menținerea acidității pielii, iar un pH scăzut protejează pielea de germeni patogeni.

Dermatocosmetica are ca obiectiv principal găsirea unor soluții la granița terapiei, urmărind restabilirea unui echilibru fiziologic al parametrilor esențiali pe baza investigațiilor la nivelul dermei și epidermei.

Cercetări avansate au ca scop dezvoltarea unor produse pentru **îmbunătățirea hidratării la nivelul stratului corneum și a integrității barierei hidrolipidice bazată pe biologia stratului cornos deshidratat**. Acestea au dus la evidențierea unor mecanisme celulare și moleculare care au fundamentat dezvoltarea ingredientelor dermatocosmetici cu țintă biologică specifică.

De asemenea, adeziunea celulară prezintă noi perspective privind restaurarea fermității pielii (MOREAU, 2006). Fermitatea pielii reprezintă, la nivel molecular, consecința adeziunii celulare și a expresiei integrinelor produse de fibroblaști.

Interacția celulelor cu mediul lor este mediată de receptori specifici pe suprafața lor. În matricea extracelulară a pielii, o familie de receptori de membrană numite integrine joacă un rol important în adeziunea intercelulară și adeziunea celulă-proteină și în organizarea și asamblarea matricii extracelulare de care depinde fermitatea pielii.

S-au studiat capacitățile de adeziune și expresia integrinelor membranare ale celulelor în prezența sau absența expunerii la radiație UV.

Inducerea inflamației este de cele mai multe ori asociată cu disfuncții imunologice, această stare fiind dificil de tratat, fiind un fenomen auto-indus ce parcurge un ciclu de amplificare. În cadrul aplicațiilor cosmetice, inflamația poate avea cauze multiple, cum ar fi îmbătrânirea, radiația UV, poluarea. Expunerea pe termen lung la acești factori induce un fenomen iritativ la nivelul pielii manifestat prin activarea slabă, dar progresivă a citokinelor proinflamatorii, accelerarea turn-overului keratinocitelor care afectează funcționalitatea și homeostazia acestora, perturbând structura stratului cornos, ceea ce mărește riscul de penetrare al agenților externi agresori.

PARTEA a-II-a: CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 4. INTRODUCERE

Este bine cunoscut impactul negativ al unor produse care prin strategii agresive de marketing, fără a se baza pe teste biologice elocvente, induc la nivelul populației consumatoare inițierea unor afecțiuni dermatologice pe termen lung (reacții alergice sau sensibilizări la anumite substanțe, dermatoze, etc) sau nu aduc beneficiile promise. Implicarea cercetării științifice în această problemă este foarte importantă, ea putând aduce elucidarea unor procese biologice la nivel de țesut dermo-epidermic și demonstrarea potențialei toxicități și / sau a eficacității anumitor compuși activi, particularizat pe un anumit tip de mecanism fiziologic, precum și evidențierea unor interacțiuni între diferite componente active care pot potența sau inhiba efectul terapeutic țintă.

În contextul unei explozii de produse pe piața de dermatocosmetice internațională și al diversificării efectelor declarate pe de o parte, precum și în condițiile existenței unor consumatori din ce în ce mai exigenți și educați, **prezentul studiu își propune** să completeze un domeniu de interes atât pentru cercetarea științifică, producătorii de dermatocosmetice cât și publicul larg, acela al **explicitării unor mecanisme celulare și moleculare implicate în funcționalitatea țesutului cutanat, cât și evidențierea potențialului terapeutic al unor principii active de origine vegetală.**

Interdependența unor procese celulare și moleculare, precum și specificitatea reglării unor căi de semnalizare pentru inițierea mecanismelor de control fiziologic alcătuiesc un algoritm ce definește funcționalitatea unui anumit tip de țesut și este ulterior integrat la nivelul răspunsului global al organismului cu privire la toleranța sau eficacitatea unui tratament.

În acest context, ne propunem realizarea unui screening complet la nivelul principalelor tipuri celulare care formează sau susțin activitatea țesutului cutanat, keratinocitele, fibroblaștii și celulele endoteliale vasculare, privind modularea funcționalității acestora cu anumiți compuși biologic activi izolați și purificați din plante cu potențial fitoterapeutic din flora indigenă.

Funcționalitatea celulară va fi definită prin investigarea și corelarea unor parametrii complementari specifici fiecărui tip de proces urmărit, de exemplu:

- **Pentru keratinocit**, principala linie de apărare a organismului față de agresiunea mediului extern, am selectat un model experimental de iradiere UV în care vom evidenția impactul tratării cu anumiți compuși bioactivi asupra apoptozei celulare, secvențialității ciclului celular, principalele citokine pro-inflamatorii (IL6 și IL8) și pro-iritative (IL 1 α), stres oxidativ celular (exprimat prin apa oxigenată și anionul superoxid eliberate intracelular) și factorul pro-angiogenic VEGF;
- **Pentru fibroblast**, cu important rol structural și funcțional în special în procesul de îmbătrânire, am selectat studii explorative în condiții normale de dezvoltare, dar și de depleție estrogenică, urmărind: statusul proliferativ celular corelat cu modularea influxului de calciu intracelular, precum și molecule reglatoare ale formării collagenului (TGF β) și molecule exprimate la nivel membranar cu rol de adeziune celula –matrix extracelular(integrine α 1 β 1 și α 2 β 1);
- **Pentru endoteliul vascular**, implicat în procesele inflamatorii asociate afecțiunilor dermatologice (ex. acnee, edeme de diferite etiologii, etc) vom investiga parametrii reprezentativi sub acest aspect citokine pro-inflamatorii (IL6 și IL8), molecule de adeziune endoteliu – monocit (ICAM și VCAM) precum și factorul VEGF (vascular endothelial growth factor) ca indicator al permeabilizării vasculare.

Compușii de origine vegetală, potențiali modulatori ai acestor procese, au fost selectați pe baza componentelor bioactive conținute și al impactului direct al acestora în mecanismele celulare ținta. Astfel, se vor testa extracte standardizate și substanțe purificate din următoarele categorii:

- **Biocomplexe cu un total izoflavonoidic standardizat (minim 200 mg/100 mL) din *Trifolium pratense*** - efect la nivel de fibroblast și keratinocit

- **Biocomplexe cu conținut ridicat de componente polifenolice de tipul flavonoide, acizi polifenolcarboxilici și proantociani** - efect fotoprotector la nivel de keratinocit
- **Biocomplexe în conținutul cărora saponinele triterpenice se găsesc alături de flavone, proantociani sau izoflavone** – efect fotoprotector la nivel de keratinocit
- **Biocomplexe cu conținut ridicat de compuși steroidici, saponine sau agliconi** - efect la nivel de fibroblast și keratinocit
- **Saponine triterpenice**, efect la nivel de endoteliu vascular

Capitolul 5. MATERIALE ȘI METODE

5.1. CULTURI CELULARE

Demonstrarea efectelor biologice ale extractelor vegetale s-a realizat la nivel de celulă țintă, pe linii celulare standardizate relevante pentru mecanismul studiat:

- **Efectul de restructurare dermică (turn-over celular și restabilirea fermității țesutului cutanat)** s-a testat pe fibroblaști dermici umani (HS 27), principalul tip celular responsabil atât de sinteza proteinelor structurale din matricea extracelulară, sub strictă semnalizare a factorului TGFβ, cât și de expresia integrinelor – molecule ce realizează adeziunea celula – matrix proteic. A fost experimentat și mecanismul de acțiune estrogen-mimetic, depleția estrogenică fiind un proces conex important în îmbătrânire, cu impact considerabil la nivelul pielii.
- **Efectul antiinflamator la nivel de endoteliu vascular** s-a evidențiat pe linia specifică HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) datorită relevanței acesteia în simularea procesului inflamator la nivel de vas sanguin
- **Efectul fotoprotector** s-a demonstrat pe linia de keratinocite umane HaCaT, acest tip de celule formând epidermul, primul strat al țesutului cutanat, cu funcție de barieră față de acțiunea nocivă a radiației UV.

5.2. COMPONENTE BIOLOGIC ACTIVE TESTATE

- a) **Biocomplex cu un total izoflavonoidic standardizat (minim 200 mg/100 mL) Dermo ET**, obținut din *Trifolium pratense*
- b) **Biocomplex cu conținut ridicat de componente polifenolice de tipul flavonoide, acizi polifenolcarboxilici și proantociani (Dermo P)**, obținut din *Crataegus monogyna* – **extract** standardizat având următoarea compoziție:
 - Proantociani: 0,336 g / 100g extract
 - Flavone: 0,473g / 100g extract
 - Acizi polifenol carboxilici: 0,833g / 100g extract
- c) **Biocomplexe în conținutul cărora saponinele triterpenice se găsesc alături de flavone, proantociani sau izoflavone:** Dermo Egr – din *Triticum aestivum* și Dermo L din *Medicago sativa*,
 - **Dermo-Egr** – având un conținut de saponine steroidice specifice nehidrolizate de 0,308 g/100g extract, condiționat în PG
 - **Dermo-L** – având un conținut de 0,208g/100g extract saponine triterpenice și steroidice nehidrolizate, împreună cu izoflavone (77,078mg/100g extract), condiționat în PG
- d) **Biocomplexe cu conținut ridicat de compuși steroidici: saponine sau agliconi (Dermo SK-a, Dermo SK-s și Dermo-Dis)** izolate din *Trigonella foenumgraecum*
 - **Dermo-Ska** – are aglicon steroidic liber (procedeul de obținere presupune o etapă de hidroliză a saponinelor din componența extractului) 0,194g/100g. extract, din care Dermo – Dis 1.288mg / ml Dermo-Dis. - condiționat în PG
 - **Dermo-Sks** – are un conținut de saponine steroidice nehidrolizate de 1,494g/100g extract - condiționat în PG.
 - **Dermo-Dis** - aglicon steroidic liber purificat, conținut și în Dermo-Ska
- e) **Biocomplexe cu conținut ridicat de saponine triterpenice DERMO-Es din *Aesculus hippocastanum*; DERMO-Hdc din *Hedera helix***
 - **Dermo-Es** - din *Aesculus hippocastanum* - preparat sub forma unei pulberi alb cafenii cu un conținut de min 70 %

- **Dermo-HdC** – din *Hedera helix* - preparat sub forma unei pulberi alb gălbui cu un conținut de 60-66% saponina triterpenica bidesmozidica

5.3. METODE DE INVESTIGARE

- Citotoxicitate evaluată prin determinarea activității metabolice (tehnica MTS) și eliberarea lactat dehidrogenazei (LDH) în mediul extracelular ca răspuns la un stimul toxic (BARLTROP et al., 1991, RISS et al., 1992) (FOTAKIS și TIMBRELL 2006).
- Determinarea secvențialității ciclului celular prin citometrie în flux (http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/cell_cycle/cells2.html)
- Evidențierea succesiunii generațiilor proliferative prin marcarea fluorescența cu **CFSE** (carboxi-fluorescein-succinimidil ester) (LYONS și DOHERTY 2004; LYONS 2000)
- Evaluarea statusului apoptotic prin dublă marcarea fluorescența și citometrie în flux (MARTIN, et al., 1995).
- Tehnica de detecție flow-citometrică a analiților solubili „BEADS-BASED ASSAY” (COOK, 2001).
- Evidențierea supra-expresiei moleculelor de adeziune ICAM, VCAM, precum și a lanțurilor glico-proteice $\alpha 1$, $\alpha 2$, și $\beta 1$ ale integrinelor prin marcarea cu anticorpi fluorescenți
- Determinarea apei oxigenate și a anionului superoxid intracelular prin citometrie în flux (CARINI et al., 2000; ROBINSON et al., 2009).
- Determinarea calciului intracelular prin citometrie în flux (marcarea fluorescența cu FLUO 4) (VARANI et al, 1990; MONACO et al, 2009)

Capitolul 6.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.1. STABILIREA LIMITELOR DE CITOTOXICITATE PENTRU PRINCIPIILE ACTIVE STUDIAȚE ÎN FUNCȚIE DE TIPUL DE CELULĂ TINTĂ

6.1.1. Citotoxicitate la nivel de fibroblast uman dermic (linia HS 27)

După tratarea cu diferite concentrații de extract, pe o perioadă de 24h, a celulelor de fibroblast linia normală HS27 aderată 24h, am măsurat absorbanțele corespunzătoare activității metabolice celulare (MTS) și acumulării în mediul de cultură a enzimei citosolice stabile LDH ca urmare a acțiunii toxice a compuşilor. Rezultatele sunt prezentate, pentru fiecare compus bioactiv.

a) Biocomplexe cu conținut total de izoflavone standardizat (Dermo ET) - Considerăm diluții optime de lucru pe această linie celulară ca fiind diluțiile mai mari sau egale cu 1/800 Dermo-ET (această valoare reprezintă punctul de inflexiune de la care activitatea metabolică se amplifică și scade secreția lactat dehidrogenazei, indicator de toxicitate celulară).

b) Biocomplexe cu conținut ridicat de saponine steroidice hidrolizate și nehidrolizate (Dermo-Dis, Dermo SK-a și Dermo SK-s) - Dermo Dis are limită de citotoxicitate corespunzătoare dozei de 170mM, testele de eficacitate putând fi configurate începând cu această concentrație, în ordine descrescătoare. Considerăm ca diluții optime de lucru **peste 1/5000 Dermo-Ska** pentru testarea activității specifice a compusului pe linia de fibroblaști umani normali – HS27. **Extractul Dermo-Sks** este mai toxic decât omologul său care conține saponină hidrolizată (Dermo-Ska), putând fi testat în privința activității specifice la nivel de fibroblaști umani normali la **diluții mai mari de 1/18000**.

6.1.2. Citotoxicitate la nivel de endoteliu vascular (linia HUVEC)

După tratarea cu diferite concentrații de extract, pe o perioadă de 24h, a celulelor de endoteliu vascular tip HUVEC, aderată 24h, am măsurat absorbanțele corespunzătoare activității metabolice celulare (MTS) și acumulării în mediul de cultură a enzimei citosolice stabile LDH ca urmare a acțiunii toxice a compuşilor. Rezultatele sunt prezentate, pentru fiecare compus bioactiv, în figurile 37-39.

a) Biocomplexe cu conținut ridicat de saponine triterpenice DERMO-Hdc din *Hedera helix* și DERMO-Es din *Aesculus hippocastanum*;

Limita citotoxică pentru Dermo-HdC este 50μM, activitatea specifică a acestui compus la nivel de endoteliu vascular putând fi evaluată sub această concentrație Pragul de citotoxicitate la nivel de endoteliu vascular este de **2,5 μM pentru Dermo-Es**. Testele de activitate specifică pentru Dermo-Dis pe celule endoteliale HUVEC se pot derula începând cu doza de 0,14μM (140 nM), conform profilului citotoxic prezentat în fig.39.

6.1.3. Citotoxicitate la nivel de keratinocit uman normal (HaCaT)

După tratarea cu diferite concentrații de extract, pe o perioadă de 24h, a keratinocitelor umane normale din linia standardizată HaCaT, aderate 24h, am măsurat absorbantele corespunzătoare activității metabolice celulare (MTS) și acumulării în mediul de cultură a enzimei citosolice stabile LDH ca urmare a acțiunii toxice a compușilor.

a) Biocomplex cu conținut ridicat de componente polifenolice de tipul flavonoide, acizi polifenolcarboxilici și proantociani (Dermo P), obținut din *Crataegus monogyna* – Conform curbei de citotoxicitate, activitatea specifică la nivel de keratinocit uman normal se poate evalua de la diluții mai mari sau egale cu **1/500 Dermo-P**.

b) Biocomplexe în conținutul cărora saponinele triterpenice se găsesc alături de flavone, proantociani sau izoflavone: Dermo Egr – din *Triticum aestivum* și Dermo L din *Medicago sativa*. Conform curbei de citotoxicitate extractul **Dermo-Egr** este ne-citotoxic la nivel de keratinocit uman normal de la diluții **1/500** sau mai mari. Limita de citotoxicitate la nivel de keratinocit uman normal pentru **Dermo-L** este de **1/2000**.

c) Biocomplexe cu conținut ridicat de compuși steroidici: saponine sau agliconi (Dermo SK-a, Dermo SK-s) izolate din *Trigonella foenumgraecum* - Conform curbelor de citotoxicitate prezentate mai sus, activitatea specifică la nivel de keratinocit poate fi evaluată pentru diluții mai mari sau egale cu **1/18 000 Dermo-Sks**. Limita de citotoxicitate pentru **Dermo-Ska** este de **1/4000** la nivel de keratinocit uman normal.

d) Biocomplexe cu conținut total de izoflavone standardizat (Dermo ET) - La nivel de keratinocit uman normal, limita de citotoxicitate este de 1/480 Dermo-ET.

6.2. ACȚIUNEA UNOR COMPUȘI OBȚINUȚI DIN *TRIGONELLA FOENUMGRAECUM* ȘI *TRIFOLIUM PRATENSE* ASUPRA STATUSULUI PROLIFERATIV CELULAR AL FIBROBLAȘTILOR DERMICI ÎN CONDIȚII NORMALE DE CULTIVARE PRECUM ȘI ÎN DEPLEȚIE ESTROGENICĂ; CORELAȚII CU MODULAREA CALCIULUI INTRACELULAR

Efectul s-a evidențiat pe culturi de fibroblaști dermici umani (linie celulară selectivă pentru procesul urmărit), prin date complementare la nivelul sintezei de ADN și a succesiunii în procesul de diviziune a generațiilor proliferative. Cunoscut fiind rolul calciului în activarea unor însemnate căi metabolice și reglarea proceselor de diviziune celulară, o parte din experimente au cuprins și determinări de calciu intracelular, în scopul evidențierii unor posibile mecanisme de acțiune ale principiilor active studiate.

S-a analizat statusul proliferativ celular prin tehnici complementare de analiză și anume: secvențialitatea ciclului celular și succesiunea generațiilor proliferative (citometrie în flux, marcarea cu iodură de propidiu și respectiv CFSE - carboxy fluorescein diacetat succinimid ester), corelate și cu determinarea influenței asupra sintezei de collagen și a activității metaloproteinazelor.

Rezultatele s-au estimat ca Indice de Proliferare, respectiv suma procentelor de celule în fazele de multiplicare S și G2/M. calculate cu un soft de analiză specific (FACS Express V3 modulul DNA cell cycle și proliferare).

Datele experimentale (5 experimente succesive) demonstrează faptul că atât proliferarea celulară cât și secvențialitatea ciclului celular sunt reglate la nivelul receptorilor de estrogen, capacitatea proliferativă

scăzând în condițiile depleției acestor hormoni și amplificându-se sub acțiunea echivalentului sintetic β -estradiolul.

Bazându-ne pe aceste observații am verificat efectul compușilor la 48h. de acțiune, pe 2 serii experimentale cu / fără estrogen, având ca martor pozitiv pentru acțiunea estrogenică 17- β -estradiolul.

Extractul de trifoi, Dermo ET izolat din *Herba Trifolium pratense*, conține ca principii active daidzeina, genisteina, formononetina și biochanina A, astfel că în demonstrarea acțiunii sale s-a evaluat comparativ și activitatea acestor componente, precum și a combinației lor în dozele corespunzătoare extractului de trifoi.

În tabelele de mai jos prezintă acțiunea compușilor asupra liniilor celulare standardizate de fibroblaști umani normali (HS 27), comparativ cu martorul pozitiv (β estradiolul 1nM).

Tabelul 1 Impactul Dermo-ET asupra capacității proliferative a fibroblaștilor dermici.

	mediu cu conținut normal de estrogeni				mediu fără estrogeni			
	%faza S+G2/M	% de variație	Indice proliferare	% de variație	%faza S+G2/M	% de variație	Indice proliferare	% de variație
MARTOR	23,5		3,5		18,5		2,4	
Martor solvent	27,7		3,0		19,5		2,6	
Dermo ET 1/1000	28,9	23,0	4,2	19,4	25,7	39,1	4,3	79,2
Dermo ET 1/2000	25,3	7,8	4,2	18,6	25,1	35,6	3,9	62,5
Formononetin echivalent Dermo ET1/2000	49,7	111,5	2,8	-19,4	44,2	138,9	3,5	45,0
Formononetin echivalent Dermo ET 1/1000	48,4	106,0	3,2	-8,0	47,6	157,3	6,0	149,2
Biochanina echivalent Dermo ET 1/2000	51,3	118,3	2,4	-32,0	48,7	163,2	3,8	56,3
Biochanina echivalent Dermo ET 1/1000	47,2	100,9	3,9	10,6	47,3	155,7	6,0	150,8
Genisteina echivalent Dermo ET 1/2000	29,4	25,1	3,8	9,1	30,0	62,2	4,0	67,9
Genisteina echivalent Dermo ET 1/1000	17,4	-25,9	3,3	-5,4	23,1	25,0	3,8	58,3
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/2000	46,1	96,2	2,6	-24,6	51,6	178,9	4,1	71,7
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/1000	27,8	18,3	3,5	-0,6	44,5	140,5	4,1	71,7
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/1000	56,1	138,7	5,4	53,4	50,6	173,5	3,5	45,8
(Daidzeina+Genisteina+Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/2000	54,0	129,8	5,1	45,1	48,8	163,8	3,6	49,6
17 β estradiol 1nM	53,6	128,1	3,48	-0,6	54,6	195,1	4,11	71,3

Fitoprodusul Dermo-ET stimulează rata de proliferare celulară a fibroblaștilor atât în condiții normale de dezvoltare celulară, cât și în condiții de depleție estrogenică, similar cu estrogenul sintetic, β -estradiolul. Efectul estrogen- mimetic este demonstrat de fiecare component al amestecului de izoflavone, în special de daidzeina, formononetin și biochanina în ceea ce privește rata de sinteză ADN și inițierea mitozei în cadrul ciclului de diviziune celulară.

Activitatea de transport transmembranar s-a verificat prin acțiunea ionoforului A 23187 care deschide canalele de calciu și asigură un influx al ionilor de la exterior la interiorul celulei, în cazul unei concentrații superioare în mediul extracelular, respectiv o scădere a concentrației de calciu intracelular în cazul în care mediul extern al celulei este mai sărac în ioni de calciu în comparație cu cel intracitoplasmatic.

Tabelul 2 Modularea calciului intracelular (exprimată prin mediana canalului de emisie fluorescență FITC-A) sub influența compușilor izolați din *Trifolium pratense* în medii de cultură cu conținut estrogenic diferit

	mediu de cultură fără estrogeni		mediu de cultură cu estrogeni	
	FITC-A fără ionofor	FITC-A cu ionofor	FITC-A fără ionofor	FITC -A cu ionofor
Martor celular	112	187	285	392
Martor solvent	113	181	278	397
DERMO ET 1/1000	222	318	298	481
DERMO ET 1/2000	140	219	303	421
Genisteina+Daidzeina +Biochanina+Formononetin echiv. DERMOT 1/1000	170	289	258	302
Genisteina+Daidzeina +Biochanina+Formononetin echiv. DERMOT 1/2000	132	254	347	403
17 β estradiol	306	455	180	381

Nivelul de calciu intracelular bazal al fibroblastului este inferior concentrației din mediul extracelular experimental, efectul ionoforului fiind acela de a crea un influx de calciu de la exterior la interior. Experimentele realizate la 48h au demonstrat o creștere masivă a calciului intracelular indusă de **DERMO ET 1/1000**, compus care accelerează și proliferarea celulară a fibroblaștilor umani testați. S-a demonstrat astfel acțiunea complexă a Dermo-ET, de tip estrogen mimetic, cu îmbunătățirea capacității proliferative a fibroblaștilor dermici utilizând calciul ca mesager secundar de declanșare și susținere a acestui proces. Ionoforul A23187 potențează acumularea de calciu intracelular prin activarea unui flux din mediul extracelular, completând mobilizarea acestui ion din compartimentele intracelulare și / sau influxul indus de Dermo-ET (Cerere de brevet de invenție A00688, 2012).

Testarea compușilor Dermo-Ska și Dermo-Dis din *Trigonella foenumgraecum*

S-a analizat statusul proliferativ celular pentru **Dermo-Ska și Dermo-Dis**, prin tehnici complementare de analiză precum secvențialitatea ciclului celular și succesiunea generațiilor proliferative (citometrie în flux, marcarea cu iodură de propidiu și respectiv CFSE - carboxy fluorescein diacetat succinimidil ester), corelate în cazul **Dermo-Dis** și cu determinarea influenței asupra sintezei de collagen și a activității metaloproteinazelor. Rezultatele s-au estimat ca **Indice de Proliferare**, respectiv suma procentelor de celule în fazele de multiplicare S și G2/M, calculate cu un soft de analiză specific (FACS Express V3 modulul DNA cell cycle și proliferare).

Tabelul 3 Efectul compușilor asupra capacității proliferative a liniei celulare HS 27 (fibroblaști dermici umani normali)

	mediu de cultură cu nivel estrogenic normal				mediu de cultură fără estrogeni			
	% S+ % G2/M	% variație (%S+G2/M)	I.P.	% variație IP	%S+ %G2/M	% variație (%S+G2/ M)	I.P.	% variație IP
Celular control	26,73		3,04		24		2,82	
Solvent control	25,86	-3,25	3,27	7,57	35,8	49,17	2,85	1,06
Dermo-Dis 1nM	29,9	11,86	4,11	25,69	42,3	76,25	2,83	-0,70
Dermo-Dis 5nM	32,11	20,13	4,39	44,41	43,7	82,08	2,89	1,40
Dermo-Dis 10nM	30,7	14,85	3,05	0,33	55	129,17	4,62	62,11
Dermo Ska 1/8000	30,79	19,06	5,17	58,10	49,8	39,11	3,86	35,44
Dermo Ska	29,71	14,89	3,01	-7,95	28,86	-19,39	4,47	56,84

1/16000								
Dermo Ska 1/32000	27,83	7,62	3,18	-2,75	28,03	-21,70	2,19	-23,16
Dermo Sks 1/64000	26,24	-1,83	3,2	5,26	25,37	-29,13	2,72	-4,56
Dermo Sks 1/32000	25,51	-4,56	3,16	3,95	27,9	-22,07	2,6	-8,77
Dermo Sks 1/16000	25,8	-3,48	3,06	0,66	28,8	-19,55	2,4	-15,79
β estradiol 1nM	32,11	20,13	3,24	-0,92	35,61	48,38	3,91	38,65

Dermo-Dis 10nM și Dermo-Ska 1/8000 stimulează rata de proliferare celulară în condiții de depleție estrogenică la nivel de keratinocit, similar cu estrogenul sintetic, β-estradiolul. La nivel de fibroblast, efectul estrogen- mimetic se menține atât pentru **Dermo-Dis** (5nM și 10 nM), cât și pentru **Dermo-Ska** (1/8000 și 1/16000), cele două principii active demonstrând o acțiune concertată la nivelul receptorilor de estrogeni din piele, similară cu produșii de sinteză (β estradiolul). Extractul de *Trigonella foenumgraecum*, **Dermo-Sks**, conținând saponina steroidică nehidrolizată, nu influențează activitatea proliferativă în condiții de depleție estrogenică, susținând ipoteza acțiunii estrogen-mimetice a agliconului steroidic (Dermo-Dis) și a extractului care îl conține (Dermo – Ska) prin legarea la receptorii estrogenici ai fibroblaștilor (Cerere de brevet de invenție 00482, 2012).

Evaluarea nivelului de calciu intracelular și a influxului acestui ion în condițiile de acțiune a compușilor cu activitate estrogen mimetică, **Dermo-Ska** și **Dermo-Sks** este prezentată în fig. 51 și tabelul 6, ca rezultat al experimentării în condiții similare cu cele descrise pentru acțiunea compușilor din *Trifolium pratense* (fibroblaști aderați 48h, tratați 48h cu substanțele de interes, apoi marcate cu fluoroforul FLUO 4 cu emisie în coordonate FITC-A; achiziție și analiză prin citometrie în flux).

Tabelul 4 Modularea calciului intracelular (exprimată prin mediana canalului de emisie fluorescența FITC-A) sub influența compușilor izolați din *Trigonella foenumgraecum* în medii de cultură cu conținut estrogenic diferit.

	mediu de cultură fără estrogeni		mediu de cultură cu estrogeni	
	FITC-A fără ionofor	FITC-A cu ionofor	FITC-A fără ionofor	FITC -A cu ionofor
Martor	112	187	285	392
PG	113	181	278	397
DERMO Ska 1/8000	172	228	363	429
DERMO Ska 1/16000	166	201	257	402
Dermo-Dis 1nM	168	211	349	415
Dermo-Dis 5nM	154	289	243	385
17 β estradiol	306	455	180	381

Atât **Dermo-Dis**, cât și extractul care conține acest aglicon steroidic, **Dermo-Ska**, acționează în sensul creșterii concentrației intracelulare de calciu, atât prin fluxul din mediul extracelular, cât și prin mobilizarea depozitelor intracelulare. **Dermo-Dis** 1nM și **Dermo-Ska** 1/8000 potentează activitatea ionoforului A23187 în mediu de cultură cu nivel estrogenic normal, în cazul depleției estrogenice însă, **Dermo-Dis** 5nM este cel mai activ compus în accelerarea fluxului de ioni de calciu din mediul extracelular în cel intracelular. Putem spune deci că activarea proliferării celulare, mai ales în condiții de depleție estrogenică este realizată de **Dermo-Dis** și extractul echivalent **Dermo-Ska** prin căi de semnalizare ce implică și activarea canalelor de calciu și implicarea acestuia ca mesager secundar.

6.3. MODULAREA MOLECULELOR – SEMNAL IMPLICATE ÎN FERMITATEA ȚESUTULUI CUTANAT (INTEGRINE $\alpha 1\beta 1$ ȘI $\alpha 2\beta 1$, TGF- β) DE CĂTRE COMPUȘI IZOLAȚI DIN *Trigonella foenumgraecum* ȘI *Trifolium pratense*

6.3.1. Stimularea secreției de TGF β , modulator al echilibrului între sinteza de collagen și activitatea metaloproteinazelor din matrixul extracelular

În cadrul studiilor în condiții de depleție estrogenică, s-a testat și capacitatea anumitor principii active de a modula secreția în mediul extracelular a TGF- β , în scopul stabilirii mecanismului de acțiune al compușilor activi asupra biosintezei collagenului (DUMITRIU et al., 2013). Alegerea acestor compuși s-a făcut pe baza rezultatelor anterioare pozitive privind acțiunea de tip estrogen mimetică a extractului de trifoi roșu **Dermo-ET** prin synergismul componentelor sale de tip izoflavonic, precum și a agliconului steroidic **Dermo-Dis** și a extractului din *Trigonella foenumgraecum* ce are în componența acest aglicon (**Dermo-Ska**). Astfel au fost testați:

- Dermo-ET** din *Trifolium pratense*, comparativ cu izoflavonele componente, daidzeina, genisteina, biochanina și formononetin.
- Dermo-Dis** și **Dermo-Ska** din *Trigonella foenumgraecum*
Rezultatele, exprimate în ng/ml TGF- β , sunt prezentate în tabelele 7 și 8.

a) **Dermo-ET** din *Trifolium pratense*.

Tabelul 5 Evaluarea secreției de TGF- β în medii de cultură cu conținut estrogenic diferit

	Mediu cu nivel estrogenic normal		Mediu fără estrogeni	
	TGF beta (ng/ml)	% variație	TGF beta (ng/ml)	% variație
Martor	1420,8		1411,74	
PG	1435,37		1345,37	
Dermo-ET 1/1000	1441,96	7,2	1588,01	18,1
Dermo-ET 1/2000	1339,34	-0,4	1213,06	-9,8
Daidzeina Dermo-ET 1/1000	1417,78	5,4	1448,01	7,7
Daidzeina Dermo-ET 1/2000	1231,06	-8,5	1460,11	8,6
Genisteina Dermo-ET 1/1000	1387,59	3,2	1788,6	33,0
Genisteina Dermo-ET 1/2000	1441,96	7,2	1472,21	9,5
Biochanina Dermo-ET 1/1000	1363,46	1,4	1417,78	5,4
Biochanina Dermo-ET 1/2000	1270,12	-5,6	1407,33	4,6
Formononetin Dermo-ET 1/1000	1405,7	4,5	1666,51	23,9
Formononetin Dermo-ET 1/2000	1387,59	3,2	1764,14	31,2
(D+G+B+F) echiv Dermo-ET 1/1000	1429,87	6,3	1675,65	24,6
(D+G+B+F) echiv Dermo-ET 1/2000	1484,32	10,4	1563,13	16,2
β estradiol 1nM	1605,66	19,4	1535,83	14,2

Fitoprodusul **Dermo-ET** stimulează rata de proliferare celulară a fibroblaștilor atât în condiții normale de dezvoltare celulară, cât și în condiții de depleție estrogenică, similar cu estrogenul sintetic, β -estradiolul. În ceea ce privește sinteza de TGF- β , β estradiolul acționează nespecific, în sensul stimulării secreției acestei proteine, ceea ce poate duce la fibroză prin formarea unor depozite de collagen necontrolate. În schimb, **Dermo-ET** acționează specific, doar în depleția estrogenică, atunci când scade și sinteza de collagen, asigurând suportul proteic structural. Efectul estrogen- mimetic este demonstrat de fiecare component al amestecului de izoflavone, în special de genisteină și formononetin în refacerea secreției de TGF- β , proteină reglatoare a formării collagenului.

b) Efectul Dermo-Dis și al Dermo-Ska din *Trigonella foenumgraecum* asupra secreției de TGF- β .

Tabelul 6 Evaluarea secreției de TGF beta în medii de cultura cu conținut estrogenic diferit

	Mediu cu nivel estrogenic normal		Mediu fără estrogeni	
	TGF- β (ng / ml)	% variație	TGF- β (ng / ml)	% variație
Martor	105,62		92,52	
Martor solvent	104,54		91,22	
Dermo-Dis 1nM	148,02	95,5	118,68	28,2
Dermo-Dis 0,5nM	241,01	218,3	191,21	106,6
Dermo-Ska 1/8000	257,8	144,08	204,8	121,3
Dermo-Ska 1/16000	186,5	76,6	164,4	77,7
17 β estradiol 1nM	208,51	175,4	168,51	82,1

Dermo-Dis în special la cea mai mică doză testată (0,5nM), precum și extractul care conține acest aglicon steroidic (**Dermo-Ska**) stimulează secreția de TGF- β , efect corelat și cu amplificarea proliferării celulare demonstrate la punctul 6.2. Efectul este nespecific, asemănător 17 β estradiolului, direcționând procesul de sinteză de collagen, chiar când necesitățile la nivel dermic nu o impun (condiții normale de cultivare), în această situație putând apărea fibroze. În cazul depleției estrogenice, efectul asupra secreției de TGF- β este de stimulare a acestei proteine reglatoare, benefic în refacerea structurilor proteice ale matrixului extracelular degradat.

6.3.2. Integrine $\alpha 1\beta 1$ și $\alpha 2\beta 1$

Rezultatele obținute în urmă a trei experimente succesive, au fost centralizate în funcție de principiile active testate, în tabele 9 și 10, respectiv fig. 52.

a) Efectul Biocomplexelor cu conținut variabil de izoflavone (Dermo-ET)

Tabelul 7: Expresia integrinelor $\alpha 1\beta 1$ și $\alpha 2\beta 1$ indusa de Dermo-ET.

	FITC-A Mean (CD 49b - Integrina $\alpha 2$)	% de variație	PE-A Mean (CD 49a - Integrina $\alpha 1$)	% de variație	APC-A Mean (CD 29 - Integrin $\alpha \beta 1$)	% de variație
MARTOR	14448		5837		4167	
PG	15122	4,67	6330	8,45	4984	19,61
TGF-β 4ng/ml	44217	206,04	7005	20,01	8123	94,94
Dermo ET 1/1000	29921	107,09	4851	-16,89	3719	-10,75
Dermo ET 1/2000	25796	78,54	4092	-29,90	4314	3,53
Formononetin echivalent Dermo ET1/1000	14313	-0,93	3193	-45,30	2748	-34,05
Biochanina echivalent Dermo ET 1/1000	24491	69,51	3220	-44,83	3594	-13,75
Genisteina echivalent Dermo ET 1/1000	23269	61,05	3834	-34,32	4448	6,74
Daidzeina echivalent Dermo ET 1/1000	18954	31,19	3797	-34,95	3597	-13,68
(Daidzeina+Genisteina +Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/1000	27371	89,44	6830	17,01	5308	27,38
(Daidzeina+Genisteina +Biochanina+Formononetin) echivalent Dermo ET 1/2000	13679	-5,32	6726	15,23	5489	31,73

Testele au evidențiat acțiunea extractului selectiv din *Herba Trifolium pratense*, **Dermo-ET**, în maniera doză–efect, doar asupra inducerii supraexpresiei lanțului glicoproteic $\alpha 2$, ceea ce indică o amplificare a legăturilor fibroblast – collagen de tip I și stimularea activității collagenazei cu rol în fibrilogeneza. S-a demonstrat faptul că această acțiune este dată în principal de biochanina și genisteina din componența extractului, și într-o mai mică măsură de daidzeina, formononetinul neacionând la acest nivel. Efectul determinat este similar cu cel al martorului pozitiv (TGF- β 4ng/ml).

b) Biocomplexe cu conținut ridicat de compuși steroidici:saponine sau agliconi (Dermo SK-a, Dermo SK-s și Dermo-Dis) și compuși de tip polizaharidic (galactomanani- Dermo –Gal) izolate din *Trigonella foenumgraecum*

Tabelul 8 Expresia lanțurilor de integrine indusa de compuși din *Trigonella foenumgraecum*

	FITC-A Mean (CD 49b - $\alpha 2$ Integrine)	% de variație	PE-A Mean (CD 49a - $\alpha 1$ Integrine)	% de variație	APC-A Mean (CD 29 - $\beta 1$ Integrine)	% de variație
Martor celular	14227,67		5310,67		4077,33	
Martor de solvent	14526,33	2,10	5490	3,39	4170,33	2,28
TGF-β 4ng/ml	46264	225,18	7005	31,92	8123	99,22
Dermo Dis 5nM	16703	17,40	4433,33	-16,51	5025,33	23,25
Dermo Dis 10nM	23169	62,85	5601,33	5,49	5922,33	45,25
Dermo Ska 1/8000	24289,33	70,73	6088,67	14,66	5411,67	32,73
Dermo Ska 1/16000	22641,67	59,15	5345,67	0,67	5887,67	44,40
Dermo Sks 1/35000	10787	-24,18	4182	-21,24	3842	-5,77
Dermo Sks 1/50000	34526,5	142,68	7461,5	40,52	4456	9,29
Dermo Sks 1/60000	47230	231,97	7424	39,81	3718,5	-8,80

Dermo-Ska induce preponderent expresia lanțului glicoproteic $\alpha 2$, iar **Dermo-Sks** este cel mai activ dintre compușii analizați în supraexpresia lanțurilor $\alpha 1$ și $\alpha 2$, cu efect superior chiar și martorului pozitiv (TGF- β 4ng/ml). Astfel, se recomandă utilizarea acestor preparate ca ingrediente activi în restabilirea fermității țesutului cutanat prin consolidarea legăturilor celulă dermică – matrix extracelular.

6.4. ACTIVITATEA ANTIINFLAMATOARE LA NIVEL DE ENDOTELIU VASCULAR A UNOR FITOCOMPUSI din *Aesculus hippocastanum* , *Hedera helix* și *Trigonella foenumgraecum*

Scopul experimentelor derulate a fost **determinarea efectului antiinflamator la nivel vascular** cu următoarele aplicații:

- **în cadrul efectului antiageing – anti-foto-îmbătrânire**, în procesul de combatere a inflamației și cicatrizare a leziunilor provocate de radiația UV ;
- **în cadrul efectului antiacneic**, cunoscută fiind infecția bacteriană și inflamația în zonele afectate;
- **în cadrul efectului antiedematos și de tonifiere vasculară.**

Modelele experimentale utilizate au constat în analiza următorilor parametri funcționali:

I. Evaluarea inhibării adeziunii monocite – endoteliu prin studii de citometrie în flux ale expresiei proteice a VCAM-1 și ICAM-1;

II. Evaluarea prin citometrie în flux a eliberării extracelulare de citokine pro-inflamatorii de

către celulele endoteliale stimulate;

III. Evidențierea expresiei factorului pro-angiogenic VEGF.

S-au realizat 5 experimente succesive care au stat la baza stabilirii condițiilor relevante de stimulare și a efectelor la nivel vascular a următorilor compuși:

a) **biocomplexe cu conținut ridicat de saponine triterpenice DERMO-Es din *Aesculus hippocastanum* și DERMO-Hdc din *Hedera helix*.**

b) **biocomplexe cu conținut ridicat de compuși steroidici: saponine sau agliconi (Dermo SK-s, și Dermo-Dis) izolate din *Trigonella foenumgraecum***

Evaluările s-au făcut comparativ cu un **martor pozitiv de Dexamethazona**, un agent antiinflamator cunoscut, în concentrație de 0,6μg/ml (HETTMANNSPERGER et al., 1992; WENCHIEH et al., 2002).

Sistemele experimentale utilizate au constat în stimularea diferențiată a celulelor endoteliale cu LPS, lipopolizaharid ce mimează infecția bacteriană, respectiv cu TNF-α- stimul nespecific pentru inflamația sistemică. LPS este o componentă majoră a bacteriilor gram negative ce acționează ca endotoxina la nivel de organism animal, inducând un puternic răspuns imun și producând secreția citokinelor pro-inflamatorii. TNF-α face parte din grupul citokinelor care stimulează reacția de inflamație de faza acută. Pentru stabilirea timpului de incubare și a dozelor optime de stimul pentru linia celulară HUVEC, s-au testat mai multe variante, având ca punct de plecare datele de literatură relevante pentru expresia moleculelor de adeziune și a citokinelor inflamatorii (DUMITRIU et al., 2013). În cele ce urmează vom prezenta o selecție de rezultate obținute pentru principalele tipuri de efecte urmărite:

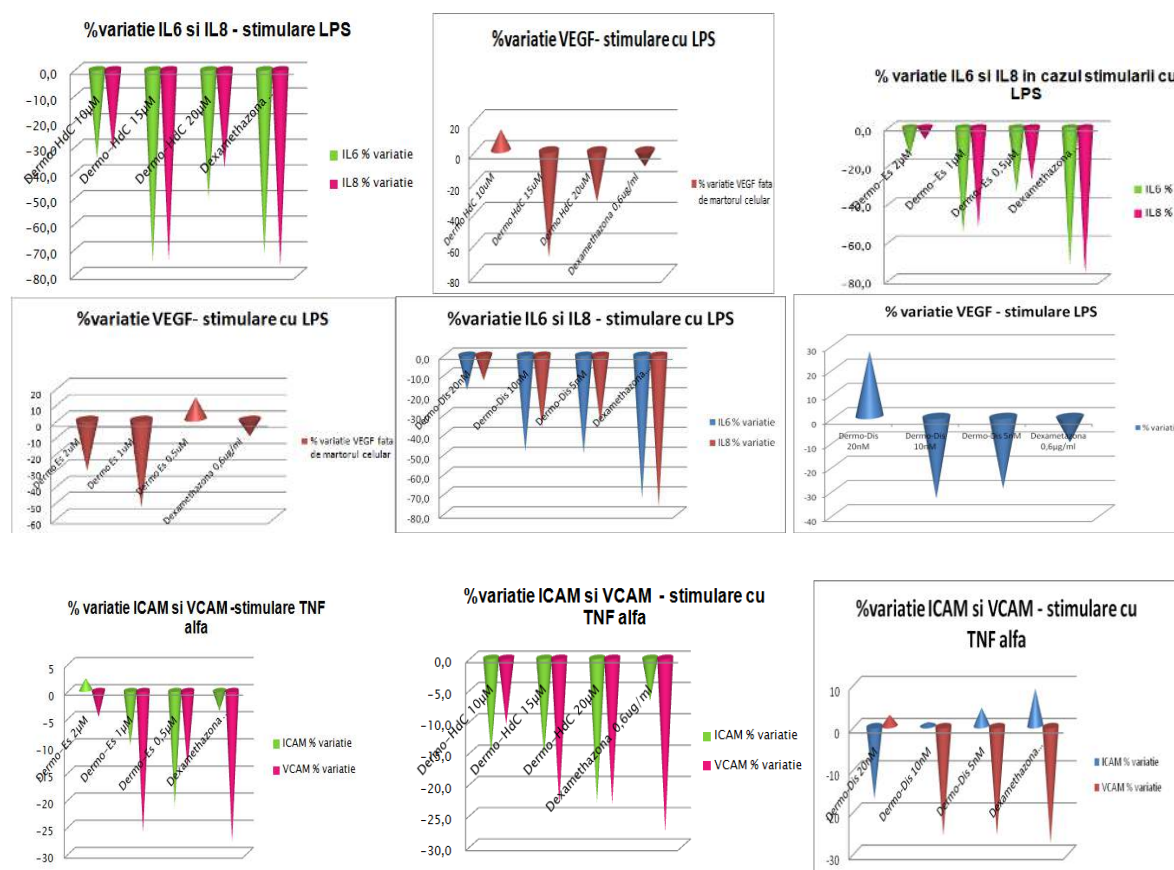


Figura1:Selecție a rezultatelor ce demonstrează efectul antiinflamator vascular al Dermo-HdC, Dermo-Es și Dermo-Dis

Pe baza datelor experimentale obținute, se poate realiza următoarea configurație privind activitatea anti-

inflamatoare a compușilor **Dermo-Es**, **Dermo-HdC** și **Dermo-Dis** (cu + simbolizăm efectul pozitiv, în sensul stopării inflamației pe calea de semnalizare celulară investigată, - reprezintă absența unei activități semnificative).

Tabelul 9 Acțiunea anti-inflamatoare a compușilor Dermo-Es, Dermo-HdC și Dermo-Dis

Compus bioactiv// parametru celular	Stimulare cu LPS (inflamație de origine bacteriană)			Stimulare cu TNF α (inflamație sistemică, de diferite etiologii)		
	Molecule de de adeziune (ICAM)	Citokine pro-inflamatorii IL6 și IL8	Permeabilitate vasculară (VEFG)	Molecule de de adeziune (ICAM și VCAM)	Citokine pro-inflamatorii IL6 și IL8	Permeabilitate vasculară (VEFG)
Dermo-Es	-	+	+	+	+	-
Dermo-HdC	-	+	+	+	+	+
Dermo-Dis	+	+	+	+	+	+

Se constată o acțiune diferențiată a compușilor, dependentă atât de doză utilizată, cât și de calea de semnalizare celulară investigată. Astfel, în cadrul screeningului *in vitro* privind efectul antiinflamator se impune examinarea unor procese celulare diferite, convergente către aceeași țintă terapeutică. Inhibiția ambelor tipuri de citokine (IL6 și IL8) reprezintă un efect sinergic atât asupra blocării procesului de activare a neutrofilelor (care include eliberarea granulelor enzimaticice ce degradează țesutul conex), cât și asupra stopării progresiei inflamației de la nivel acut la cronic. Acest proces este însoțit și de inhibiția VEGF corelată cu scăderea permeabilității vasculare și reducerea edemelor, precum și de normalizarea supra-expresiei moleculelor de adeziune monocite-endoteliiu (ICAM și VCAM) declanșată ca unul din primele răspunsuri la stimularea proinflamatorie endotelială.

Inflamația generată de stimuli bacterieni este inhibată de acțiunea ambilor compuși prin blocarea secreției de citokine IL6 și IL8 și a factorului pro-angiogenic VEGF, ceea ce implică stoparea cascadei extracelulare de semnalizare pro-inflamatorie și reducerea permeabilității vasculare. În acest tip neparticular de inflamație, acțiunea **Dermo Es** și **Dermo-HdC** asupra expresiei moleculelor de adeziune nu este semnificativă (% variație sub 10%). În cadrul stimulării cu TNF- α , s-a demonstrat un efect concertat la nivelul inhibiției secreției citokinelor IL6 și IL8, a expresiei ICAM și VCAM precum și de reducere a factorului VEGF pentru **Dermo-HdC** în maniera doză-efect. **Dermo-Es** acționează doar pe două din cele trei cai de semnalizare investigate, asupra inhibiției IL6 și IL8 și a reducerii expresiei ICAM și VCAM.

Dermo-Dis are efect antiinflamator la nivel vascular, inhibă secreția de citokine pro-inflamatorii IL6 și IL8 în condițiile stimulării nespecifice cu TNF- α , inhibă expresia moleculei de adeziune *ICAM* (unul din primele procese ce au loc la inițierea inflamației).

Dozele active sunt cuprinse între 5nM și 20nM. De asemenea, acționează în condiții bazale (nestimulare) la nivelul inițierii angiogenezei vasculare (importantă în cicatrizare) – crește expresia VEGF (vascular endothelial growth factor – promotor de angiogeneză) în mediul extracelular. În condiții de stimulare nespecifică inhiba VEGF, acționând în sensul reducerii angiogenezei și a permeabilizării vasculare.

Pe lângă aplicațiile la nivel de țesut cutanat, ulceratii venoase, procesul de vindecare a rănilor, există și patologii importante, cum ar fi ateroscleroza, inflamația și cancerul care sunt asociate cu activarea excesivă sau anomalii funcționale ale celulelor endoteliale. Astfel, rezultatele pot sta la baza explicării unor mecanisme de acțiune și utilizare terapeutică în sfera inflamației vasculare (cerere brevet invenție A00618, 2012).

6.5 PROTECȚIE CELULARĂ CUMULATĂ FAȚĂ DE RADIAȚIA UV INDUSĂ DE EXTRACTE VEGETALE DIN *TRIFOLIUM PRATENSE*, *TRIGONELLA FOENUMGRAECUM*, *TRITICUM AESTIVUM*, *MEDICAGO SATIVA* ȘI *CRATAEGUS MONOGYNA*.

În cadrul studiilor privind patogeneza foto-îmbătrânirii au fost analizați următorii parametrii celulari cu relevanță în mecanismele care stau la baza protecției față de radiația UV, așa cum s-a menționat în Capitolul 1.5. :

- A. Apoptoza celulară
- B. Perturbări ale secvențialității ciclului celular
- C. Stres oxidativ: apa oxigenată și anion superoxid eliberate intracelular
- D. Inflamație: citokine pro-inflamatorii IL6 și IL8 ; IL1 alfa
- E. Angiogeneza: factorul VEGF

Celule au fost aderente 24h, pretratate cu substanțele-test 24h, iradiate cu doze specifice, apoi cultivate încă 16h în prezența substanțelor. Iradierea s-a realizat în condiții reproductibile cu un echipament de iradiere controlată: sistem Bio-Sun (producător Vilber-Lourmet).

În vederea stabilirii unor condiții experimentale optime pentru modularea mecanismelor celulare sub influența radiației UV au fost necesare experimente preliminare care au dus la selectarea dozelor și timpilor de iradiere relevante pentru evidențierea efectelor fotoprotectoare (DUMITRIU et al., 2013).

S-a realizat un sistem experimental alcătuit din serii experimentale, după cum urmează:

- Seria I: celule neiradiate (lotul martor)
- Seria II: iradiere UV-A
- Seria III: iradiere UV-B

Se prezintă o selecție a rezultatelor semnificative privind protecția față de radiația UV indusă de compușii bioactivi testați :

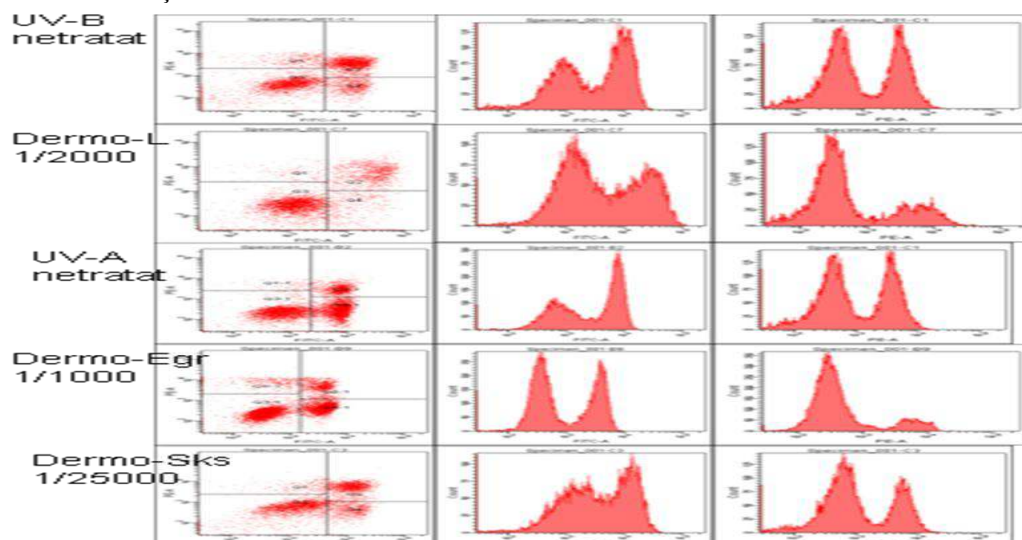
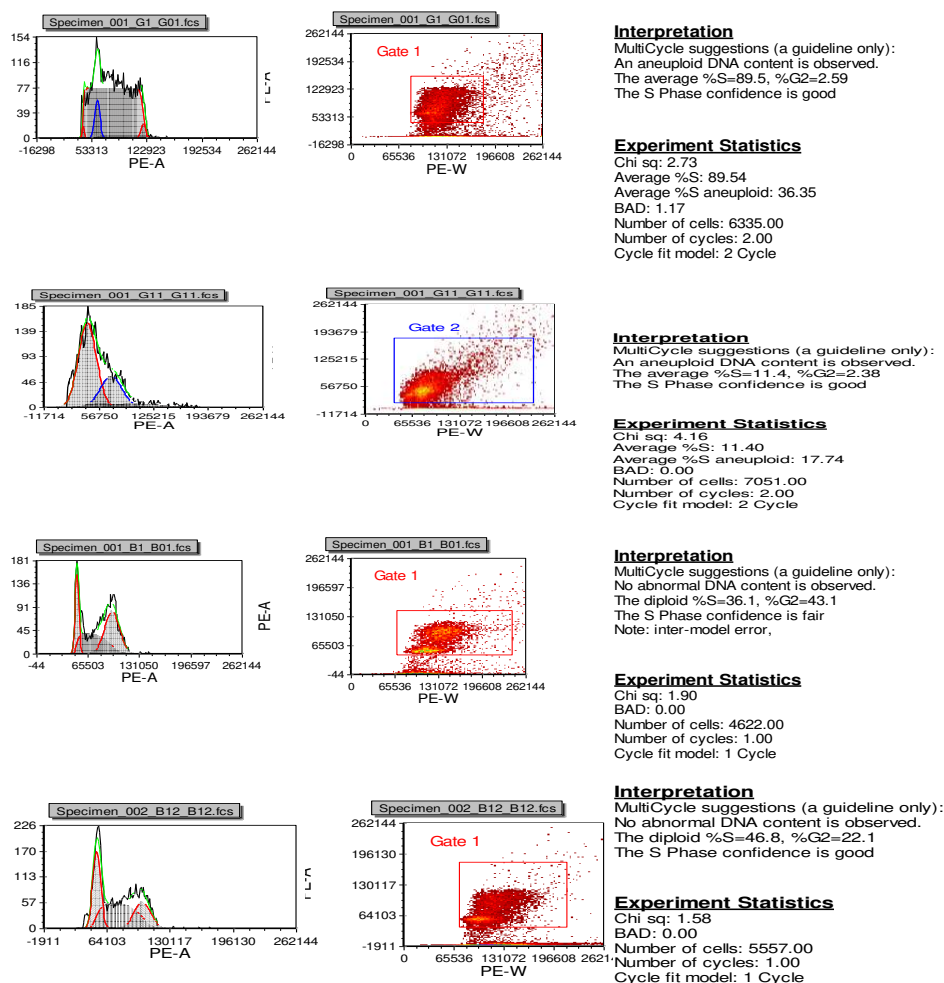


Figura 2 Diagrame de citometrie în flux reprezentând protecția față de apoptoză indusă diferențiat de compușii testați.



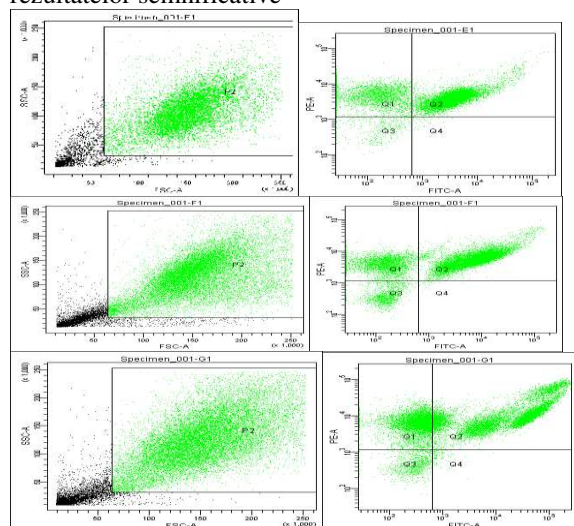
Celule iradiate
UV-B

Celule iradiate
UV-B tratate
cu Dermo-P

iradiere UV-A

iradiere UV-A
–celule tratate
cu Dermo-P

Figura 3 Efectul diferențiat al biocompusului (Dermo-P) asupra progresiei ciclului celular – selecție a rezultatelor semnificative



A. martor neiradiat

B. iradiere UV-A

C. iradiere UV-B

Figura 4 Diagrame de citometrie în flux reprezentând eliberarea intracelulară a speciilor reactive de oxigen în funcție de tipul de radiație UV. Se remarcă amplificarea producerii de apă oxigenată (apariția mai multor subpopulații celulare marcate în coordonate FITC-A) în special în condițiile iradierii UV-B.

Pentru prezentarea sintetică a screeningului efectuat asupra principalelor căi de semnalizare ca răspuns la radiația UV, precum și a efectelor cumulative ale compușilor bioactivi analizați, datele obținute se prezintă în tabelul 10.

Tabelul 10 Efectul protector față de radiația UV al compușilor bioactivi testați, particularizat pe principalele mecanisme de acțiune

Substanța testată / Efect biologic	Iradieră UV-A						Iradieră UV-B					
	Protecție față de apoptoză	Normalizarea secvențialității ciclului celular	Inhibiție IL1 α	Inhibiție VEGF	Inhibiție IL6 / IL8/IL10 / TNF α	Inhibiție Stres oxidativ (H ₂ O ₂ și O ₂ ⁻)	Protecție față de apoptoză	Normalizarea secvențialității ciclului celular	Inhibiție IL1 α	Inhibiție VEGF	Inhibiție IL6 / IL8/IL10 / TNF α	Inhibiție Stres oxidativ (H ₂ O ₂ și O ₂ ⁻)
Dermo-Ska	nu	nu	da	nu	da	da	nu	da	da	da	da	da
Dermo-Sks	da	da	da	nu	da	da	nu	da	nu	da	da	da
Dermo-L	Nu	da	nu	da	da	da	da	da	nu	nu	da	da
Dermo-Egr	da	da	nu	nu	nu	da	nu	da	da	da	nu	Da
Dermo-ET	da	da	Nu	da	da	Da	da	da	nu	nu	da	Da
Dermo-P	da	da	nu	da	da	da	nu	da	nu	nu	da	nu

Se constată un efect diferențiat al compușilor, în funcție de sursa vegetală utilizată ca materie primă, fiecare acționând asupra altor căi de propagare a degenerării și inflamației induse de iradierea UV:

- **Dermo-Sks** – efect protector față de radiația UV-A, deci agent anti-îmbătrânire efectiv, cu acțiune complexă atât la nivelul citokinelor inflamatorii și IL1 α , cât și protector față de inducerea apoptozei; în condițiile iradierii UV-B are doar efect de stopare a inflamației și anti-angiogenic, fără a influența apoptoza;
- **Dermo-Ska** - nu influențează inducerea apoptozei, dar are efect antiinflamator pe ambele tipuri de iradiere, completat în cazul UV-B și de efectul antiangiogenic
- **Dermo-Egr** – efect protector față de radiația UV-A în special, datorită acțiunilor complementare de protecție celulară față de inducerea apoptozei, respectiv antioxidantă și antiinflamatoare

- **Dermo-P** manifestă o puternică acțiune antioxidantă la nivel de radiație UV-A și UV-B, cu efect de reducere a speciilor reactive de oxigen, inhibiție de IL8 și normalizare a secvențialității ciclului celular. Aceste efecte sunt completate doar în cazul radiației UV-A de protecție celulară față de inducerea apoptozei și inhibiție de IL6 (DUMITRIU et al., 2012).
- **Extractul de trifoi, Dermo-ET** are efect de protecție celulară față de apoptoza indusă de radiația UV, de stopare a procesului inflamator declansat prin semnalizarea citokinelor IL6 și IL8, antioxidant puternic, acționând la nivel enzimatic, cu consecințe asupra reducerii intracelulare a speciilor reactive de oxigen, în special în condițiile iradierii UV-A.
- Fitocompusul **Dermo-L obținut din lucerna** previne apoptoza celulară, stopează progresia inflamației (efect antiirritativ – anti IL1 α ; antiinflamator- anti IL6 și IL8-) în cazul arsurilor solare (iradiere UV-B), inhibă factorul VEGF de progresie a angiogenezei în ambele situații de iradiere UV, acționează la nivelul enzimelor implicate în protecția oxidativă, cu consecințe asupra reducerii intracelulare a speciilor de oxigen reactive.

Complementaritatea mecanismelor de acțiune recomandă asocierea acestor preparate în vederea obținerii unei fotoprotecții efective.

CONCLUZII

Dezvoltarea accelerată a industriei dermatocosmetice și chiar apariția unei științe de graniță, dermatocosmetologia, impune redirecționarea cercetărilor din acest domeniu către aprofundarea unor mecanisme fiziologice de acțiune la nivel celular și molecular a ingredientilor în scopul definirii riguroase a efectelor țintă urmărite și a potențialelor interacțiuni între componentele active, cu impact asupra toxicității și acțiunii specifice ale viitoarelor produse.

Datele din literatură care au fundamentat dezvoltarea acestor studii evidențiază complexitatea proceselor celulare care stau la baza funcționalității țesutului cutanat, interdependența și stricta reglare a acestora, precum și tendințele cercetării de ultimă oră privind tratamentul activ la nivelul pielii bazat pe efecte riguros demonstrate ale unor compuși activi.

Contribuțiile personale în acest domeniu vizează **evidențierea la nivel de celulă și în anumite cazuri chiar de molecula semnal a modulării anumitor mecanisme fiziologice și perturbări datorate unor factori intrinseci (ex. depleția estrogenică) sau extrinseci (radiația UV, stimuli inflamatori), de către fitocompuși cu compoziție controlată** în substanțe active, izolați din flora indigenă, după cum urmează:

- a) Biocomplex cu *un total izoflavonoidic standardizat (minim 200 mg/100 mL)* **Dermo ET**, obținut din *Trifolium pratense*
- b) Biocomplex cu conținut ridicat de *componente polifenolice de tipul flavonoide, acizi polifenolcarboxilici și proantociani* (**Dermo P**), obținut din *Crataegus monogyna*
- c) Biocomplexe în conținutul cărora saponinele triterpenice se găsesc alături de *flavone, proantociani sau izoflavone*, **Dermo Egr – din Triticum aestivum și Dermo L din Medicago sativa**
- d) Biocomplexe cu conținut ridicat de *compuși steroidici: saponine sau agliconi* (**Dermo SK-a, Dermo SK-s și Dermo-Dis**) izolate din *Trigonella foenumgraecum*
- e) Biocomplexe cu conținut ridicat de *saponine triterpenice: DERMO-Es din Aesculus hippocastanum, DERMO-Hdc din Hedera helix*

Demonstrarea efectelor biologice ale extractelor vegetale s-a realizat la nivel de celulă țintă, pe linii

celulare standardizate relevante pentru mecanismul studiat.

- A. **Efectul de restructurare dermică (turn-over celular și restabilirea fermității țesutului cutanat)** s-a testat pe fibroblaști dermici umani (HS 27), principalul tip celular responsabil atât de sinteza proteinelor structurale din matricea extracelulară, sub strictă semnalizare a factorului TGF β , cât și de expresia integrinelor – molecule ce realizează adeziunea celulă – matrix proteic. A fost experimentat și mecanismul de acțiune estrogen-mimetic, depleția estrogenică fiind un proces conex important în îmbătrânire, cu impact considerabil la nivelul pielii.
- B. **Efectul fotoprotector** s-a demonstrat pe linia de keratinocite umane HaCaT, acest tip de celule formând epidermul, primul strat al țesutului cutanat, cu funcție de barieră față de acțiunea nocivă a radiației UV.
- C. **Efectul antiinflamator la nivel de endoteliu vascular** s-a evidențiat pe linia specifică HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) datorită relevanței acesteia în simularea procesului inflamator la nivel de vas sanguin
- A. **La nivel de dermă, respectiv de fibroblast**, că celula țintă reprezentativă, s-au evidențiat următoarele:
- Interdependența statusului proliferativ celular de aportul estrogenic și de influxul de calciu intracelular
 - Acțiunea complexă a **Dermo-ET**, de tip *estrogen mimetic*, cu îmbunătățirea capacității proliferative a fibroblaștilor dermici utilizând calciul ca mesager secundar de declanșare și susținere a acestui proces. Ionoforul A23187 potențează acumularea de calciu intracelular prin activarea unui flux din mediul extracelular, completând mobilizarea acestui ion din compartimentele intracelulare și / sau influxul indus de Dermo-ET. Efectul estrogen- mimetic este demonstrat de fiecare component al amestecului de izoflavone, în special de daidzeina, formononetin și biochanina în ceea ce privește rata de sinteză ADN și inițierea mitozei în cadrul ciclului de diviziune celulară.
 - Activarea proliferării celulare, mai ales în condiții de depleție estrogenică, realizată de **Dermo-Dis** și extractul echivalent **Dermo-Ska** prin căi de semnalizare ce implică și activarea canalelor de calciu și implicarea acestuia ca mesager secundar. **Dermo-Dis** 1nM și **Dermo-Ska** 1/8000 potențează activitatea ionoforului A23187 în mediu de cultură cu nivel estrogenic normal, în cazul depleției estrogenice însă, Dermo-Dis 5nM este cel mai activ compus în accelerarea fluxului de ioni de calciu din mediul extracelular în cel intracelular.
 - β -estradiolul acționează nespecific, în sensul stimulării secreției de TGF β , ceea ce poate duce la fibroză prin formarea unor depozite de collagen necontrolate. În schimb, **Dermo-ET acționează specific**, doar în depleția estrogenică, atunci când scade și sinteza de collagen, asigurând suportul proteic structural. Efectul estrogen- mimetic este demonstrat de fiecare component al amestecului de izoflavone, în special de genisteina și formononetin în refacerea secreției de TGF β , proteină reglatoare a formării collagenului. **Dermo-Dis** în special la cea mai mică doză testată (0,5nM), precum și extractul care conține acest aglicon steroidic (**Dermo-Ska**) stimulează secreția de TGF- β , efect corelat și cu amplificarea proliferării celulare. Efectul este nespecific, asemănător 17 β estradiolului, direcționând procesul de sinteză de collagen, chiar când necesitățile la nivel dermic nu o impun (condiții normale de cultivare), în această situație putând apărea fibroze. În cazul depleției estrogenice, efectul asupra secreției de TGF- β este de stimulare a acestei proteine reglatoare, benefic în refacerea structurilor proteice ale matrixului extracelular degradat.
 - Testele la nivel de expresie membranară a integrinelor au evidențiat acțiunea extractului selectiv din *Herba Trifolium pratense*, **Dermo ET**, în manieră doză–efect, doar asupra inducerii supraexpresiei lanțului glicoproteic α_2 , ceea ce indică o **amplificare a legăturilor fibroblast – collagen de tip I și stimularea activității collagenazei cu rol în fibrilogeneza**. S-a demonstrat faptul că această acțiune este dată în principal de biochanina și genisteina din componența extractului, și într-o mai mică măsură de daidzeina, formononetinul neacționând la acest nivel. Efectul determinat este similar cu cel al martorului pozitiv (TGF beta 4ng/ml). **Dermo-Ska** induce preponderent expresia

lanțului glicoproteic $\alpha 2$, iar **Dermo-Sks** este cel mai activ dintre compușii analizați în supraexpresia lanțurilor $\alpha 1$ și $\alpha 2$, cu efect superior chiar și martorului pozitiv (TGF- β 4ng/ml). Astfel, se recomandă utilizarea acestor preparate ca ingrediente activi în restabilirea fermității țesutului cutanat prin consolidarea legăturilor celulei dermice – matrix extracelular.

B. În cazul experimentărilor privind **acțiunea fotoprotectoare la nivel de keratinocit uman normal**, se constată un efect diferențiat al compușilor, în funcție de sursa vegetală utilizată ca materie primă, fiecare acționând asupra altor căi de propagare a degenerării și inflamației induse de iradierea UV:

- **Dermo-Sks** manifestă efect protector față de radiația UV-A, deci agent anti-îmbătrânire efectiv, cu acțiune complexă atât la nivelul citokinelor inflamatorii și IL1 α , cât și protector față de inducerea apoptozei; în condițiile iradierii UV-B are doar efect de stopare a inflamației și anti-angiogenic, fără a influența apoptoza
- **Dermo-Ska** nu influențează inducerea apoptozei, dar are efect antiinflamator pe ambele tipuri de iradiere, completat în cazul UV-B și de efectul antiangiogenic
- **Dermo-Egr** manifestă efect protector față de radiația UV-A în special, datorită acțiunilor complementare de protecție celulară față de inducerea apoptozei, respectiv antioxidantă și antiinflamatoare
- **Dermo-P** manifestă o puternică acțiune antioxidantă la nivel de radiație UV-A și UV-B, cu efect de reducere a speciilor de oxigen reactive, inhibiție de IL8 și normalizare a secvențialității ciclului celular. Aceste efecte sunt completate doar în cazul radiației UV-A de protecție celulară față de inducerea apoptozei și inhibiție de IL6.
- **Extractul de trifoi, Dermo-ET** are efect de protecție celulară față de apoptoza indusă de radiația UV, de stopare a procesului inflamator declanșat prin semnalizarea citokinelor IL6 și IL8, este un antioxidant puternic, acționând la nivel enzimatic, cu consecințe asupra reducerii intracelulare a speciilor reactive de oxigen, în special în condițiile iradierii UV-A.
- Fitocompusul **Dermo-L obținut din lucerna** previne apoptoza celulară, stopează progresia inflamației (efect antiiritativ – anti IL1 α ; antiinflamator- anti IL6 și IL8)- în cazul arsurilor solare (iradiere UV-B), inhibă factorul VEGF de progresie a angiogenezei în ambele situații de iradiere UV, acționează la nivelul enzimelor implicate în protecția oxidativă, cu consecințe asupra reducerii intracelulare a speciilor reactive de oxigen.

Complementaritatea mecanismelor de acțiune recomandă asocierea acestor preparate în vederea obținerii unei fotoprotecții efective.

C. În cadrul screeningului *in vitro* privind **efectul antiinflamator la nivel de endoteliu vascular** s-au evaluat procese celulare diferite, convergente către aceeași țintă terapeutică, formulându-se următoarele concluzii:

- Inhibiția ambelor tipuri de citokine (IL6 și IL8) reprezintă un efect sinergic atât asupra blocării procesului de activare a neutrofililor (care include eliberarea granulelor enzimatice ce degradează țesutul conex), cât și asupra stopării progresiei inflamației de la nivel acut la cronic. Acest proces este însoțit și de inhibiția VEGF corelată cu scăderea permeabilității vasculare și reducerea edemelor, precum și de normalizarea supra-expresiei moleculelor de adeziune monocite-endoteliu (ICAM și VCAM) declanșată ca unul din primele răspunsuri la stimularea pro-inflamatorie endotelială.

- Inflamația generată de stimuli bacterieni este inhibată de acțiunea **Dermo-Es** și **Dermo-HdC** prin blocarea secreției de citokine IL6 și IL8 și a factorului pro-angiogenic VEGF, ceea ce implică stoparea cascadei extracelulare de semnalizare pro-inflamatorie și reducerea permeabilizării vasculare.

- În cadrul stimulării cu TNF- α , s-a demonstrat un efect concertat la nivelul inhibiției secreției citokinelor IL6 și IL8, a expresiei ICAM și VCAM precum și de reducere a factorului VEGF pentru **Dermo-HdC** în manieră doză-efect. **Dermo-Es** acționează doar pe două din cele trei cai de semnalizare investigate, asupra inhibiției IL6 și IL8 și a reducerii expresiei ICAM și VCAM.

- **Dermo-Dis** inhiba secreția de citokine pro-inflamatorii IL6 și IL8 în condițiile stimulării nespecifice cu TNF- α , **inhiba expresia moleculei de adeziune ICAM** (unul din primele procese ce au loc la inițierea inflamației). Dozele active sunt între 5nM și 20nM. De asemenea, acționează în condiții bazale (nestimulare) la nivelul inițierii angiogenezei vasculare (importantă în cicatrizare) – crește expresia VEGF (vascular endothelial growth factor – promotor de angiogeneza) în mediul extracelular. În condiții de stimulare nespecifică inhiba VEGF, acționând în sensul reducerii angiogenezei și a permeabilizării vasculare.

Studiile realizate de noi prezintă o deosebită importanță științifică fundamentală și aplicativă, aducând un meritoriu aport într-un domeniu nou de cercetare: **dermato-cosmetologia**, prin definirea corectă a țintelor moleculare / celulare de acțiune pentru o serie de 9 compuși bioactivi izolați și purificați din 7 specii de plante din flora indigenă. Impactul acestor cercetări se va răsfrânge asupra dezvoltării unor noi metodologii de screening *in vitro*, la nivel de mecanism de acțiune, bazate pe tehnici complexe și interdependente de evaluare pentru demonstrarea eficacității dermatocosmeticeleor, precum și în configurarea unor produse mai performante.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1. Allen M.J., Rushton N., Use of the CytoTox 96™ Assay in routine biocompatibility testing in vitro, Promega Notes, 45: 7–10; (1994).
2. Bach B.A., Knappe W.A., Edinger M.G., Tubbs R.R., Improved sensitivity and resolution in the flow cytometric DNA analysis of human solid tumor specimens, Am. J. Clin. Pathol., 96, 615-627, (1991)
3. Barltrop J.A., Owen T.C., Cory A.H., Cory G.J., 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1(11), 611-614, (1991).
4. Bevilacqua M.P., Pober J.S., Mendrick D.L., Cotran R.S., Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 84(24), 9238-9242, (1987).
5. Birt DF., S Hendrich, D. Lee Alekel and Anthony M. Soybean and the Prevention of Chronic Human Disease, Soybeans: Improvement, Production and Uses, 3rd Edition, Agronomy Monograph no. 16, (2003)
6. Boxman, I., Lowik, C., Aarden, L., Ponc, M., Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction, J. Invest. Dermatol., 101, 316-324, (1993).
7. Brauchle M., Funk J. O., Kind P., Werner S., Ultraviolet B and H₂O₂ Are Potent Inducers of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Cultured Keratinocytes, The Journal of Biological Chemistry, 271(36), 21793–21797, (1996)
8. Carini M., Aldini G., Piccone M., FACINO R.M., Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure, Il Farmaco, 55(8), 526–534, (2000).
9. Cook E.B., Stahl J.L., Lowe L., Chen R., Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry, J. Immunol.Methods, 254, 109-118 (2001).
10. Detmar M., Molecular regulation of angiogenesis in the skin, J. Invest. Dermatol. 106, 207-208, (1996).
11. **Dumitriu B.**, Olariu L., Ene M.D., Rosoiu N., TGF- β modulation by natural active compounds from *S. officinalis* and *C. officinalis*, Romanian Biotechnological Letters, 18 (3),

- 8284-8294, (2013).
12. **Dumitriu B.**, Olariu L., Nita R., Zglimbea L., Rosoiu N., Vascular anti-inflammatory effects of natural compounds from *Aesculus hippocastanum* and *Hedera helix*, Romanian Biotechnological Letters, 18(1), 7963 - 7974, (2013)
 13. **Dumitriu B.**, Olariu L., Ene M. D., Zglimbea L., Rosoiu N., The Photo-Protective Activity of Crataegus monogyna Extract Proved by Complementary Mechanisms of Skin Inflammation, Damage of Extracellular Matrix, Cellular Survival and Proliferation Disorders, International Journal of Biotechnology for Wellness Industries, 1 (3), 177-188 , (2012).
 14. **Dumitriu B.**, Olariu L., Zglimbea L., Ene M.D., Rosoiu N., Photo-protective potential of phyto-compounds isolated from fenugreek, alfalfa and wheat, Archives of the Balkan Medical Union, 48 (2), 204-210, (2013).
 15. Eui Dong Son, Jin Young Lee, Serah Lee, Mi Sun Kim, Byeong Gon Lee, Seoup Chang, and Jin Ho Chungw , Topical Application of 17 β -Estradiol Increases Extracellular Matrix Protein Synthesis by Stimulating TGF- β Signaling in Aged Human Skin In Vivo, J Invest Dermatol., 124,1149 –1161, (2005)
 16. Fawcett D.W., Jensch R.P.J., Bloom W., Bloom & Fawcett's concise histology. Arnold, London (2002).
 17. Fisher G. J., Datta S. C., Talwar H. S, Wang Z.Q., Varani J., Kang S., Voorhees J. J., Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, Nature, 379(6563), 335–339, (1996).
 18. Fisher G.J., Wang Z.Q., Datta S.C., Varani J., Kang S., Voorhees J.J., Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. N. Engl. J. Med. 337, 1419– 1428, (1997).
 19. Fotakis G., Timbrell J.A., In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, Toxicol Lett. 160(2), 171-7, (2006)
 20. Fujimura T., Moriwaki S., Imokawa G., Takema Y., Crucial role of fibroblast integrins α 2 and β 1 in maintaining the structural and mechanical properties of the skin, J Dermatol Sci. , 45(1), 45-53, (2007)
 21. Fujiwara M., Muragaki Y., Ooshima A., Upregulation of transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor in cultured keloid fibroblasts: relevance to angiogenic activity. Archives of Dermatological Research, 297(4), 161-9,(2005)
 22. Garcia C., Poncelet P., Monsonis F., Chesné C., Flow cytometric quantitation of integrin expression on cultured fibroblasts or keratinocytes for the study of cosmetic active ingredients - <http://www.powershow.com/view1/1b4837>
 23. Gasparro F. P., Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy, Environ. Health. Perspect., 108(Suppl 1), 71–78, (2000)
 24. Gilchrest B.A., A review of skin ageing and its medical therapy, British Journal of Dermatology, 135(6), 867–875,(1996)
 25. Gille J., Paxton L. L., Lawley T. J., Caughman S. W., Swerlick R. A., Retinoic acid inhibits the regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 by cultured dermal microvascular endothelial cells, J Clin Invest., 99(3), 492–500,(1997).
 26. Goebeler M., Yoshimura T., Toksoy A., Ritter U., Bröcker E.B., Gillitzer R., The Chemokine Repertoire of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells and Its Regulation by Inflammatory Cytokines, Journal of Investigative Dermatology, **108**, 445–451,(1997)
 27. Gonzalez-Ramos, A., Cooper, K. D., Hammerberg, C., Identification of a human dermal macrophage population responsible for constitutive restraint of primary dermal fibroblast proliferation, J. Invest. Dermatol., 106, 305-311, (1996).
 28. Grange P.A., Che´reau C., Ringeaud J., Nicco C., Weill B., Production of Superoxide Anions by Keratinocytes Initiates P. acnes-Induced Inflammation of the Skin, Plos. Pathog., 5(7): e1000527, (2009)
 29. Haczynski J., Tarkowski R., Jarzabek K., Wolczynski S., Magoffin D.A., Czarnocki K.J., Ziegert M., Jakowicki J., Jakimiuk A.J., Differential effects of estradiol, raloxifene and tamoxifen on estrogen receptor expression in cultured human skin fibroblasts, Int J Mol Med. 13(6), 903-908, (2004)
 30. Haraldsen G., Kvale D., Lien B., Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular

- adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells, J Immunol., 156(7), 2558-65, (1996)
31. Herrmann G., Wlaschek M., Lange T. S., Prenzel K., Goerz G., Scharffetter-Kochanek K., UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts, Exp. Dermatol., 2(2), 92–97, (1993).
 32. http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/cell_cycle/cells2.html
 33. Kim Mi-Sun, Yeon K Kim, Hee C Eun, Kwang H Cho, Jin H Chung, All-trans retinoic acid antagonizes UV-induced VEGF production and angiogenesis via the inhibition of ERK activation in human skin keratinocytes, The Journal of investigative dermatology, 126(12), 2697-2706, (2006)
 34. Kosmadaki M.G., Yaar M., Arble B.L., Gilchrest B. A., UV induces VEGF through a TNF- α -independent pathway, The FASEB Journal, 17(3),446-8, (2003).
 35. Kulms D., Schwarz T., Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis, Photodermatol Photoimmunol Photomed, 16, 195–201, (2000);
 36. Lyons A.B., Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution., J Immunol Meth, 243, 147-154,(2000)
 37. Lyons A.B., Doherty K.V., Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. Current Protocols in Cytometry, 2 (27), 9.11.1-9.11.10; J. Wiley&Sons Ed. (2004)
 38. Malich G., Markovic B., Winder C., The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines.,Toxicology, 124(3), 179-92,(1997).
 39. Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, J.Exp.Med., 182(5), 1545 – 1556, (1995)
 40. Moreau L., Borders S., Jouandeaud M., Closs B., Cell adhesion: a new approach to tissue protection, Skin Care: Theories & Applications, Allured Publishing Corporation, (2006)
 41. Nickoloff B.J., The immunologic and genetic basis of psoriasis, Arch. Dermatol 135(9),1104-10, (1999)
 42. Norman M. U., James W.G., Hickey M. J., Differential roles of ICAM-1 and VCAM-1 in leukocyte-endothelial cell interactions in skin and brain of MRL/fas^{lpr} mice, The Journal of Immunology, 149(2), 698-705, (1992)
 43. Peschen M., T Lahaye, Hennig B., Weyl A., Simon J. C., Vanscheidt W., Expression of the Adhesion Molecules ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 and VLA-4 in the Skin is Modulated in Progressing Stages of Chronic Venous Insufficiency, Acta Derm Venereol (Stockh), 79, 27-32, (1999).
 44. Pustisek N, Situm M, UV-radiation, apoptosis and skin, Coll Antropol., 35(2), 339-41,(2011)
 45. Rawlings A.V., Advances in Dry Skin Stratum corneum Biology and Moisturization, Skin Care: Theories & Applications, Allured Publishing Corporation, (2006)
 46. Rezvani H.R., Mazurier F., Cario-Andre M., Pain C., Ged C., Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. J Biol Chem., 281, 17999–8007, (2006)
 47. Rhein L., Ageing Skin: Current and future Therapeutic strategies, Allured Bussiness Media, (2010)
 48. Riikonen T, Westermarck J., Broberg A., Kahari V.M., Heino J., Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression, J Biol Chem, 270, 13548–13552, (1995)
 49. Robinson J.P. , Current Protocols in Cytometry. vol 2, Unit 9.7, 9.7.1 – 9.7.14, Ed. John Wiley & Sons., (2009)
 50. Rosoiu N., Verman I.G., Biochimie clinică, Editura Muntenia, Constanța, România, pp 130-161, (2008)
 51. Segond C, Theron E., Petit V., Loiseau A., Innovative Natural Active Ingredient with Anti-inflammatory Properties, Skin Care: Theories & Applications, Allured Publishing Corporation, 121-130 (2006)
 52. Skin Care: Theories & Applications, Allured Publishing Corporation, cap.2:Product new ingredients, (2006)

53. Soroka Y., Zeev Ma'or, Leshem Y., Verochovsky L., Neuman R., Brégégère F. M., Milner Y., Aged keratinocyte phenotyping: Morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals, Experimental Gerontology, 43, 947–957, (2008)
54. Technical Data sheet, Human TGF- β 1 Single Plex Flex Set, BD™ Cytometric Bead Array
55. Tornier C., Rosdy M., Maibach H. I., In vitro skin irritation testing on reconstituted human epidermis: Reproducibility for 50 chemicals tested with two protocols, Toxicology in Vitro, 20, 401–416, (2006)
56. Verdier –Sevrain S, Bonte F., Gilchrest B; Biology of estrogens in skin: implications for skin aging, Experimental Dermatology, 15, 83-94 (2006)
57. Wang X.H., Xu B., Liu J.T., Cui J.R., Effect of beta-escin sodium on endothelial cells proliferation, migration and apoptosis, Vascul.Pharmacol., 49(4-6), 158-165, (2008).
58. WenChieh C., Yu-Yun L. J., Wen-Chuan H., Effects of dexamethasone and sex hormones on cytokine-induced cellular adhesion molecule expression in human endothelial cells, European Journal of Dermatology, 12 (5), 445-448, (2002)
59. Wondrak G T., Myron K., Jacobson L., Jacobson E, Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection, Photochem. Photobiol. Sci., 5, 215–237, (2006)
60. Yoshihiko S., Takeshi U., Minoru H., Iwasawa K., Tsuruga E., Kojima H., Ishikawa H., LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 Expression in Human Lymphatic Endothelium, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 56(2), 97–109, (2008).
61. Young B., Heath J.W., Stevens A., Lowe J.S., Wheater P.R., Burkitt H.G., Wheater's functional histology : a text and colour atlas, Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh ; New York., (2000)
62. Zglimbea Lenuș, **Dumitriu Brîndușa**, Olariu Laura, Bușe Emilia, Dinca Gabriela, Procedeu ecologic de valorificare optimă a potentialului de substante biologice active al plantei *Trigonella foenum graecum* și produsele cosmetice cu acțiune estrogen- mimetică realizate, Cerere de brevet nr. referinta dosar OSIM A 00482/ 29.06.2012.
63. Zglimbea Lenuș, **Dumitriu Brîndușa**, Ene Manela Diana, Olariu Laura, Niță Roxana Andreea, Dinca Gabriela, Produse fitoterapice cu acțiune cumulată în perturbări inflamatorii cutanate, Cerere de brevet nr. referinta dosar OSIM A 00618/ 23.08.2012.
64. Zglimbea Lenuș, **Dumitriu Brîndușa**, Ene Manuela Diana, Olariu Laura, Bușe Emilia, Dinca Gabriela, Drumea Veronica, „Asocieri fitoterapeutice în prevenția și tratamentul îmbătrânirii cutanate, cu efect de refacere a structurilor dermo-epidermice afectate”-- Cerere de brevet Nr.referinta dosar OSIM: A 00688/28.09.2012
65. Zhang Z., Bothe I., Hirche F., Zweers M.C., Gullberg D., Pfitzer G., Interactions of primary fibroblasts and keratinocytes with extracellular matrix proteins: contribution of alpha-2 beta-1 integrin, J Cell Sci., 119, 1886–1895,(2006).