

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

REZUMAT TEZA DE DOCTORAT

**CERCETĂRI AVANSATE PENTRU TESTAREA UNOR
BIOCOMPLEXE VEGETALE CU ACȚIUNE ÎN
PATOLOGII DEGENERATIVE CUTANATE**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT
Prof. Emerit. Dr. CS I NATALIA ROȘOIU
Membru titular al Academiei Oamenilor de Știință din România

DOCTORAND
MARIANA-LUIZA CRĂCIUN (TĂNASE)

CONSTANȚA
2020

CUPRINS

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII	1
PARTEA I: CONSIDERAȚII TEORETICE – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	4
CAPITOLUL 1. PATOLOGII DEGENERATIVE ALE PIELII	4
1.1. Impactul radiației UV și fotoîmbătrânirea	7
1.2. Arsuri chimice și termice – implicații în inflamația la nivelul pielii	11
1.3. Infecții fungice și bacteriene cutanate cu proiecție în disfuncții structurale și funcționale dermo-epidermice	13
1.4. Dereglări hiperproliferative – melanom	15
CAPITOLUL 2. STRES OXIDATIV – NUMITOR COMUN ÎN DEREGLĂRI FUNCȚIONALE ALE ȚESUTULUI CUTANAT	19
2.1. Radicali liberi și sisteme antioxidante	20
2.2. Surse exogene și endogene de radicali liberi generatoare de perturbări funcționale ale pielii	21
2.3. Restabilirea homeostaziei oxidative prin aport exogen de principii active naturale	24
CAPITOLUL 3. BIOCOMPLEXE VEGETALE – SURSA MULTIPOTENTĂ ÎN TERAPII CUTANATE	27
3.1. Clase de compuși bioactivi și efectul lor terapeutic: corelații structură – funcție	27
3.2. Diversitatea fitochimică a plantelor medicinale – baza dezvoltării de produs cu acțiune terapeutică multifactorială	29
PARTEA II. CONTRIBUȚII PROPRII	32
INTRODUCERE	32
CAPITOLUL 4. ALGORITM METODOLOGIC AL STUDIULUI EXPERIMENTAL	35
4.1. MODELE EXPERIMENTALE	35
4.1.1. Activitate antioxidantă/ antiradicalică în sistem acelular	35
4.1.2. Evaluarea stresului oxidativ intracelular	35
4.1.3. Status inflamator la nivel dermo-epidermic și vascular	35
4.1.4. Efect fotoprotector	36
4.1.5. Efect regenerativ cutanat	36
4.1.6. Evaluarea inhibiției progresiei tumorale și metastatice	36
4.2. METODE ȘI TEHNICI UTILIZATE PENTRU REALIZAREA MODELELOR EXPERIMENTALE	37
4.2.1. Evaluarea statusului antioxidant total prin evaluarea reducerii radicalului ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzothiazolin-6-sulfonic acid)	37
4.2.2. Evaluarea potențialului antiradicalic – metoda de reducere a radicalului DPPH (1, 1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZYL)	38
4.2.3. Determinarea activității pro- și antioxidante a extractelor bioactive prin chemiluminescență	39
4.2.4. Studii de citotoxicitate prin determinarea eliberării lactat-dehidrogenazei în mediu celular (marker de citotoxicitate) și reducerii MTS (marker al viabilității celulare)	41
4.2.5. Determinarea activității enzimatică a catalazei (CAT)	43
4.2.6. Determinare activitate enzimatică superoxid dismutază (SOD)	45
4.2.7. Metode de citometrie în flux	46
A. Identificarea simultană a radicalilor oxigenați intracelulari (anion superoxid și apa oxigenată) prin citometrie în flux	46
B. Evaluarea statusului inflamator: determinarea citokinelor (IL-6, IL-8, IL-1 α) și evidențierea expresiei factorului pro-angiogenic VEGF	48
C. Evaluarea expresiei proteice a VCAM-1 ȘI ICAM-1	49
D. Evaluarea procesului de apoptoză celulară	50
E. Testarea in vitro a capacității proliferative prin evidențierea generațiilor celulare succesive prin marcarea fluorescentă cu CFSE	50
F. Analiza secvențialității ciclului celular	51
G. Metoda de evidențiere a nivelului de diferențiere celulară	52
4.2.8. Dozare collagen intracelular și proteine totale prin colorare cu kit-ul Sirius Red/ Fast Green	53

Cercetări avansate pentru testarea unor biocomplexe vegetale cu acțiune în patologii degenerative cutanate	
4.2.9.Determinarea activității enzimatice a metaloproteinelor matriceale (MMP) secretate în mediul de cultură	54
4.3. MATERIALE VEGETALE CA FURNIZORI DE PRINCIPII ACTIVE	54
4.4. LINII CELULARE STANDARDIZATE RELEVANTE TESTATE ÎN STUDIILE EXPERIMENTALE PENTRU DETERMINAREA EFECTULUI DE PRODUS	57
4.5. REACTIVI ȘI ECHIPAMENTE IMPLICATE ÎN STUDII	59
CAPITOLUL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII	63
5.1.Studii de citotoxicitate: profil citotoxic al complexelor bioactive din <i>Salvia officinalis</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Arctium lapa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Vitis vinifera</i>	64
5.2.Activitatea antioxidantă/ antiradicalică a extractelor bioactive <i>Salvia officinalis</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Arctium lapa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Trifolium pratense</i> și <i>Vitis vinifera</i> în sistem acelular.....	74
5.3.Modularea stresului oxidativ intracelular de către extractele de <i>Salvia officinalis</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Arctium lapa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Trifolium pratense</i> și <i>Vitis vinifera</i> în sisteme celulare cu relevanță dermo-epidermică	80
5.4.Simularea condițiilor pro-inflamatorii la nivelul țesutului cutanat pentru evaluarea impactului complexelor vegetale din <i>Salvia officinalis</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Arctium lapa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Trifolium pratense</i> și <i>Vitis vinifera</i> în patologii dermatologice.....	90
A. Inflamație dermo-epidermică.....	90
B. Inflamație vasculară, importanță în procese de regenerare și refacere post-traumatică.....	95
5.5.Influența extractelor vegetale de <i>Salvia officinalis</i> și <i>Corylus avellana</i> asupra interacțiunilor keratinocit – radiație UV	102
5.6.Evaluarea acțiunii extractelor vegetale din <i>Salvia officinalis</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Arctium lapa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Trifolium pratense</i> și <i>Vitis vinifera</i> asupra regenerării cutanate	108
A. Regenerare epidermală prin stimularea procesului de diferențiere keratinocitară.....	108
B. Studii asupra homeostaziei matricei extracelulare secretată de fibroblaști dermici	112
5.7.Mecanisme implicate în progresia melanomică modulate de asocieri de fitocompuși biologic activi din trifoi roșu (<i>Trifolium pratense</i>) și deșeuri de struguri (<i>Vitis vinifera</i>).....	120
CONCLUZII FINALE	131
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	136
PUBLICAȚII	153

Rezumatul prezentei teze prezintă pe scurt rezultatele originale obținute, concluziile generale, bibliografia selectivă, precum și activitatea științifică desfășurată în decursul studiilor de doctorat, păstrându-se aceleași notații utilizate în cadrul tezei de doctorat.

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII

Stresul oxidativ, exogen și endogen, reprezintă un factor declanșator al unor perturbări biochimice și fiziologice care se propagă în lanț și sunt implicate în patogeneza unor maladii degenerative sistemice sau cu țintă particulară la nivel de țesut sau organ. Pielea are o expunere mare la agresiunile externe fizice (ex.: radiația UV) și chimice (ex.: agenți xenobiotici) generatoare de stres oxidativ, astfel încât devine un organ susceptibil la transformări generate de radicalii liberi reactivi, cu repercursiuni de modificare în fiziologie și inducere de disfuncții și patologii: fotosensibilitate, arsuri, răni și infecții cutanate, transformări maligne. Homeostazia cutanată perturbată poate fi restabilită în funcție de gradul de dezechilibru prin aport antioxidant individual, cât și prin acțiuni sinergice ale unor complexe biologice active care intervin în mecanismele generatoare de instalarea și/sau progresia bolii (ex.: inflamație, proliferare celulară, refacere matrice proteică extracelulară, reepitelizare, progresie tumorală) – **Figura 1.**

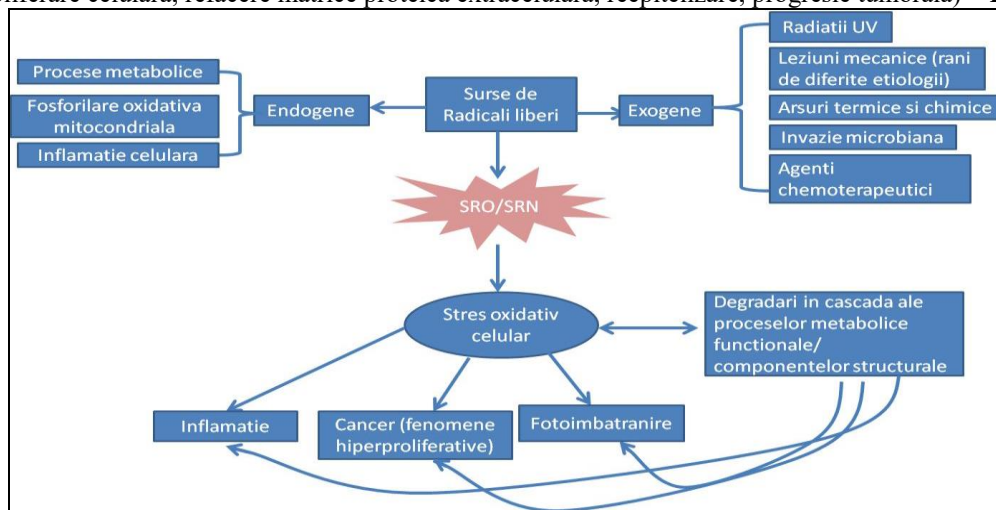


Figura 1. Factori declanșatori ai stresului oxidativ celular și impactul acestuia în procese degenerative

Scopul cercetărilor prezentei teze de doctorat este **identificarea, caracterizarea, monitorizarea și modularea *in vitro* a unor procese celulare și moleculare implicate în perturbări degenerative cutanate prin intervenția selectivă a unor complexe biologice active individuale și asociate.** Variabilitatea statusului funcțional celular va fi mimată *in vitro* prin acțiunea unor molecule semnal recunoscute pentru impactul lor diferențiat la nivelul proceselor pro-oxidative și pro-inflamatorii, ubicuitare ca răspândire și cauzalitate în patologii degenerative.

Obiectivele acestui studiu se referă la:

- Elaborarea unor modele experimentale *in vitro*, relevante pentru un screening complex multi-parametric al eficacității unor biocomplexe vegetale în terapii dermatologice;
- Validarea modelelor experimentale utilizând testările unor antioxidanți cunoscuți (ex.: N-acetil-Cisteina, vitamina C), agenți anti-proliferativi (metotrexat), sau anti-inflamatori (dexametazona);
- Aplicabilitatea modelelor experimentale pentru definirea efectului nou de produs, prin determinarea *in vitro* a profilului toxicologic și de acțiune specifică a biocomplexelor vegetale optimizate;
- Evaluarea interrelațională efect principiu activ ↔ design complex bioactiv și direcționarea către tratamentul afecțiunilor degenerative cutanate specifice /țintă.

Originalitatea acestui studiu constă în algoritmul de obținere și aplicabilitate a unor complexe biologice active cu design și acțiune *in vitro* specifică unor maladii cutanate, valorificând conceptul de „*green therapy*” pe care se bazează tendințele industriei cosmetice și farmaceutice actuale. Patologiile cutanate scad calitatea vieții având un impact social și economic major prin incidența crescută la nivel populațional; amplificată de condițiile de mediu și climatice și agravarea poluării mediului în care trăim. Deși există multiple soluții terapeutice în special de sinteză, eficiența tratamentului scade în timp, prin apariția unor fenomene de rezistență sau efecte alergice adverse.

Cu toate că terapiile naturiste au caracter tradițional, bazele științifice ale acestora nu au fost complet clarificate. În acest context, teza de doctorat are un aport inovativ privind abordarea și investigarea profilului de eficacitate/ toxicitate optim pentru complexe vegetale asociate în grupuri structurale bine definite și obținute

particularizat din extracte de *Salvia officinalis*, *Arctium lappa*, *Corylus avellana*, *Trifolium pratense* și din deșeuri vegetale din specii de *Solanum lycopersicum* și *Vitis vinifera*.

Stagiile de acțiune asupra celulei, determinarea și modelarea statusului celular in vitro integrează tehnici de cultivare și metodologii performante de screening multiparametric la nivel celular și molecular în modele experimentale originale de iradiere, stimulare a unor factori specifici de creștere și de monitorizare a unor cascade de producere a radicalilor liberi utilizând atât de linii standardizate, precum și culturi primare normale și tumorale. Un factor declanșator al disfuncțiilor cutanate și dezvoltarea în patologii degenerative este stresul oxidativ, care reprezintă ținta terapeutică a prezentului studiu și relevanța eficacității multivalente a biocomplexelor optimizate în structură și efect.

Un alt aspect important al cercetărilor, care accentuează contribuția inovativă, este valorificarea deșeurilor vegetale - **recuperare și exploatare tehnologică** din specii de *Solanum lycopersicum* și *Vitis vinifera*. Acestea rezultă din convergența rezultatelor cercetării efectelor biologice ale asocierilor de extracte active cu perspective autentice în formularea, condiționarea și realizarea de produse destinate afecțiunilor cutanate.

Cuvinte cheie: stres oxidativ, țesut cutanat, fotoprotecție, inflamație, melanom, *Salvia officinalis*, *Corylus avellana*, *Arctium lappa*, *Trifolium pratense*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera*

Teza de doctorat intitulată „Cercetări avansate pentru testarea unor biocomplexe vegetale cu acțiune în patologii degenerative cutanate”, este alcătuită din două părți și structurată în 5 capitole.

Partea I. Stadiul actual al cunoașterii. În primele trei capitole sunt prezentate datele din literatura de specialitate, care reflectă stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește rolul stresului oxidativ ca factor declanșator în patologii cutanate, impactul factorilor endogeni și exogeni generatori de stres oxidativ, reglarea homeostaziei redox prin aport antioxidant.

Partea II. Contribuții proprii. Prezintă evidențierea acțiunii unor complexe vegetale, active în combaterea stresului oxidativ la nivel cutanat.

Capitolul 4 prezintă modelele experimentale și metodele utilizate în dezvoltarea lor, extractele vegetale studiate, precum și liniile celulare standardizate (fibroblaști –HS27, keratinocite-HaCaT, celule endoteliale – HUVEC, celule de melanom murinic – B16F10) relevante pentru efectul terapeutic urmărit. De asemenea sunt prezentați toți reactivii și echipamentele utilizate în cadrul modelelor experimentale.

Capitolul 5 prezintă evidențierea unor procese celulare și moleculare reprezentative pentru patologii dermatologice degenerative, modulate de principii active naturale cu potențial antioxidant, prin dezvoltarea și aplicarea modelelor experimentale.

PARTEA I: CONSIDERAȚII TEORETICE – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Țesutul cutanat reprezintă o interfață importantă pentru menținerea homeostaziei față de factorii mecanici, chimici și biologici, cu care se confruntă din mediul exterior [Kolarsick și colab., 2009]. Procesele încadrate în această categorie se referă la: inflamație, răspuns imun (incluzând inducerea toleranței și prevenirea bolii), vindecarea rănilor și angiogeneză [Jia și colab., 2015; Matejuk A, 2018]. Structurile celulare epidermice și dermice din componența țesutului cutanat, prezintă o contribuție semnificativă nu numai la menținerea homeostaziei tisulare, dar și în vindecarea rănilor și stau la baza heterogenității și progresiei tumorale [Rogoni și colab., 2018].

Stresul oxidativ este rezultatul perturbării balanței între agenții prooxidanți și antioxidanți, fiind mediat de radicalii liberi (SRO/ SRN) generați în timpul metabolismului fiziologic aerob și a proceselor inflamatorii patologice. Pielea dispune de un sistem antioxidant extrem de complex ce include antioxidanți enzimatici (glutathion-peroxidaza, glutathion-reductaza, superoxid-dismutaza, catalaza) și non-enzimatici (acid ascorbic, glutathion, acid uric, vitamina A, melanina, α -tocoferol, carotenoide, etc.) [Baek și colab., 2016]. La nivel cutanat, stresul oxidativ contribuie la apariția unor tulburări ca pierderea elasticității pielii, fotoîmbătrânire, inflamație, reacția autoimună, hipersensibilitate, keratinizare neregulată, leziuni preneoplastice și cancer de piele [Nachbar și colab., 1995]. Agenții poluanți din aer, iradierea UV, microorganismele, virusurile și xenobioticele pot servi drept surse exogene de specii reactive de oxigen, în timp ce speciile reactive de oxigen endogene sunt generate în timpul metabolismului celular normal, în timpul reacțiilor imune și mai multor afecțiuni patologice [Trouba și colab., 2002; Portugal și colab., 2007], cum ar fi cele postischemice, în care reperfuzia duce la o producție masivă de radical superoxid [Epstein și colab., 1985]. SRO generate la nivelul pielii pot fi produse în mod constitutiv în keratinocitele epidermice prin procese specifice, cum ar fi oxidarea enzimatică și respirația aerobă. SRO pot fi, de asemenea, induse de citokine, factori de creștere și alți stimuli fiziologici [Fuchs și colab., 2001; Kohen și colab., 2002].

Patogenitatea afecțiunilor cutanate implică fenomene complexe de natură fiziologică, imunologică, genetică etc., generate de doi agenți principali (oxidanții și rețeaua citokinică), care sunt implicați în diferite dereglări cutanate, inclusiv carcinogeneză, leziuni cauzate de radiația UV, procese inflamatorii, dar și în afecțiuni ca psoriasis, dermatită atopică, dermatită de contact, vitiligo, etc. [Portugal și colab., 2007].

Fotoîmbătrânirea este un proces degenerativ multisistem, ce implică pielea și sistemul suport cutanat (oase, cartilaj, compartimente subcutanate), fiind caracterizată printr-o serie de transformări ale țesutului cutanat în timp, în urma expunerii la radiații UV [Han și colab., 2014]. În timpul procesului de îmbătrânire a pielii, eficiența sistemului antioxidant endogen, este diminuată, iar formarea SRO provoacă în principal leziuni ale ADN-ului, dar și peroxidare lipidică intracelulară, reacții anormale de oxidare a proteinelor, toate cauzând leziuni celulare, inflamație, supresie imună, stres oxidativ, perturbări ale balanței hormonale și îmbătrânire prematură.

În condiții homeostatice, suprafața pielii este colonizată de o diversitate de microorganisme, de tipul bacteriilor, virusilor, fungilor, artropodelor, etc. Cu toate acestea, un echilibru dinamic și sănătos între epiderm și populația microorganismelor este reglementat prin producerea de compuși antibiotici și antifungici prin sebocite dermice, precum și prin însuși microorganismele implicate [Schommer și colab., 2013]. Țesutul cutanat servește drept prima linie de apărare împotriva infecțiilor microbiene, prin secreția sebumului cu pH acid și a acizilor grași pentru inhibiția patogenilor și prin posedarea propriei flore normale, împiedicând astfel colonizarea de către alte organisme patogene.

Melanomul malign cutanat, reprezintă cauza a peste 75% din decesele asociate cancerului de piele și apare cel mai frecvent în rândul tinerilor, fiind caracterizat prin capacitatea mare de invazie și metastazare. O contribuție semnificativă la dezvoltarea și progresia bolii, o au atât factorii genetici, cât și expunerea la radiațiile UV și micromediul tumoral. [Cotignola și colab., 2007]. Expunerea repetată a țesutului cutanat la radiația UV, influențează funcționarea și supraviețuirea multor tipuri de celule, fiind factorul cauzativ al apariției cancerului de piele. Pigmentarea pielii este cel mai important factor fotoprotectiv, datorită melaninei care pe lângă absorbția radiațiilor UV, prezintă și proprietăți de reglementare asupra homeostazei epidermice, eliminarea radicalilor liberi pentru a proteja împotriva leziunilor oxidative și, eventual, chiar activitatea antimicrobiană. [Brenner și colab., 2008]

De-a lungul timpului, cercetările au demonstrat că îmbogățirea sistemelor organismului uman cu antioxidanți naturali poate corecta dezechilibrul homeostaziei, poate preveni debutul bolilor provocate și/sau stimulate de stresul oxidativ mediat de radicalii liberi, dar poate avea și un rol semnificativ în tratarea acestor afecțiuni. Aceste considerente au accelerat căutarea, izolarea și perfecționarea principiilor active antioxidante. Extractele de plante sunt din ce în ce mai utilizate ca fitoterapeutice și sunt surse importante de antioxidanți naturali, care întăresc apărarea antioxidantă endogenă împotriva leziunilor provocate de speciile reactive de oxigen (SRO) și restabilesc echilibrul optim prin neutralizarea acestor specii reactive [Tiwari, 2004].

Compușii bioactivi din plante pot fi definiți ca metaboliți secundari ai plantelor care generează efecte farmacologice sau toxicologice la om și la animale. Plantele produc diferiți compuși antioxidanți, enzimatici și nonenzimatici, pentru a contracara efectul SRO [Asif, 2015]. Fructele și legumele sunt surse primare de antioxidanți naturali, conținând o varietate de compuși antioxidanți ca vitamina C, vitamina E, carotenoidele, luteina, licopenul, compuși fenolici (flavonoide, taninuri, lignine), etc. [Altemimi și colab., 2017]. Metaboliții secundari sunt produși în plante pe lângă căile biosintetice și metabolice primare pentru compușii asociați cu creșterea și dezvoltarea plantelor și sunt considerați produși biochimici secundari care nu sunt necesari pentru funcționarea zilnică a acesteia. Studii epidemiologice sugerează faptul că un aport de compuși naturali, este asociat cu scăderea riscului de cancer, de boli cardiovasculare și neurodegenerative, precum și afecțiuni cauzate de stres oxidativ. [Asif, 2015].

Din punct de vedere istoric, produsele naturale au fost sursa ingredientelor active ale agenților terapeutici, în special în domeniile bolilor infecțioase și terapiei tumorale. Produsele naturale joacă un rol de neînlocuit în descoperirea de noi medicamente și de noi precursori de medicamente, fiind o sursă importantă de structuri noi și având un rol unic în dezvoltarea compușilor anti-tumorali. În prezent, mai mult de jumătate dintre medicamentele anti-cancer utilizate pe scară largă în lume provin din surse naturale. Compușii naturali sunt bine caracterizați ca având o mare varietate de proprietăți anti-tumorale, de exemplu, inducerea apoptozei și autofagiei și inhibarea proliferării celulare.

PARTEA II. CONTRIBUȚII PROPRII INTRODUCERE

În restabilirea homeostaziei celulare afectate de impactul progresiv al radicalilor liberi exogeni sau endogeni sunt implicate mecanisme de reglare ce implică procese strict direcționate prin molecule semnal, factori și interacțiuni intra- și inter- celulare ce pot fi modulate de către compuși naturali ce reușesc prin complexitatea lor structurală un impact multiplu prin căi convergente de acțiune.

Ideea centrală a acestor cercetări pornește de la evidențierea unor complexe vegetale, active în combaterea stresului oxidativ la nivel cutanat, cu acțiune complementară în mecanisme degradative conexe, generatoare de patologii dermatologice grave, cu largă incidență. Aceste procese celulare se referă la: apoptoză, proliferare și rata de turn-over, modulare citokinică a inflamației și corelare la nivel de endoteliu vascular cu expresia moleculelor de adeziune, raport sinteză/ degradare enzimatică în formarea matricei proteice extracelulare, diferențiere keratinocitară, invazie tumorală.

Pentru selecția complexelor vegetale active s-au luat în studiu plante din speciile *Salvia officinalis*, *Corylus avellana*, *Arctium lappa*, *Solanum lycopersicum*, *Trifolium pratense*, *Vitis vinifera*, orientându-ne către valorificarea unor structuri de tip polifenolic (resveratrol din struguri, miricetina și antocianii din alun, acid cafeic, acid clorogenic din brusture), triterpenic (acid ursolic din salvie), glicoalcaloidic (glicoalcaloizi steroidici din tomate), izoflavone (genisteina, daidzeina, formononetin, biochanina din trifoi roșu), poliacetilene din brusture.

Cercetările debutează cu un screening general, la nivel aceluilar, privind acțiunea antioxidantă/ antiradicalică a unor extracte vegetale din *Salvia officinalis* (**SvPG** – extract cu polifenoli și acizi triterpenici); *Corylus avellana* (**Al** – extract de acizi polifenilcarboxilici, flavone); *Arctium lappa* (**Br** – extract de acizi polifenilcarboxilici, sesquiterpene); *Solanum lycopersicum* (Sol-T – extract de glicoalcaloizi steroidici); *Trifolium pratense* (**ET** – extract fitoestrogenic) și componente active din deșeuri vegetale din *Vitis vinifera* (**TES** – extract polifenolic), pentru a stabili potențialul lor de combatere a atacului oxidativ. Rezultatele vor direcționa studiile experimentale ulterioare către aprofundarea efectelor antioxidante la nivel celular, în sistem enzimatic (superoxid dismutaza și catalaza) și al radicalilor liberi oxigenați (anion superoxid și peroxid de hidrogen). Pe de altă parte, vor fi investigate mecanisme caracteristice patologiilor degenerative cutanate, definitorii pentru progresia bolii (ex. inflamație, proliferare și apoptoză, refacere matrice proteică extracelulară, reepitelizare, malignizare și metastazare în melanom), cu evidențierea unor asocieri de complexe vegetale active în aceste procese. Asocierile de extracte vegetale vor fi selecționate pe baza profilului antioxidant rezultat ca urmare a screeningului complex aceluilar și celular și a relației structură – activitate biologică. (**Figura 4**)

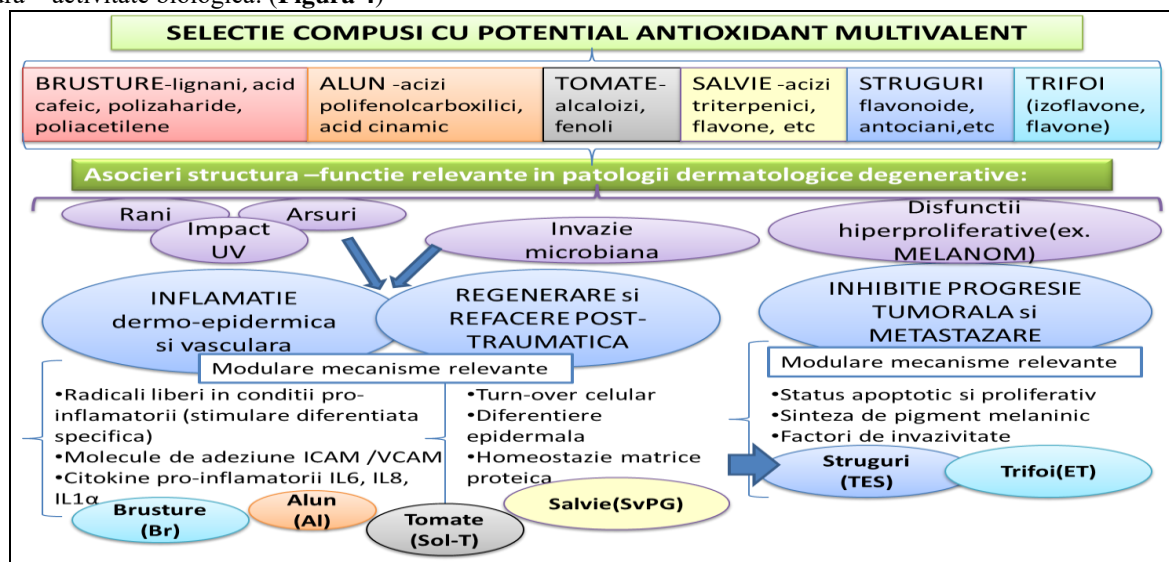


Figura 4. Evidențierea unor procese celulare și moleculare reprezentative pentru patologii dermatologice degenerative, modulate de compuși activi naturali cu potențial antioxidant multivalent

Modelele experimentale dezvoltate și aplicate în cadrul studiului prevăd stimularea specifică în vederea mimării *in vitro* a unei condiții patologice particulare:

TNF- α – stimul pro-inflamator puternic, generator de inflamație nespecifică – relevant în maladii dermatologice cu componentă inflamatorie: dermatite, psoriazis, răni de diferite etiologii, etc;

LPS - lipopolizaharid, generator al inflamației asociate invaziei bacteriene, implicat în micoze cutanate și suprainfectarea rănilor;

PMA - (forbol miristat acetat) stimul ce generează stres oxidativ asociat inflamației;

UV-A și UV-B cu intensitate controlată, pentru mimarea impactului radiant asupra țesutului cutanat – fotosensibilizări, arsuri solare.

Rezultatele pe care le avem în vedere vor contribui la evidențierea unor mecanisme celulare inter-relaționate în progresia patologiilor dermatologice cu mare incidență, având ca factor declanșator central stresul oxidativ. Un aspect important va fi acela al demonstrării unor efecte la nivel de celulă și moleculă semnal induse de complexe biologice active din plante indigene și deșeuri vegetale, pe baza cărora se pot configura scheme terapeutice sau de prevenție relevante.

CAPITOLUL 4. ALGORITM METODOLOGIC AL STUDIULUI EXPERIMENTAL

4.1 MODELE EXPERIMENTALE

4.1.1. Activitate antioxidantă/ antiradicalică în sistem aceluilar realizat prin evaluarea principiilor active din *Salvia officinalis*, *Arctium lappa*, *Corylus avelana*, *Trifolium pratense* și *Vitis vinifera*, din punct de vedere al capacității de captare a radicalilor liberi se aplica metode spectrofotometrice care determina pe de-o parte reducerea radicalilor liberi DPPH și ABTS și pe de alta parte cuplul luminol-apă oxigenată generat prin emisie luminiscentă. Rezultatele obținute reprezintă o etapă de predicție și sugerează orientarea către dezvoltarea și elaborarea modelelor experimentale *in vitro* de screening al parametrilor antioxidanți în sisteme celulare relevante la nivel dermo-epidermic.

4.1.2. Evaluarea stresului oxidativ intracelular prin determinarea efectului fitocompușilor din *Salvia officinalis*, *Arctium lappa*, *Corylus avelana*, *Solanum lycopersicum*, *Trifolium pratense* și *Vitis vinifera*, asupra sistemului oxidativ endogen enzimatic (enzime oxidative de fază I – superoxid dismutaza și catalaza), cât și asupra sistemelor celulare generatoare de specii reactive de oxigen (anion superoxid – O_2^- și apa oxigenată – H_2O_2), evaluat prin tehnici spectrofotometrice și de citometrie în flux. Pentru evidențierea acțiunii antioxidante a principiilor active testate, se utilizează linii celulare standardizate de fibroblaști (HS27), keratinocite (HaCaT) și celule de endoteliu vascular (HUVEC), cu mimarea unor condiții de inflamație sistemică nespecifică (stimulare cu $TNF\alpha$), asociată cu stres oxidativ endogen (stimulare cu PMA) și cu inflamație bacteriană (stimulare cu LPS).

4.1.3. Status inflamator la nivel dermo-epidermic și vascular evaluat prin monitorizarea unor parametri reprezentativi implicați în procesele inflamatorii. La nivelul țesutului cutanat lezat, citokinele $IL1\alpha$, $IL6$ și $TNF\alpha$ sunt puternic exprimate, de asemenea și chemokina $IL8$ intervine în procesul de reepitelizare și angiogeneză, prin stimularea migrării celulelor inflamatorii. Modelul experimental de determinare a acțiunii antiinflamatoare a extractelor vegetale testate, urmărește determinarea secreției citokinelor pro-inflamatorii $IL6$, $IL8$ și $IL1\alpha$, a factorului VEGF, promotor de angiogeneză și a moleculelor de adeziune exprimate pe suprafața celulelor endoteliale – ICAM și VCAM, secretate de fibroblaști, keratinocite și celule endoteliale, asupra cărora s-au aplicat scheme de simulare a agresiunilor inflamatorii generate fie de un atac bacterian, fie de inflamație sistemică nespecifică, însoțite de declanșare de stres oxidativ endogen.

4.1.4. Efect fotoprotector demonstrat prin monitorizarea principalilor parametri celulari cu impact în patogeniza fotoîmbătrânirii, respectiv: apoptoza celulară, perturbări ale secvențialității ciclului celular, stres oxidativ intracelular (O_2^- și H_2O_2), inflamație ($IL6$, $IL8$, $IL1\beta$), angiogeneză (VEGF). Modularea mecanismelor celulare sub influența radiației UV se realizează la nivelul keratinocitelor umane normale tratate cu extractele de *Salvia officinalis* și *Corylus avellana*.

4.1.5. Efect regenerativ cutanat prin stimularea procesului de diferențiere keratinocitară dar și prin menținerea homeostaziei matricei extracelulare la nivel dermic. Diferențierea keratinocitară *in vitro*, este reglată de concentrația externă de calciu, care induce stadii de diferențiere bine definite în care sunt exprimate specific proteine de tipul involucrinei, transglutaminazei și keratinei K14, evidențiate prin marcarea cu anticorpi specifici și vizualizate prin citometrie în flux. Rolul principiilor active studiate în procesul de remodelare dermală este determinat prin metode specifice de monitorizare a procesului de sinteză a fibrelor de colagen, dar și prin evaluarea activității enzimatice a metaloproteinazelor matriceale (MMP9 și MMP2) implicate în remodelarea tisulară și vindecarea rănilor.

4.1.6. Evaluarea inhibiției progresiei tumorale și metastatice prin monitorizarea unor procese celulare și moleculare din patologia dereglărilor hiperproliferative, în prezența unor fitocompuși biologici activi din trifoi roșu în asociere cu principii active din deșeuri de struguri. Mecanismele implicate în progresia melanomică vizate sunt: producerea melaninei, principal parametru indicator al malignizării în cancerul de piele; promotorii ai caracterului invaziv tumoral: metaloproteinaze (MMP 2 și 9), factorii solubili VEGF (pro-angiogenic) și $IL6$ (citokina

pleiotropică, modulator al unor cascade de semnalizare inter-celulare ce converg către un prognostic agravant în melanomul malign), proliferare și apoptoză în condițiile iradierii UV.

4.2 MATERIALE VEGETALE CA FURNIZORI DE PRINCIPII ACTIVE

Principiile active studiate au fost obținute prin procedee de extracție standardizate dezvoltate anterior în laboratoarele Biotehnos din speciile de *Salvia officinalis*, *Corylus avellana*, *Arctium lappa*, *Solanum lycopersicum*, asocieri de biocomponente din *Vitis vinifera* (deșeuri de vinificație - tescovina) - și fitoestrogeni din *Trifolium pratense*.

Tabel nr.2. Descrierea extractelor vegetale testate

Denumire extract	Materie primă	Compoziție	Mod de preparare
SvPG	<i>Salvia officinalis</i>	- acid ursolic – 0.144g/ 100g; - acid oleanolic – 0.057g/ 100g; - polifenoli – 0.189g/ 100g	Extract condiționat în propilenglicol
Br	<i>Arctium lappa</i>	- acizi polifenilcarboxilici - 0.32g/ 100g	Extract condiționat în propilenglicol
Al	<i>Corylus avellana</i>	- acizi polifenilcarboxilici – 2.32g/ 100g - flavone – 1.274g/ 100g - proantociani – nu au fost identificați	Extract condiționat în propilenglicol
Sol-T	<i>Solanum lycopersicum</i>	- glicoalcaloizi steroidici	Pulbere solubilă în DMSO (stoc de lucru - 80mg/ ml)
TES	Tescovina (<i>Vitis vinifera</i>)	- reziduu obținut în urma procedurii de vinificație - Aminoacizi - Acizi grași (acid linoleic, acid oleic, acid stearic) = 2,8818 gr% - Polifenoli - Flavone - Antociani	TES – 100mg pulbere/ ml apa (tescovina uscată la 45°C, sub vid și marunțită)
ET	<i>Trifolium pratense</i>	- condiționare în propilenglicol - Daidzeina = 1,125 mg/100ml; - Genisteina = 3,98 mg/100ml; - Biochanina = 12,6 mg/100ml - Formononetin = 22,63 mg/100ml	ET – condiționare în propilenglicol.
TES:ET	Tescovina (<i>Vitis vinifera</i>)		Comparații: TES:ET_A1= 9:1; TES:ET_A2= 5:1; TES:ET_A3= 3:1; TES:ET_A4= 9:2.
	<i>Trifolium pratense</i>		

4.3 LINII CELULARE STANDARDIZATE RELEVANTE TESTATE ÎN STUDIILE EXPERIMENTALE PENTRU DETERMINAREA EFECTULUI DE PRODUS

Pentru demonstrarea efectului terapeutic al fitocompușilor conținuți de extractele bioactive studiate, testele *in vitro* s-au realizat pe următoarele linii celulare standardizate relevante:

- Linia celulară HaCaT (keratinocit uman normal).
- Linia celulară normală HS-27 (Fibroblast dermic).
- Linia celulară HUVEC (celule endoteliale).
- Linia celulară B16-F10 (melanom murin)

CAPITOLUL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Patogenitatea afecțiunilor cutanate implică fenomene complexe de natură fiziologică, imunologică, genetică, etc., generate atât de agenții oxidanți, cât și de rețeaua citokinică, fiind implicați în dereglări cutanate cu grade diferite de agresivitate, care pot ajunge inclusiv la carcinogeneză, leziuni cauzate de radiațiile UV, procese inflamatorii, precum și în afecțiuni ca psoriasis, dermatită atopică și dermatita de contact, vitiligo, etc.. De asemenea, expunerea cronică a țesutului cutanat la radiațiile UV, induce o cascada de reacții biochimice cu răspunsuri biologice multifactoriale, incluzând dezvoltarea eritemului, hiperplazie, fotoîmbătrânire, melanogeneză.

Studiul prezentat, urmărește influența unor principii active de tipul polifenolilor, acizilor triterpenici, flavonoidelor, glicoalcaloizilor, antocianilor, fitoestrogenilor etc., asupra unor procese fiziologice și patologice cu impact la nivel celular.

Studiul *in vitro* debutează cu determinarea profilului citotoxic al complexelor din *Salvia officinalis*, *Arctium lappa*, *Corylus avellana*, *Trifolium pratense* și din deșeuri de *Solanum lycopersicum* și *Vitis vinifera*, la nivelul liniilor celulare standardizate de fibroblaști (HS-27), keratinocite (HaCaT), celule de endoteliu vascular (HUVEC) și celule de melanom murin (B16-F10), stabilindu-se astfel limitele de citotoxicitate.

Parcursul experimental este direcționat către evaluarea acțiunii principiilor active procesate din material vegetal bine selectat asupra următoarelor mecanisme celulare specifice țesutului cutanat:

- Modularea căilor metabolice de contracarare a speciilor reactive de oxigen implicate în inițierea și propagarea diferitelor dereglări cutanate;
- Potențialul efect antiinflamator al biocomplexelor la nivel cutanat în condițiile mimării unor agresii inflamatorii (atac funcic sau bacterian, inflamație nespecifică);
- Modularea mecanismelor celulare dermo-epidermice sub influența radiației UV, cu exemplificare pentru extractele de *Salvia officinalis* și *Corylus avellana*;
- Evaluarea efectului regenerator cutanat prin aportul în procesul de reînnoire epidermală și în regenerarea post-traumatică în leziuni de tipul arsurilor, rănilor, infecțiilor cutanate, etc.
- Studiul proceselor celulare și moleculare asociate dereglărilor hiperproliferative (melanom), prin testarea biocomplexelor din deșeuri de *Vitis vinifera* și *Trifolium pratense* asociate, la nivelul celulelor melanomice atât în condiții normale cât și în urma iradierii cu radiații UV.

5.1. Studii de citotoxicitate: profil citotoxic al complexelor bioactive din *Salvia officinalis*, *Corylus avellana*, *Arctium lapa*, *Solanum lycopersicum*, *Trifolium pratense*, *Vitis vinifera*

Limitele de citotoxicitate, ale principiilor active tinta asupra liniilor celulare utilizate în modelele experimentale prezentate la capitolul 4.4, se evaluează prin stabilirea corelației dintre scăderea viabilității celulare (testul MTS) și creșterea activității enzimatică în mediul de cultură (testul LDH). Protocolul de lucru este descris în cadrul capitolului 4.2. (metoda 4.2.4.)

Evaluarea citotoxicității compușilor luați în lucru, s-a realizat la nivelul liniilor celulare standardizate de fibroblast uman normal (HS27), keratinocit uman (HaCaT), celule endoteliale normale (HUVEC), celule de melanom murin (B16-F10), în funcție de acțiunea țintită la nivel celular.

Inoculul celular (7000 celule/ godeu) a fost lasat la aderat timp de 24h ulterior adaugandu-se în cultura extractele studiate și incubate timp de 48h pentru a evalua potentialul citotoxic/ citostatic. Celulele au fost tratate cu diluții seriale din fiecare extract astfel: extractul **SvPG** a fost testat pe un interval de concentrații procentuale cuprins între 0,006% - 1%; extractele **Br** și **Al** au fost evaluate în domeniul de concentrație 0.025% – 2%; extractul **Sol-T** a fost diluat pe domeniul 0.4 – 12 μg/ml; extractul **ET** a fost testat pe domeniul 0.007% - 0.5%; extractul **TES** a fost diluat pe domeniul 1 – 30 mg/ml. După marcarea și înregistrarea absorbantei, valorilor au fost prelucrate matematic și s-a reprezentat grafic raportul dintre efectul probelor/ efectul martorului în funcție de concentrația testată.

Tabel nr.7. Pragul de citotoxicitate pentru biocomplexele studiate pe liniile celulare țintă:

Substanța	Linia celulară	HaCaT	HUVEC	HS27	B16-F10
	Doza extract				
SvPG		0,1%	0,011%		
Al		0.167 %	0.166 %	0.100 %	
Br		2.5%	0.166%	0.5%	
Sol-T		1 μg/ml	6 μg/ml	0.1 μg/ml	
TES		5 mg/ml		5 mg/ml	10 mg/ml
ET		0.02 %		0.033 %	0,003%

TES:ET_A1			2%	2%
TES:ET_A2			2%	2%
TES:ET_A3			2%	3%
TES:ET_A4			Netoxic	Netoxic

Profilul citotoxic al complexelor bioactive determinat în cadrul studiilor de citotoxicitate, reprezintă punctul de pornire pentru testele ulterioare derulate la nivelul sistemelor celulare relevante pentru mecanismele vizate, pe baza carora se pot configura scheme de prevenție și/ sau terapeutice.

5.2. Activitate antioxidantă/ antiradicalică a extractelor bioactive din *Salvia officinalis*, *Corylus avellana*, *Arctium lappa*, *Solanum lycopersicum*, *Trifolium pratense*, *Vitis vinifera* studiate în sistem acelar

Speciile reactive de oxigen (SRO) sunt generate în mod continuu în procesele metabolice celulare normale și induse de către factorii din mediul exterior. La concentrații fiziologice, radicalii liberi prezintă un rol esențial într-o serie de procese biologice importante cum ar fi: semnalizare celulară; influențarea răspunsului celular; controlul viabilității, migrației și diferențierii celulare; protecția celulelor împotriva agenților patogeni și infecțioși prin inactivarea lor [Molyneux, 2004]. Un nivel de SRO mai ridicat decât cel fiziologic, cauzează un dezechilibru în balanța speciilor oxidative – antioxidante (stres oxidativ), inducând astfel afecțiuni ca ateroscleroza, boli cardiovasculare, diabet, inflamații, îmbătrânire celulară, leziuni cutanate, artrită reumatoidă și boli neurologice [Sies, 2018]. Atunci când antioxidanții endogeni de natură enzimatică sau non-enzimatică, nu mai sunt capabili să contracareze efectul negativ al SRO, este esențial ca organismul să primească un aport de antioxidanți naturali de tipul acizilor fenolici, tocoferolilor, flavonoidelor, etc. care să își exercite efectul prin diferite mecanisme cum ar fi inhibiția cedării atomilor de hidrogen, legarea ionilor metalelor tranziționale, captarea radicalilor (rol de “scavenger”), dezintegrarea peroxizilor [Kohen și colab., 2002].

Pentru evidențierea capacității antioxidante/ antiradicalice a extractelor obținute prin aplicarea unor metode de extracție special dezvoltate și optimizate cu scopul izolării compușilor de interes cât mai eficient din materialul vegetal, au fost realizate o serie de experimente în sistem acelar ce au vizat potențialul acestora de eliminare a speciilor reactive din mediul de testare [Crăciun și colab., 2020]. Având în vedere compoziția fitochimică a extractelor, pentru screening-ul antioxidant/ antiradicalic au fost testate complexele bioactive (**SvPG, ET, TES, Br și Al**) cu conținut ridicat în compuși de tipul polifenolilor (flavonoide, acizi polifenolcarboxilici și proantociani), acizilor triterpenici, fitoestrogenilor. Evaluarea *in vitro* a potențialului efect asupra stresului oxidativ în sistem acelar s-a realizat prin aplicarea metodelor descrise în detaliu în capitolul 4.2: *Evaluarea statusului antioxidant total prin evaluarea reducerii radicalului ABTS* (metoda 4.2.1.); *Determinarea activității antiradicalice – metoda de reducere a radicalului DPPH* (metoda 4.2.2.); *Determinarea activității antioxidante prin chemiluminescență utilizând cuplul peroxidaza-luminol-H₂O₂* (metoda 4.2.3.); valorile absorbanțelor înregistrate la lungime de undă specifică testului fiind prelucrate matematic și prezentate sub formă de grafic (vezi **Figurile 14, 15 și 16**). Din analiza lor se observă faptul că valorile absorbanțelor scad în manieră doză – efect cu o dependență liniară.

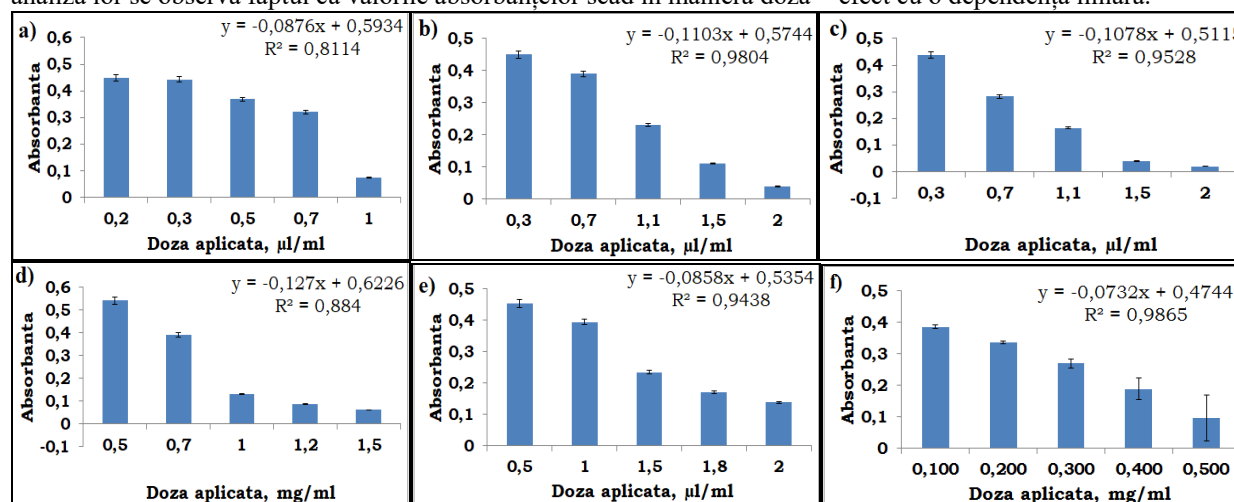


Figura 14. Concentrația totală de antioxidanți conținuți în extractele vegetale: a)Al; b) SvPG; c) Br; d) TES; e) ET; f) Vitamina C evaluată pe baza capacității de reducere a radicalului ABTS în funcție de doza de extract aplicată

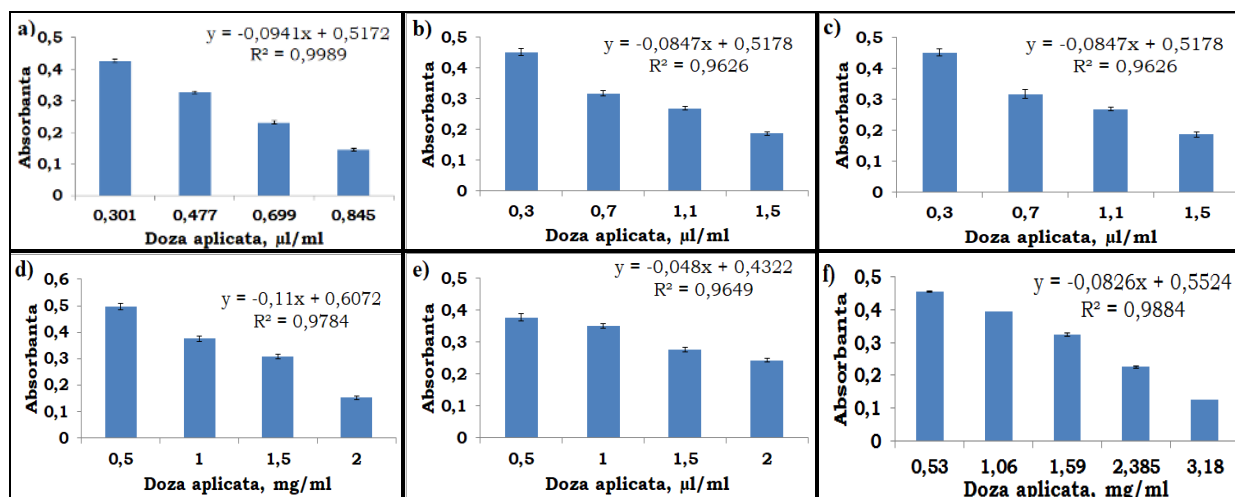


Figura 15. Capacitatea antiradicalică a extractelor a) Al; b) SvPG; c) Br; d) TES; e) ET; f) vitamina C evaluată pe baza radicalului liber DPPH în funcție de doza aplicată

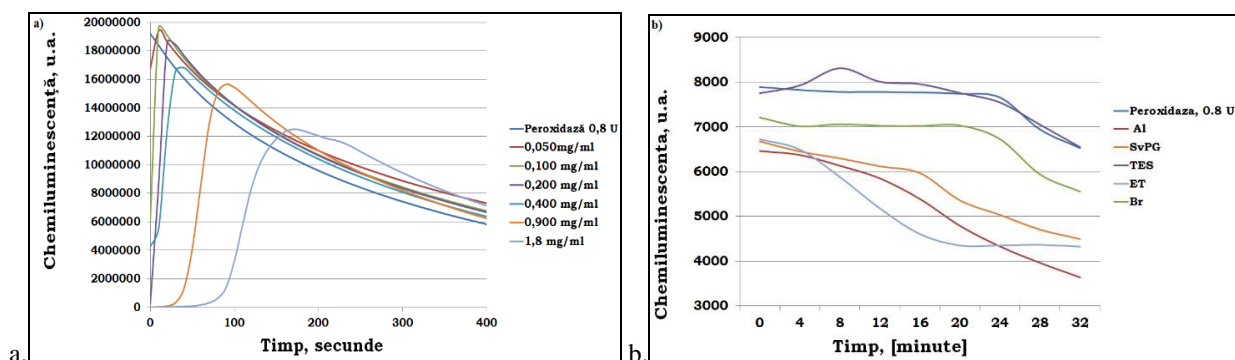


Figura 16. Evaluarea activității antioxidante printr-un sistem cuplat peroxidaza- luminol-H₂O₂. a) Cinetica semnalului chemiluminescent în prezența controlului pozitiv - vitamina C în funcție de doza aplicată; b) Stingerea semnalului chemiluminescent în prezența extractelor (doza aplicată este echivalentă cu EC₅₀ stabilită în testul de reducere a DPPH-ului)

Curbele prezentate în **Figurile 14-16** au condus la determinarea valorilor EC₅₀ (doza de extract minima necesară pentru a reduce în proporție de 50% concentrația de radicali liberi stabili generați în sistem – **Tabel nr.8**), pe baza cărora, în urma unor prelucrări matematice avansate [Chang și colab., 2010], se stabilește modelul de acțiune antioxidant.

Tabel nr.8. Activitatea antioxidantă a biocomplexelor izolate din material vegetal

Probă		EC ₅₀ (μl extract)*		
		(*) Rezultatele reprezintă media ±S.D., n=3		
		ABTS	DPPH	CL
Extracțe evaluate:				
1.	SvPG (μl/ml)	0.47±0.0141	1.724±0.300	0.10±0.0010
2.	Al (μl/ml)	0.31±0.006	0.397±0.008	0.09±0.0005
3.	Br (μl/ml)	0.41±0.010	0.940±0.150	0.10±0.0015
4.	ET (μl/ml)	0.70±0.021	1.869±0.056	0.05±0.0015
5.	TES (mg/ml)	3.98±0.123	1.330±0.027	0.08±0.0024
Control pozitiv:				
6.	Vitamina C (mg/ml)	0.357±0.007	1.6±0.04	0.42±0.006

Reprezentarea grafică (vezi **Figura 17**) a probelor (vezi numerotare tabelul numărul 8) față de valoarea EC_{50} formează harta distribuției probelor în funcție de cele trei metode aplicate, conferind posibilitatea determinării matematice a coeficientului de corelație (r) ($r = 0.0897$ – efect antiradicalic evaluat pe baza reducerii DPPH-ului, 0.1571 – reducerea radicalului ABTS și 0.3445 – efect antioxidant prin cuplarea peroxidaza-luminol-apa oxigenată). Linia albastră și cea portocalie se întrepătrund (**Figura 17**), ceea ce indică faptul că este puțin probabil ca moleculele cu efect antioxidant conținute de biocomplexele studiate să acționeze pe mai multe căi antiradicalice.

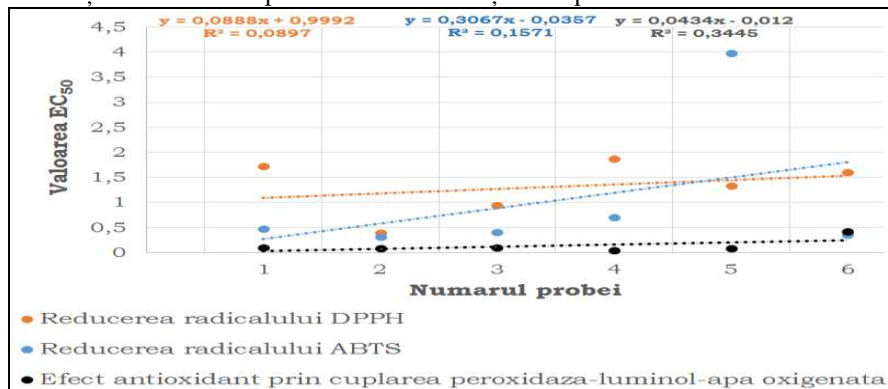


Figura 17. Reprezentarea grafică a celor trei metode de evaluare a potențialului antioxidant/ antiradicalic.

Reprezentarea grafică de tip M-A a fost utilizată pentru evidențierea diferențelor de acțiune antioxidantă/antiradicalică a probelor în funcție de cele trei metode aplicate. Într-un fișier Excel au fost calculate valorile pentru:

- $M1 = \log[(EC_{50} \text{ a probei evaluat prin metoda de reducere a DPPH-ului}) / (EC_{50} \text{ a probei evaluat prin sistemul cuplat Peroxidaza-luminol-apa oxigenata})]$
- $A1 = [\log(EC_{50} \text{ a probei evaluat prin metoda de reducere a DPPH-ului}) + \log(EC_{50} \text{ a probei evaluat prin sistemul cuplat Peroxidaza-luminol-apa oxigenata})] / 2$
- $M2 = \log[(EC_{50} \text{ a probei determinat prin metoda de reducere a DPPH-ului}) / (EC_{50} \text{ a probei evaluat prin metoda de reducere a ABTS})]$
- $A2 = [\log(EC_{50} \text{ a probei evaluat prin metoda de reducere a DPPH-ului}) + \log(EC_{50} \text{ a probei evaluat prin metoda de reducere a ABTS})] / 2$
- $M3 = \log[(EC_{50} \text{ a probei determinat prin sistemul cuplat Peroxidaza-luminol-apa oxigenata}) / (EC_{50} \text{ a probei evaluat prin metoda de reducere a ABTS})]$
- $A3 = [\log(EC_{50} \text{ a probei evaluat prin sistemul cuplat Peroxidaza-luminol-apa oxigenata}) + \log(EC_{50} \text{ a probei evaluat prin metoda de reducere a ABTS})] / 2$

În reprezentarea grafică de tip M1-A1, punctul echivalent pentru **Br** pe axa y ($M1$) este localizat pe zero iar mediana este foarte aproape de zero, situație similară întâlnită și pentru reprezentarea $M2-A2$ cu mențiunea că celelalte puncte au o împrăștiere mai mare și sunt poziționate la o distanță considerabilă de zero. În reprezentarea grafică $M3-A3$ poziționată foarte aproape de zero este Vit C, dar valoarea medie este departe de zero.

Supunerea rezultatelor experimentale acestui proces de analiză a avut drept obiectiv determinarea unui mecanism antioxidant coreland valorilor experimentale obținute prin aplicarea celor trei metode, astfel:

- extractul **Br** acționează cu preponderență prin mecanisme de reducere a radicalilor liberi stabili și foarte slab asupra SRO,
- **ET** acționează doar ca scavenger pentru radicalii liberi,
- **TES** – poate fi utilizat atât ca scavenger pentru radicalii liberi cât și ca complex cu acțiune antioxidantă prin mecanisme de reducere a speciilor reactive de oxigen

- **SvPG** – comparativ cu celelalte complexe studiate are un potențial antiradicalic/ antioxidant scăzut
- **Al** – principiile active continute în acest extract își manifestă potențialul antioxidant acționând în sensul reducerii speciilor reactive de oxigen.
- **Vit C** – este un puternic antioxidant ce acționează cu precădere pe mecanismele de contracarare a SRO, aspect confirmat și de literatura de specialitate.

Utilizarea Vit C drept substanța de referință validează modelul experimental dezvoltat, optimizat și aplicat în cadrul acestui studiu extins.

Din analiza datelor obținute, se remarcă un efect antioxidant la nivelul tuturor celor cinci extracte studiate, care prin capacitatea lor de a capta radicalii liberi, pot avea rol în combaterea degradării membranei celulare, a distrugerii proteinelor membranare sau a mutațiilor la nivelul moleculei de ADN, împiedicând astfel propagarea și dezvoltarea a numeroase afecțiuni (ateroscleroză, cancer, diabet, afecțiuni hepatice, inflamație, leziuni cutanate, artrita, etc.).

Aceste rezultate preliminare au stat la baza dezvoltării și elaborării unor modele experimentale *in vitro* de screening antioxidant la nivel celular ce vizează modularea principalelor căi metabolice de contracarare a speciilor reactive de oxigen (anionul superoxid și peroxidul de hidrogen) implicate în inițierea și propagarea diferitelor patologii cutanate cu scopul demonstrării potențialului efect antioxidant al biocomplexelor vegetale.

5.3. Modularea stresului oxidativ intracelular de către extractele de *Salvia officinalis* (SvPG), *Corylus avellana* (Al), *Arctium lapa* (Br), *Solanum lycopersicum* (Sol-T), *Trifolium pratense* (ET) și *Vitis vinifera* (TES) în sisteme celulare cu relevanță dermo-epidermică

Dezechilibrul între apariția speciilor reactive de oxigen/ azot (SRO/ SRN) și capacitatea organismului de a contracara acțiunea lor prin intermediul unor sisteme de protecție antioxidantă, conduce la deteriorarea biomoleculelor și celulelor importante, cu impact potențial asupra întregului organism [Yoshikawa și colab., 2000].

SRO sunt generate în timpul metabolismului normal, sunt o parte integrantă în funcționarea celulară normală și, de obicei, sunt foarte puțin dăunătoare datorită mecanismelor intracelulare care contracarează efectele lor. Antioxidanții atenuează efectele nocive ale SRO și pot afecta și inversa multe dintre evenimentele care contribuie la afecțiunile cutanate. Cu toate acestea, o acțiune crescută sau prelungită a radicalilor liberi, poate afecta mecanismele de apărare împotriva SRO, contribuind la dezvoltarea bolilor și a tulburărilor cutanate [Trouba și colab., 2002; Sies, 2015].

Evaluarea efectului antioxidant al extractelor asupra a două enzime oxidative de fază I implicate în reducerea stresului oxidativ intracelular: catalază – superoxid dismutază, s-a realizat prin două metode spectrofotometrice de determinare a activității enzimatică a catalazei (reacție de descompunere a apei oxigenate în apă și O₂) – metoda 4.2.5. și a superoxid dismutazei (monitorizarea inhibiției procesului de reducere a citocromului c de către radicalul superoxid) – metoda 4.2.6. Evaluarea stresului oxidativ intracelular s-a realizat prin monitorizarea speciilor reactive de oxigen (peroxid de hidrogen și anion superoxid – marcarea cu DCFH-DA, respectiv HE) și analiza de citometrie în flux (metoda 4.2.7.-A).

În cadrul acestui model experimental, s-a urmărit evaluarea stresului oxidativ intracelular la nivelul liniilor celulare de fibroblaști dermici (HS-27), keratinocite (HaCaT) și celule de endoteliu vascular (HUVEC), atât în condiții bazale cât și în condiții de stimulare: inflamație bacteriană: LPS (un lipopolizaharid extras din bacteria *Escherichia coli* - 1μg/ml) și inflamație sistemică nespecifică (TNF-α, 15ng/ml), însoțită de declanșare de stres oxidativ (PMA, 0.1μM) [Crăciun și colab., 2020; Crăciun și colab., 2017].

Evaluarea activității enzimatică a enzimelor intracelulare: catalaza (CAT) și superoxid dismutaza (SOD) secretate de celulele dermo-epidermice, în prezența extractelor bioactive SvPG, Br, Al, Sol-T, ET și TES.

Stabilirea concentrației de extract introdusă în mediul de cultură la extinderea modelului în sistem celular pe liniile HS-27 și HaCaT, s-a realizat pe baza intervalului de doze ce nu afectează viabilitatea celulară, stabilit în cadrul studiilor de citotoxicitate preliminare, prezentate în subcapitolul 5.1. Din curbele cinetice înregistrate în triplicat, s-a determinat activitatea enzimatică specifică, valorile calculate fiind prezentate mai jos:

Tabel nr.9-a. Modularea activității enzimatică a catalazei și superoxid dismutazei la nivelul celulelor HS-27 de către extractele bioactive testate:

Compus testat	Linia celulară HS-27	
	AE SOD (U/ml)	AE CAT - k(nmol/min/ml)

	nestimulat	TNF α +PMA	LPS+PMA	nestimulat	TNF α +PMA	LPS+PMA
Mc	119	98	89	6,55	8,39	9,95
SvPG 0.025%	199	124	117	8,42	11,06	12,50
Br 0.1%	188	118	115	7,16	11,62	10,76
Al 0.1%	231	136	148	8,04	10,02	12,98
Sol-T 100 ng/ml	212	131	113	12,17	8,76	10,42
ET 0.2%	177	161	143	10,31	9,66	11,68
TES 4 mg/ml	197	123	178	12,53	11,80	16,43
N-Ac-Cis 2mM	159	168	123	6,19	10,67	10,59

Tabel nr.9-b Modularea activității enzimice a catalazei și superoxid dismutazei la nivelul celulelor HaCaT de către extractele bioactive testate:

Compus testat	Linia celulară HaCaT					
	AE SOD (U/ml)			AE CAT - k(nmol/min/ml)		
	nestimulat	TNF α +PMA	LPS+PMA	nestimulat	TNF α +PMA	LPS+PMA
Mc	104	183	105	1,35	1,97	1,48
SvPG 0.025%	159	309	162	1,59	2,07	2,42
Br 0.1%	240	188	205	1,33	2,87	2,12
Al 0.1%	256	226	125	3,46	3,26	2,22
Sol-T 100 ng/ml	265	316	170	2,61	2,25	3,34
ET 0.2%	139	114	327	1,81	6,52	2,83
TES 4 mg/ml	246	226	130	4,60	3,16	4,55
N-Ac-Cis 2mM	119	186	118	1,83	2,33	3,92

Evaluarea stresului oxidativ intracelular prin monitorizarea speciilor reactive de oxigen (peroxid de hidrogen și anion superoxid – marcarea cu DCFH-DA, respectiv HE) și analiza de citometrie în flux.

Rezultatele sunt prezentate în graficele de mai jos, astfel: cantitatea de apă oxigenată, respectiv anionul superoxid intracelular corespund variației mediilor canalelor de fluorescență în cele 2 coordonate: FITC – A mean – pentru apă oxigenată și PE-A mean – pentru anionul superoxid. Pentru evidențierea acțiunii antioxidante a fitocompușilor, testele efectuate, s-au realizat în următoarele condiții de stimulare:

- inflamație sistemică nespecifică (TNF- α), însoțită de declanșare de stress oxidativ (PMA) – TNF α 15ng/ml +PMA 0.1 μ M, 24 ore de stimulare.
- inflamație bacteriană: LPS, un lipopolizaharid extras din bacteria Escherichia coli - 1 μ g/ml 18 ore de stimulare, asociată cu un stimul oxidativ endogen (PMA) sub acțiunea concomitentă și potențial preventivă a substanțelor active de testat [Crăciun și colab., 2020; Crăciun și colab., 2017].

Linia celulară HaCaT – keratinocit uman normal

Modificările procentuale ale speciilor reactive generate intracelular la nivel de keratinocit uman în prezența extractelor SvPG, Al, Br, Sol-T, TES și ET, sunt reprezentate în graficele de jos:

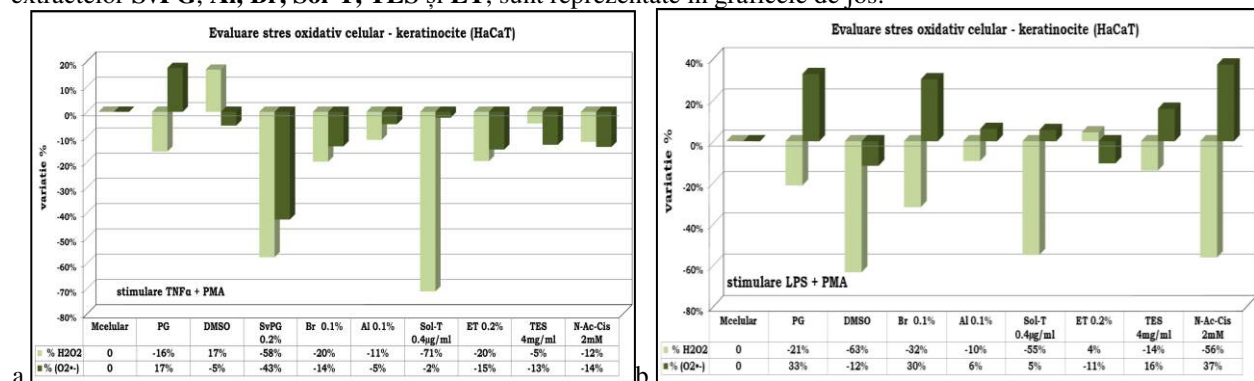


Figura 19. Evidențierea acțiunii fitocompușilor asupra stresului oxidativ celular prin citometrie în flux la nivelul liniei celulare HaCaT: stimulare TNF α +PMA (a.); stimulare LPS+PMA (b.); s-au utilizat ca martor pozitiv N-Acetil-cisteina

Linia celulară HS-27 – fibroblast uman

Efectul extractelor bioactive **SvPG**, **Sol-T**, **Al**, **Br**, **ET** și **TES**, asupra speciilor reactive de oxigen celulare, la nivelul liniei celulare HS-27, este reprezentat în graficele de mai jos, ca variație procentuală față de martorul corespunzător:

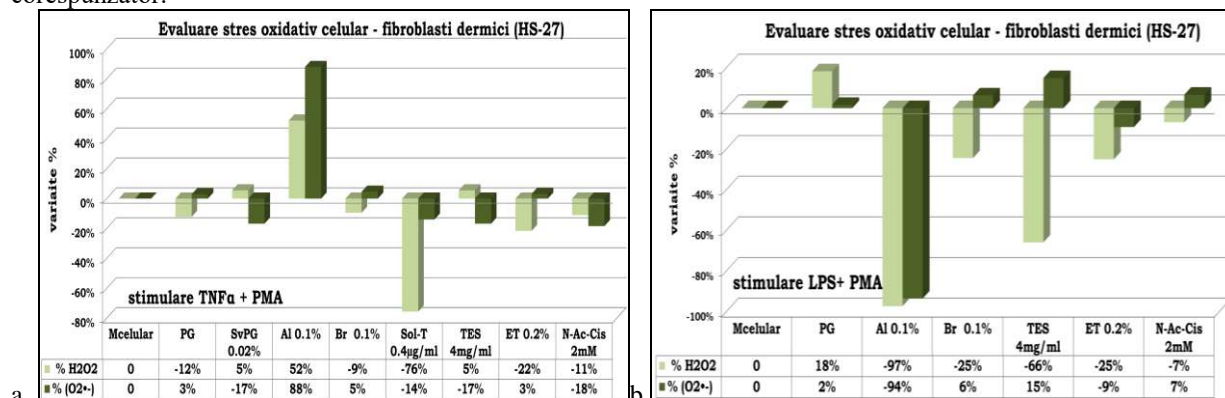


Figura 20. Evidențierea acțiunii fitocompușilor asupra stresului oxidativ celular prin citometrie în flux la nivelul liniei celulare HS-27: stimulare TNFα+PMA (a.); stimulare cu LPS și PMA (b.); s-a utilizat ca martor pozitiv, N-Acetil-cisteina

Linia celulară HUVEC – endoteliu vascular

Efectul extractelor bioactive **SvPG** și **Sol-T** asupra speciilor reactive de oxigen celulare, la nivelul liniei celulare HUVEC este reprezentat în graficul de mai jos ca variație procentuală față de martorul corespunzător:

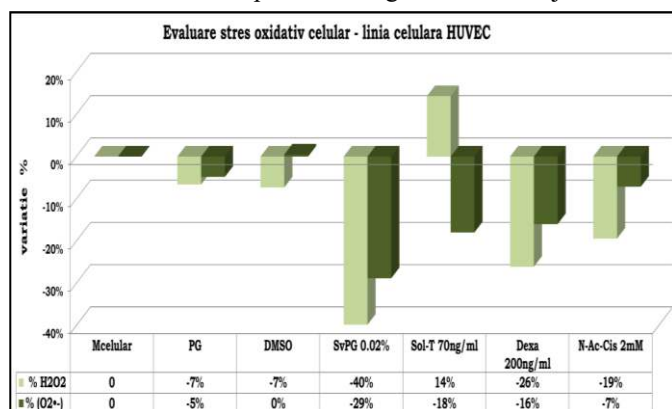


Figura 21. Evidențierea acțiunii fitocompușilor asupra stresului oxidativ celular la nivelul celulelor endoteliale, stimulate cu TNFα+PMA prin citometrie în flux. S-au utilizat ca martori pozitivi, dexametazona și N-acetil- cisteina

Extractul de salvie **SvPG**, inhibă producerea de specii reactive de oxigen în celulele endoteliale stimulate cu TNFα și PMA, efectul fiind unul comparabil cu cel al martorului pozitiv testat în aceleași condiții experimentale. Extractul glicocalcoidic **Sol-T**, indică un efect reducător asupra anionului superoxid în ambele condiții de stimulare, observându-se o scădere a concentrației de anion superoxid cu 18% în celulele tratate cu **Sol-T** 70ng/ml și stimulate cu TNFα și PMA. În aceleași condiții, extractul **Sol-T** generează o acumulare de apă oxigenată în sistem, ceea ce poate avea ca rezultat o modificare a reactivității vasculare și poate conduce la toxicitate și la alterări ale homeostaziei la nivel vascular.

5.4. Simularea condițiilor pro-inflamatorii la nivelul țesutului cutanat pentru evaluarea impactului complexelor vegetale din *Solanum lycopersicum*, *Salvia officinalis* și *Arctium lappa* în patologii dermatologice

A. Inflamație dermo-epidermică

Inflamația și stresul oxidativ sunt procese aflate în interdependență, ce se pot desfășura simultan sau succesiv în patogeniza multor boli cronice. Deși identificarea și tratamentul disfuncțiilor primare sunt importante din punct de vedere clinic, statusul patologic este combătut cu dificultate datorită faptului că inflamația și stresul oxidativ acționează concertat, potențându-se reciproc pentru a induce daune progresive. Astfel, doar terapia antioxidantă este puțin probabil să prevină diferite patologii cauzate de stresul oxidativ cu componenta inflamatorie precum leziuni cutanate (plăgi cronice de diferite etiologii, psoriazis, acnee), dermatite sau complicațiile cardiovasculare și diabetice, bolile neurodegenerative, cancer. Există, deci, o serie de premise care impun cercetări în sensul valorificării resurselor naturale cu potențial terapeutic clar.

O atenție deosebită trebuie acordată selecției agenților antioxidanți și a dozei pentru a obține efectul dorit. Pe de altă parte, în testarea compușilor, se impune cuantificarea statusului redox și inflamator pentru interpretarea corectă a rezultatelor [Biswas, 2016]. Dacă numărul de celule activate este mare și inflamația se manifestă pentru prea mult timp pot rezulta disfuncții grave. Există unele dovezi ale rolului antiinflamator jucat de RONS (radicali liberi ai oxigenului, azotului și sulfului) eliberați de fagocite, care pot implica contribuția la chemotaxia și repararea țesutului afectat, precum și modularea răspunsului imun [Bickers și colab., 2003].

Este cunoscut faptul că o serie de citokine și factori de creștere sunt implicați în procesul de vindecare a rănilor care cuprinde trei etape generale: etapa inflamatorie ce constă în extravazarea componentelor sangvine producându-se agregarea plachetară, coagularea sângelui și migrarea celulelor inflamatorii la locul leziunii; etapa proliferativă ce implică migrarea și proliferarea keratinocitelor, fibroblaștilor și celulelor endoteliale, conducând la reepitelizarea și formarea țesutului granular și etapa de remodelare care durează un timp mai îndelungat [Hübner și colab., 1996].

IL-1 α , IL-6 și TNF α sunt citokine reprezentative puternic exprimate în procesele inflamatorii de la nivelul țesutului cutanat lezat. În procesul de vindecare a rănilor un rol activ îl au și chemokinele (IL-8), prin stimularea migrării celulelor inflamatorii, contribuind astfel la reglarea reepitelizării, remodelării tisulare și în angiogeneză. În timpul procesului de vindecare a rănilor, angiogeneza are un rol esențial în formarea țesutului granular nou în fază proliferativă, fiind evaluată prin monitorizarea expresiei factorului de creștere proangiogenic VEGF (factor de creștere endotelial vascular)[Toshikazu și colab., 2010, Goodman și colab., 2009].

Testările s-au realizat în cadrul a două modele experimentale, caracteristice țesutului dermo-epidermic, simulându-se agresiuni inflamatorii ce pot apărea în condițiile atacului fungic sau bacterian, respectiv inflamație de etiologie nedeterminată. Astfel, s-a imitat inflamația corelată cu stresul oxidativ celular prin 2 tipuri de stimulare:

- Inflamație bacteriană: LPS, un lipopolizaharid extras din bacteria *Escherichia coli* însoțită de declanșare de stres oxidativ (PMA) - 18 ore de stimulare
- Inflamație sistemică nespecifică (TNF- α), însoțită de declanșare de stres oxidativ (PMA) – TNF α 15ng/ml +PMA 0.1 μ M, 24 ore de stimulare.

Statusul inflamator s-a evaluat prin determinarea secreției citokinelor pro-inflamatorii (IL6, IL8, IL1 α) pe ambele tipuri celulare (keratinocite și fibroblaști), și a factorul VEGF, promotor de angiogeneza (metoda 4.2.7.-B) [Crăciun și colab., 2016; Crăciun și colab., 2017; Crăciun și colab., 2016].

Evaluare citokine pro-inflamatorii IL6, IL8, IL1 α și factor proangiogenic VEGF în condiții de stimulare nespecifică– linia celulară HaCaT

Cunoscându-se pe de o parte interdependența mecanismelor inflamatorii și oxidative la nivel celular și compoziția fitochimică a extractelor, și pe de altă parte ținând cont de rezultatele cercetării din etapa precedentă în care a fost demonstrat printr-un studiu experimental extins potențialul antioxidant al principiilor active bogate în compuși de tipul glicoalcaloizilor, acizilor triterpenici, fitoestrogenilor și polifenolilor, s-a dezvoltat un model experimental de evaluare a efectului antiinflamator cu exemplificare pentru extractele **Sol-T**, **SvPG**, **Al**, **Br**, **ET** și **TES**.

Dintre biocomplexele menționate, pentru evaluarea efectului antiinflamator, pe linia celulară standardizată de tip keratinocit s-au selectat extractele **Sol-T** și **SvPG** deoarece pe lângă susținerea teoretică pe baza datelor de literatură [Saba și colab., 2017; Friedman, 2013; Siddique și colab., 2019; Baricevic și colab., 2001] avem și susținerea experimentală evidențiată în cadrul modelului experimental antioxidant (vezi subcapitolele 5.2. și 5.3.).

Celulele au fost tratate cu extractul **Sol-T** și stimulate atât cu TNF α – 40ng/ml (mimează inflamația sistemică nespecifică), cât și cu LPS - 1 μ g/ml (stimul bacterian). S-au testat trei concentrații diferite de extract respectiv 20ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, comparativ cu un martor pozitiv – dexametazona 200ng/ml (antiinflamator cunoscut). Rezultatele sunt reprezentate în graficele de mai jos ca variație procentuală față de martorul corespunzător:

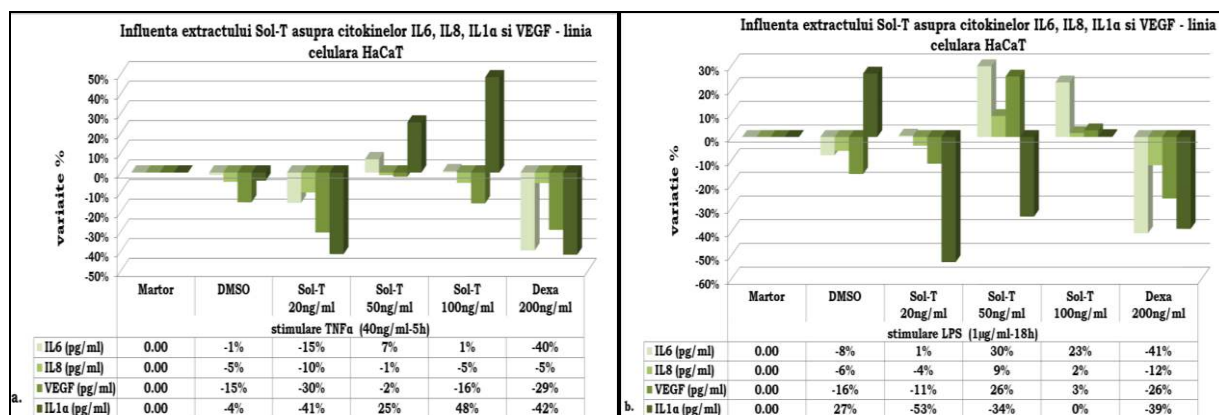


Figura 22. Variația procentuală a citokinelor pro-inflamatorii în prezența extractului **Sol-T** pe linia celulară HaCaT: a. stimulare TNFα (40ng/ml); b. stimulare LPS (1μg/ml)

Extractul **SvPG**, a fost testat din punct de vedere al efectului antiinflamator la nivel de keratinocit uman (HaCaT), în prezența stimulilor TNFα și PMA, iar rezultatele sunt reprezentate grafic ca modificare procentuală față de martorul corespunzător astfel:

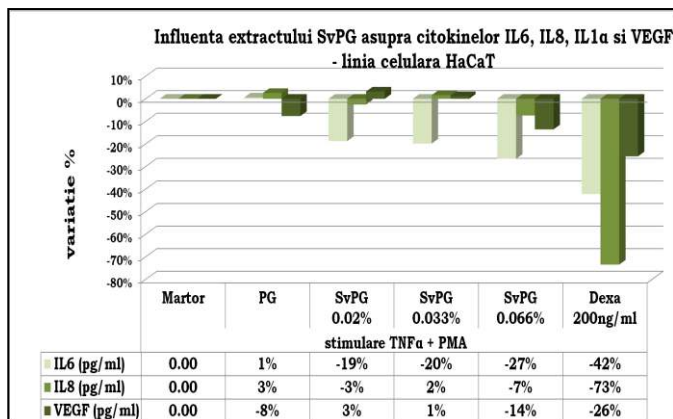


Figura 23. Variația procentuală a citokinelor pro-inflamatorii în prezența extractului **SvPG**, la nivelul keratinocitelor (linia celulară HaCaT)

IL8 în condiții de stimulare cu LPS și PMA– linia celulară HS-27

Pentru demonstrarea efectului antiinflamator al principiilor active din **Al**, **Br**, **ET** și **TES**, la nivelul dermului, au fost elaborate, optimizate și aplicate modele experimentale *in vitro* ce au vizat modularea expresiei citokinelor proinflamatorii (IL6, IL8) în condiții de mimare a inflamației dermice bacteriene însoțită de condiții prooxidante nespecifice.

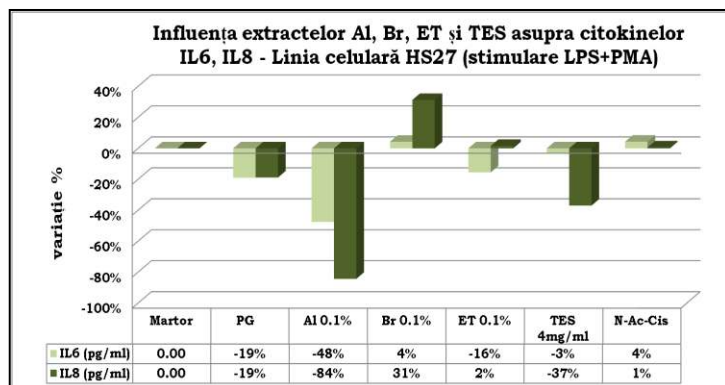


Figura 24. Variația procentuală a citokinelor pro-inflamatorii în prezența extractelor **Al**, **Br**, **ET** și **TES**, la nivelul fibroblaștilor (linia celulară HS-27)

Extractul glicoalcaloidic **Sol-T** inhibă eliberarea extracelulară a citokinelor IL6, IL8, IL1α, demonstrând efect antiinflamator și antiiritativ prin blocarea căilor de semnalizare coordonate de aceste citokine. Scăderea

factorului pro-angiogenic VEGF eliberat de keratinocite în condițiile stimulării cu $\text{TNF}\alpha$ și creșterea acestuia sub acțiunea LPS bacterian recomandă acest compus în afecțiuni dermatologice fără leziuni active (ex. dermatite, iritații cutanate, etc), respectiv vindecarea rănilor suprainfectate (induce formarea microvasculaturii dermice). Extractul de salvie (**SvPG**) stopează semnalizarea extracelulară generată de citokina IL6, cu relevanță inclusiv în maladii dermatologice grave de tipul psoriazis. La nivelul fibroblaștilor dermici, sub acțiunea unui stimul bacterian asociat cu un stimul generator de stres oxidativ, extractul **AI** acționează asupra citokinelor proinflamatorii, în sensul inhibării lor, demonstrând un efect antiinflamator pronunțat.

B. Inflamație vasculară, importantă în procese de regenerare și refacere post-traumatică

Celulele endoteliale din derm sunt implicate în vindecarea rănilor, inflamație, angieneză 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 turn-overul 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. Celulele endoteliale *in vitro* capătă o formă ușor elongată epiteloidă. În studiile recente, cultivarea *in vitro* a celulelor endoteliale primare se realizează prin încorporarea unui factor de creștere mitogen (VEGF) care funcționează ca un factor de supraviețuire a acestor celule prin supraexpresia Bcl-2. Există componente celulare, *in vitro* și *in vivo* care sintetizează și eliberează VEGF. [Bao și colab., 2009]

Unul din mecanismele fundamentale ale progresiei inflamației este dereglarea extravazării leucocitare de-a lungul endoteliului vascular și infiltrarea în țesutul adiacent.[Swerlick și colab., 1993; Peschen și colab., 1999] Leucocitele infiltrate secretă un nivel mare de mediatori de inflamație, perpetuând răspunsul inflamator, ceea ce are ca rezultat degradarea țesutului inflammat. Pentru invazia tisulară de către celulele inflamatorii este decisivă transmigrarea acestora de-a lungul endoteliului microvascular, proces mediat de moleculele de adeziune exprimate pe suprafața celulelor endoteliale din clasa CAM (cellular adhesion molecules) și de către receptorii lor corespunzători din leucocite. Datele de literatură evidențiază un rol diferențiat al moleculelor de adeziune ICAM și VCAM, inhibiția ICAM-1 fiind benefică pentru complicațiile dermice, în timp ce terapiile ce au ca țintă VCAM-1 combat maladiile cerebrale. [Norman și colab., 2008]

Există mai multe aspecte privind fiziologia vasculaturii dermice și implicarea acesteia 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. De exemplu GM-CSF și $\text{IL1}\alpha$ și β induc proliferarea celulelor endoteliale, iar IFN- γ și $\text{TNF}\alpha$ activează endoteliul prin expresia HLA-DR și ICAM-1.

- fenomenul de angieneză și proliferare celulară

Agenții antiinflamatori la nivel cutanat acționează prin inhibarea expresiei $\text{TNF}\alpha$ și a VCAM-1, inhibiție reversibilă. În mod similar, are loc și inhibiția VCAM-1 în celule endoteliale stimulate cu $\text{TNF}\alpha$ și $\text{IL1}\alpha$. Retinoizii inhibă proliferarea celulelor endoteliale, iar efectorii HLA-DR, induc expresia ICAM-1 prin IFN γ , $\text{TNF}\alpha$ și $\text{IL1}\alpha$. Efectul anti-inflamator al retinoizilor se poate explica și prin inhibiția expresiei genice a VCAM-1 și a legării celulelor T la celulele endoteliale tratate cu citokine.

Sistemele experimentale utilizate au constatat în stimularea diferențiată a celulelor endoteliale cu LPS, lipopolizaharid ce mimează infecția bacteriană, respectiv cu $\text{TNF}\alpha$ - stimul nespecific pentru inflamația sistemică. LPS este o componentă majoră a bacteriilor gram negative ce acționează ca endotoxină la nivel de organism animal, inducând un puternic răspuns imun și producând secreția citokinelor pro-inflamatorii. $\text{TNF}\alpha$ face parte din grupul citokinelor care stimulează reacția răspunsului inflamator de fază acută.

Inflamația vasculară s-a evaluat prin determinarea moleculelor de adeziune ICAM-1 și VCAM-1 prin marcarea cu anticorpi fluorescenți și achiziție de citometrie în flux (metoda 4.2.7.-B).

Parametrii relevanți pentru fiziologia țesutului cutanat pe care îi vom urmări sunt:

- stimularea cu LPS 1 $\mu\text{g/ml}$, stimul bacterian, urmată de analiza expresiei ICAM (caracteristic pentru microvasculatura dermică), citokinele inflamatorii IL6 și IL8.

- stimularea cu $\text{TNF}\alpha$ 20 ng/ml, stimul sistemic nespecific, urmată de analiza expresiei VCAM (caracteristic pentru vasele sanguine mari), citokinele inflamatorii IL6 și IL8.

În cele ce urmează vom prezenta rezultatele obținute pentru principalele tipuri de efecte urmărite.

Evaluare efect antiinflamator la nivel de celule endoteliale, prin monitorizarea expresiei citokinelor proinflamatorii IL6, IL8 și a moleculelor de adeziune ICAM, VCAM, în condiții de stimulare oxidativă nespecifică cu TNF α dar și cu mimarea infecției bacteriene cu LPS – Extract Sol-T, SvPG și Br.

Mecanism fiziologic relevant		Inflamație vasculară			
		IL-6	IL-8	ICAM-1	VCAM-1
<i>Salvia officinalis</i>	SvPG	HUVEC: TNF α +PMA: ↓23% LPS: ↓7%	HUVEC: TNF α +PMA: ↓40% LPS: ↓4%	HUVEC: TNF α +PMA: ↓12%	HUVEC: TNF α +PMA: ↓24%
<i>Arctium lappa</i>	Br	HUVEC: TNF α : ↓26% LPS: ↓30%	HUVEC: TNF α : ↓49% LPS: ↓51%	HUVEC: TNF α : ↓6% LPS: ↓14%	HUVEC: TNF α : ↓1% LPS: ↓7%
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sol-T	HUVEC: TNF α : ↓18% LPS: ↓7%	HUVEC: TNF α : ↓23% LPS: ↓4%	HUVEC: TNF α : ↑1% LPS: ↓19%	HUVEC: TNF α : ↓39% LPS: ↑28%

Pentru evaluarea efectului extractelor vegetale, SvPG, Sol-T și Br asupra statusului inflamator celular, celulele de endoteliu vascular (linia celulară HUVEC) au fost stimulate pro-inflamator cu TNF α și bacterian cu LPS. Dintre extractele testate, Sol-T prezintă un efect semnificativ în condiții de inflamație nespecifică indusă de TNF α , acționează prin reducerea expresiei extracelulare a citokinelor IL6 și IL8, manifestând astfel un efect antiinflamator la nivel de celulă endotelială. În aceleași condiții de stimulare, toate dozele testate de Sol-T reduc expresia VCAM (molecula de adeziune endoteliu-monocit specifică vaselor mari), precum și expresia ICAM caracteristică microvasculaturii. Atacul bacterian la nivel endotelial (stimulare cu LPS), este contracarat de extractul glicocalcoidic Sol-T care prezintă efect reducător asupra expresiei ICAM, parametru caracteristic vaselor sanguine mici.

5.5. Impactul extractelor vegetale de Salvia officinalis și Corylus avellana asupra interacțiunilor keratinocit – radiație UV

Mecanismele foto-oxidative dependente de speciile de oxigen reactive produse de radiația solară sunt principalele cauze ale foto-îmbătrânirii pielii și ale foto-carcinogenezei. Cercetarea din domeniul fotobiologiei se orientează preferențial asupra efectelor nocive ale radiației UVB și UVC implicate în carcinogeneza, dar în ultimii ani a apărut necesitatea studiilor privind rolul radiației UVA și a celei în vizibil apropiat în fotodegradare și fotoîmbătrânire [Stojiljković și colab., 2014].

Radiația UV duce la suprareglarea VEGF (vascular endothelial growth factor), un factor activ pro-angiogenic, pe calea de semnalizare MAPK/ERK kinase-ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), ceea ce duce la nivel *in vivo* la creșterea în dimensiune a vaselor de sange, a densității vasculare și a zonei de țesut dermic ocupate cu micro-vasculatura [Debaq-Chainiaux și colab., 2012]. De asemenea, radiația UV-A, dar și UV-B suprareglează VEGF și la nivelul keratinocitelor imortalizate (linia celulară HaCaT), acționând indirect și asupra sintezei și eliberării de IL-1, TNF- α , și a altor citokine pro-inflamatorii. [Kosmadaki și colab., 2003]. Supraexpresia VEGF duce la creșterea vascularizării pielii, la apariția microvasculaturii dermice fragile și sinuoase. Astfel, VEGF secretat de keratinocite trece prin membrana bazală epidermo-dermică ajungând la microvasculatura din derm. Epidermul normal exprimă un nivel scăzut al VEGF, în timp ce perturbări patologice de tipul psoriazisului, dermatitei de contact sau vindecarea rănilor suprareglează expresia VEGF în keratinocite.

Astfel, în cadrul studiilor privind patogeneza fotoîmbătrânirii sunt important de analizat următorii parametrii celulari: apoptoza celulară; perturbări ale secvențialității ciclului celular, stres oxidativ (apa oxigenată eliberată intracelular și anion superoxid); inflamație (citokine pro-inflamatorii IL6 și IL8; IL1 α); angiogeneza (factorul VEGF) [Detmar, 1994]. Citometria în flux oferă posibilitatea detecției simultane a apei oxigenate și a anionului superoxid eliberate intracelular prin dubla marcare fluorescentă cu DCFH-DA (emite în coordonate FITC-A și marcheaza apa oxigenată) și HE (emite în coordonate PE-A și marchează anionul superoxid).

Modularea mecanismelor celulare sub influența radiației UV, s-a realizat într-un sistem experimental [Dumitriu și colab., 2012] alcătuit din 3 serii, după cum urmează:

Iradierarea s-a realizat în condiții reproductibile cu un echipament de iradiere controlată: sistem Bio-Sun (producator Vilber-Lourmet).

În cadrul acestui model experimental, s-a urmărit studiul mecanismelor celulare implicate în afecțiuni degenerative ale țesutului cutanat, având ca material celular cultura de keratinocite (HaCaT), prin următoarele metode (descrise în capitolul special destinat): evaluarea procesului de apoptoză celulară (metoda 4.2.7.-D), testarea *in vitro* a capacității proliferative prin evidențierea generațiilor celulare succesive prin marcarea fluorescentă cu CFSE (metoda 4.2.7.-E), analiza secvențialității ciclului celular (metoda 4.2.7.-F), identificarea simultană a radicalilor oxigenați intracelulari și evaluarea statusului inflamator (metodele 4.2.7.-A și -B).

Mecanism fiziologic relevant	Iradiație UV			
	Apoptoză celulară	Ciclu celular	Stres oxidativ intracelular	Inflamație
SvPG			UV A: ↓ $O_2^{\cdot-}$; ↓ H_2O_2 UV B: ↓ $O_2^{\cdot-}$; ↓ H_2O_2	UV A: ↓ IL8 UV B: ↓ IL8
Al	protejează împotriva apoptozei	stopează cc	UV A: ↓ $O_2^{\cdot-}$; ↓ H_2O_2 UV B: ↓ $O_2^{\cdot-}$; ↓ H_2O_2	UV A: ↓ IL6 ; ↓ IL8 ; ↓ IL1-α ; ↓ VEGF UV B: ↓ IL6 ; ↓ IL8 ; ↓ IL1-α ; ↓ VEGF

Expunerea la radiația UV, poate induce efecte genotoxice, ce pot contribui nu doar la procesul de fotoîmbătrânire, dar și la carcinogeneză [El-Mahdy și colab., 2007]. Principiile active extrase din salvie (**SvPG**), acționează prin împiedicarea progresiei apoptozei timpurii în celulele iradiate cu UV-A sau UV-B. Extractul de salvie **SvPG** este deosebit de activ la nivelul reducerii radicalilor liberi oxigenați, apa oxigenată și anion superoxid, inducând scăderea intracelulară a acestora cu până la 60% în cazul apei oxigenate generate de iradierea UV-A, și cu 32% a anionului superoxid generat de UV-B.

Extractul **Al**, prezintă efect de reducere intracelulară a speciilor de oxigen reactive în special în condițiile iradierii UV-B, nemodificând impactul UV-A la acest nivel. Extractul de alun **Al** nu acționează asupra procesului apoptotic de la nivelul keratinocitelor iradiate, în schimb stopează progresia în ciclul celular, atât în cazul UV-A cât și UV-B, ceea ce semnifică o amplificare a degradării celulare în aceste condiții specifice și nu o protecție a celulelor normale în sensul prevenției malignizării și a stopării proliferării aberante. Extractul **Al** duce la scăderea fenomenului inflamator și de asemenea prezintă o acțiune antiangiogenică în cazul radiației UV-A.

5.6. Evaluarea acțiunii extractelor vegetale din *Salvia officinalis*, *Solanum lycopersicum*, *Corylus avellana*, *Arctium lappa*, *Trifolium pratense* și *Vitis vinifera* asupra regenerării cutanate

A. Regenerare epidermală prin stimularea procesului de diferențiere keratinocitară

Linia celulară HaCaT este imortalizată spontan și reprezintă principalul model de studiu în biologia pielii. În condiții tipice de cultivare celulele au un fenotip parțial sau complet diferențiat datorită conținutului mare de calciu din mediul de cultură și din serul fetal bovin. În condiții de cultivare la concentrații mici de calciu, celulele suferă o transformare reversibilă la fenotipul bazal, de la care, în condiții controlate prin concentrații progresive de calciu se pot induce stadii de diferențiere bine definite corespunzătoare stratului bazal, spinos, granulos sau corneum.

Determinarea acestor stadii de diferențiere se face prin evidențierea anumitor proteine exprimate specific, după cum urmează: Involucrina (stratul corneum și granulos), Transglutaminaza (stratul spinos), keratina K14 (stratul bazal). Concentrația externă de calciu reglează diferențierea keratinocitelor *in vitro*. Keratinocitele cultivate în mediu cu ioni de calciu 1.2mM și 2.4mM sintetizează involucrina și transglutaminaza înainte de a fi confluențe, fiind capabile la confluență să formeze învelișul cornificat.

Celulele au fost tratate cu substanțele de interes timp de 5 și respectiv 7 zile. Evidențierea celor trei proteine membranare – markeri de diferențiere a fost realizată prin marcarea cu anticorpi specifici (Anticorp pt citokeratina 5/14 conjugat cu PE; Anticorp primar pt involucrina cuplat cu anticorp secundar conjugat FITC; Anticorp primar pt transglutaminaza-1 cuplat cu anticorp secundar conjugat PE) și vizualizarea prin citometrie în flux (metoda 4.2.7.-G) [Craciun și colab., 2019].

Rezultatele privind evidențierea markerilor de diferențiere în prezența extractului **Sol-T** sunt prezentate în tabelele următoare.

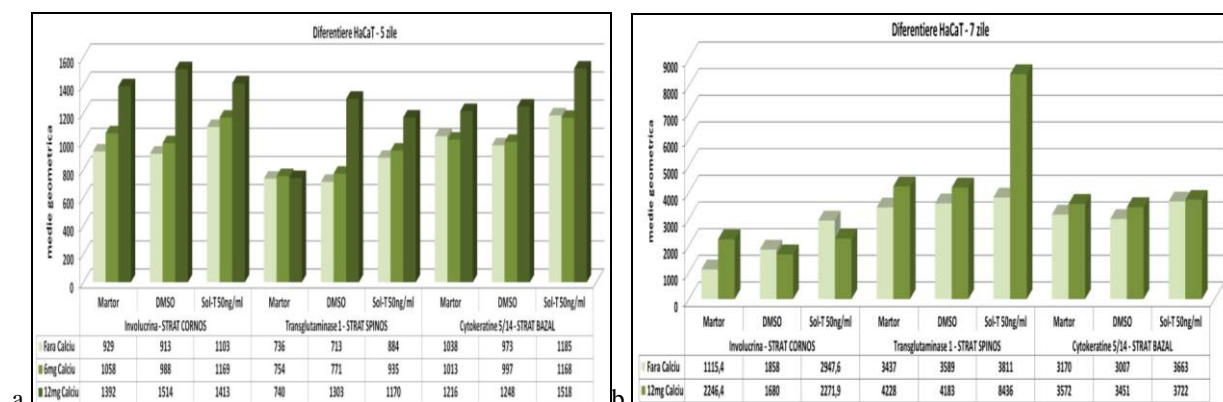


Figura 32. Evidențierea efectului extractului **Sol-T** asupra procesului de diferențiere keratinocitară după 5 (a.) și 7 (b.) zile de tratament

Status proliferativ indus de extractul **Sol-T** în condiții de cultivare în medii de diferențiere (cu concentrații diferite de calciu):

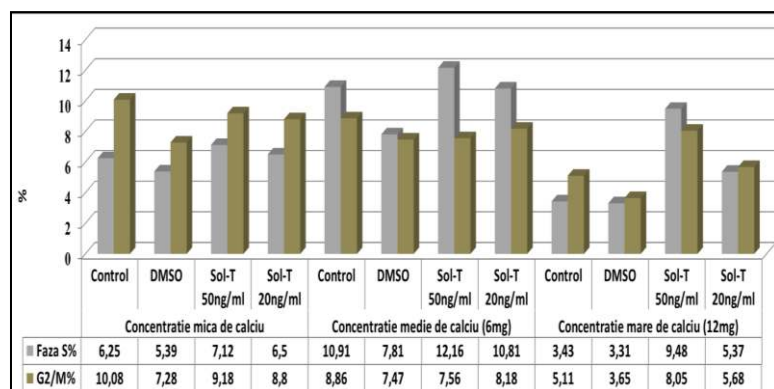


Figura 33. Secvențialitatea ciclului celular în condiții de diferențiere keratinocitară variabilă

Extractul **Sol-T** induce preponderent supraexpresiei transglutaminazei-1, deci progresia stratului spinos. Compuși bioactivi stimulează turn-overul keratinocitelor atât în condiții nediferențiate (mediu sărac în calciu), cât și în condiții de inducere a diferențierii (12mg calciu), efect ce susține procesul de regenerare epidermală.

Testarea compusilor bioactivi din complexul **TES** s-a realizat pe ambele mecanisme.

Celulele se tratează cu extractul bioactiv de struguri (TES) după 24h de la aderare și se analizează procesul de diferențiere după 7 zile de cultivare, schimbându-se mediul din 3 în 3 zile. Rezultatele sunt prezentate în graficele de mai jos:

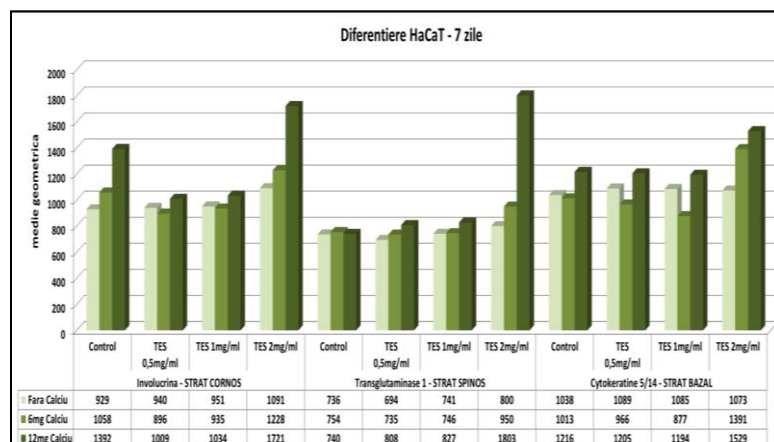


Figura 34. Expresia celor trei markeri de regenerare epidermică (Involucrina – strat corneum și granulos; transglutaminaza – strat spinos; citokeratina – strat bazal) în condiții de diferențiere keratinocitară variabilă

Secvențialitatea ciclului celular în condiții de diferențiere keratinocitară variabilă, este prezentată în graficele de mai jos:

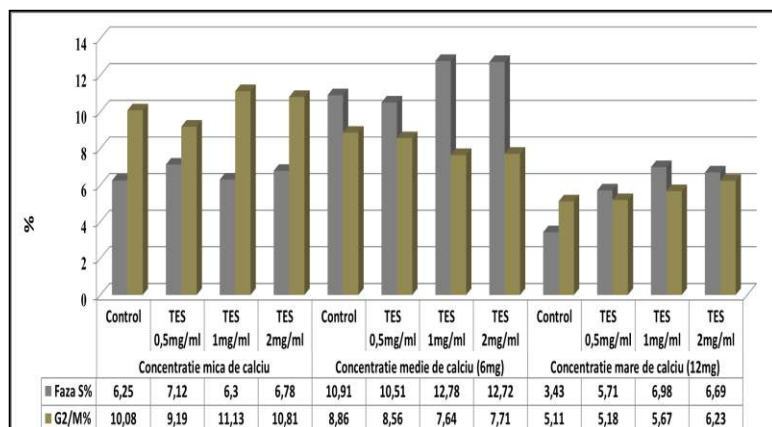


Figura 35. Efectul extractului TES asupra secvențialității ciclului celular la diferite concentrații de calciu

Extractul de struguri **TES** stimulează expresia citokeratinei, inducând diferențiere keratinocitară încă din stratul bazal, fără selectivitate în privința aportului de calciu în mediul extracelular. Aceasta sugerează un rol de inducere a regenerării intrinseci, independent de promotorii externi de diferențiere. Se remarcă, de asemenea, supraexpresia transglutaminazei-1, deci

progresia stratului spinos, dar și a involucrinei, caracteristică stratului corneum complet diferențiat, ambele în special în condițiile unui aport extracelular de calciu. **TES** stimulează turn-overul keratinocitelor atât în condiții nediferențiate (mediu sărac în calciu), cât și de inducere a diferențierii (12mg calciu), efect ce susține procesul complet de regenerare epidermală.

Pentru a evidenția la nivel *in vitro* acest proces de reînnoire a epidermei s-au analizat în prezența extractului **ET** mai mulți markeri de diferențiere aparținând diferitelor etape evolutive: keratina 5/14 – molecula care se exprimă doar în stratul bazal; transglutaminaza-1 în stratul spinos și involucrina în stratul granulos, stratul cornos fiind format numai din celule anucleate, neviabile.

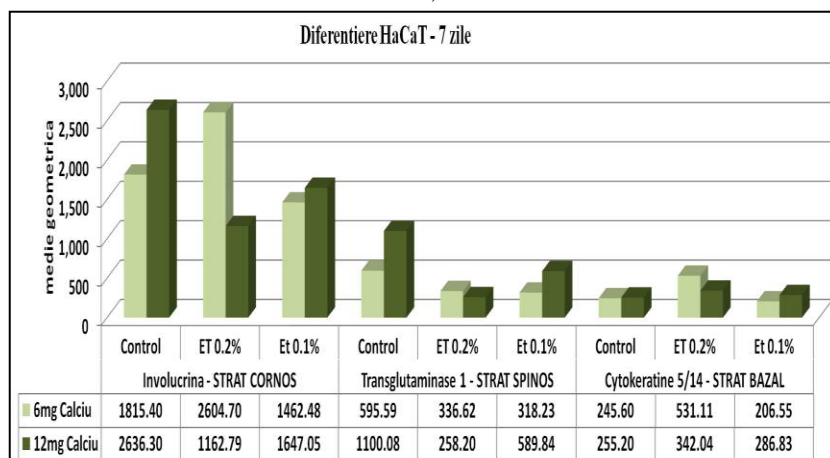


Figura 36. Evidențierea procesului de diferențiere la nivelul keratinocitelor tratate cu extractul de trifoi roșu **ET**

Extractul **ET** stimulează diferențierea acestora datorită impactului pozitiv asupra expresiei tuturor markerilor moleculari analizați în diferite stadii de cornifiere a pielii. Astfel este reliefat un aport important al fitocompușilor la procesul de reînnoire a epidermei și implicit la prevenția și încetinirea progresiei proceselor

degenerative de îmbătrânire a pielii, precum și refacere post traumatică în leziuni de diferite etiologii (arsuri, răni, infecții cutanate, etc).

B. Studii asupra homeostaziei matricei extracelulare secretată de fibroblăști dermici

Degradarea controlată a ECM este un proces necesar pentru migrarea celulelor, angiogeneza, reepitelizarea, degradarea provizorie a matricei și remodelarea tesutului granular nou format în timpul vindecării rănilor. ECM este compusă dintr-un amestec complex de molecule insolubile incluzând collagen, laminine, fibronectina, entactin/nidogen și proteoglicanii de tip heparan-sulfat, oferind un suport solid pentru celule. La nivelul ECM se găsesc de asemenea citokinele încorporate și factorii de creștere, precum și căile de comunicare între moleculele care alcătuiesc rețeaua ECM, facilitând migrarea celulară, aderența, contracția răni și epitelializarea. Turnoverul și remodelarea ECM trebuie să fie strict reglementată deoarece proteoliza necontrolată contribuie la o dezvoltare anormală și generează multe condiții patologice caracterizate prin degradarea excesivă, cum ar fi ulcerele cronice sau lipsa de degradare a componentelor ECM care conduc la fibroză [Meilang și colab., 2006, Eckes și colab., 2010].

Vindecarea leziunilor cutanate este un proces fiziologic complex, care presupune interacțiuni coordonate între diferitele sisteme biologice și imunologice, implicând o cascadă de pași și evenimente foarte precis organizate, ce se corelează cu apariția anumitor tipuri de celule la locul țesutului afectat de-a lungul diferitelor faze ale procesului de vindecare [Velnar și colab., 2009]. Refacerea leziunilor cutanate poate fi împărțită în mai multe etape dinamice incluzând: (i) formarea cheagului fibrinic și răspunsul inflamator; (ii) formarea țesutului granular care include reepitelizarea și angiogeneza; și (iii) formarea și remodelarea matricei extracelulare. Un echilibru dinamic între celulele endoteliale, trombocite, coagulare și fibrinoliza reglează hemostazia și determină cantitatea de fibrină depozitată la locul rănilor, influențând astfel progresul proceselor reparative [Meilang și colab., 2006, Velnar și colab., 2009].

Pentru refacerea stratului dermic, este necesară sinteza de către fibroblaști a fibrelor de collagen, a fibrelor elastice și a componentelor substanței de bază, dar și stabilirea unui raport optim activare / inhibiție pentru enzimele implicate în remodelarea matriceală. Sub acțiunea factorilor de creștere, (în special TGF- β), fibroblaștii secretă collagen în spațiul extracelular pentru formarea de țesut granular. Fibrele de collagen, regăsite în țesutul granular, sunt de tip I și III, iar la nivelul țesutului cicatrizant rezultat în urma procesului de remodelare matriceală, se regăsesc cu preponderență fibre de collagen de tip I [Nguyen și colab., 2009].

Procesul de refacere a țesuturilor lezate este controlat de anumite mecanisme reglatoare în vederea menținerii echilibrului între metabolism și catabolism, conducând în final la o vindecare normală. Metaloproteinazele matriceale (MMP), produse de neutrofile, macrofage și fibroblaști, sunt direct implicate în procesul de degradare a collagenului, activitatea lor fiind strâns legată și reglată de agenți inhibitori [Velnar și colab., 2009]. MMP nu sunt exprimate constitutiv în piele dar sunt induse temporar ca răspuns la semnale exogene ca citokine, factori de creștere, interacțiuni celulă – matrice, sau celulă – celulă. În procesul de refacere dermală, MMP sunt implicate în înlăturarea țesutului devitalizat, interacțiuni epidermo-mezenchimale în timpul migrării keratinocitelor, angiogeneza, remodelarea țesutului conjunctiv nou sintetizat în timpul procesului de maturare, reglarea activității anumitor factori de creștere [Kahari și colab., 1997].

Reglarea matricei extracelulare implică un echilibru între sinteza componentelor sale structurale și degradarea lor sub acțiunea catalitică a MMP – urilor a căror funcție biologică este modulată de inhibitori tisulari specifici ai metaloproteinazelor matriceale (TIMP). Suprareglarea activității MMP, favorizează degradarea proteolitică a membranei bazale și a matricei extracelulare, fiind corelată cu creșterea tumorală și metastaza, precum și cu angiogeneza asociată tumorilor, în timp ce inhibarea activității MMP pare a restricționa aceste procese [Kahari și colab., 1997].

MMP-urile sunt responsabile de degradarea proteinelor matricei extracelulare (ECM) cum ar fi collagenul, fibronectina, elastina și proteoglicanii, contribuind la procesul de fotoîmbătrânire. [Cavinato și colab., 2017]. MMP-9 (gelatinaza B), este produsă de keratinocitele umane și acționează asupra collagenul de tip IV, o componentă importantă a membranei bazale în piele. Ca și MMP-9, MMP-2 (gelatinaza A) este capabilă să scindeze collagenul de tip IV. În plus, ambele gelatinaze pot degrada alte substraturi cum ar fi collagenul de tip V, VII și X, fibronectina și elastina. Acestea sunt esențiale în degradarea fragmentelor de collagen fibrilar după degradarea lor inițială prin collagenaze [Pittayapruek și colab., 2016]. În timpul procesului de îmbătrânire, proteinele matricei extracelulare sunt susceptibile la activitate excesivă a enzimelor proteolitice-metaloproteinaze matriceale (MMP), fiind legate în cea mai mare parte la collagen și elastină. În condiții fiziologice adecvate, enzimele sunt reglate la nivel transcripțional și prin inhibitori proteici. Dezechilibrul în homeostazie duce la pierderea integrității țesutului, ceea ce poate duce la pierderea elasticității pielii.

De-a lungul timpului, s-au realizat numeroase studii privind rolul extractelor vegetale ca agenți de refacere a țesutului cutanat. Acești compuși bioactivi de tipul alcaloizilor, uleiurilor esențiale, flavonoidelor, taninurilor, terpenoidelor, saponinelor și compușilor fenolici, sunt cunoscuți ca fiind implicați în diferite faze ale procesului de vindecare, și datorită proprietăților lor multifuncționale (antiinflamatoare, antioxidante, etc.) [Tsala și colab., 2013].

Pentru evaluarea rolului extractelor vegetale în procesul de remodelare dermală, au fost utilizate metodele relevante, descrise în capitolul dedicat. Evaluarea procesului de sinteză de collagen în prezența principiilor s-a realizat prin determinarea collagenului intracelular total (prin marcarea cu kit-ul sirius Red/ Fast Green – metoda 4.2.8.). Evaluarea metaloproteinazelor matriceale secretate în mediul de creștere de către fibroblaștii dermici, s-a realizat prin zimografie (metoda 4.2.9.) [Crăciun și colab., 2019].

Determinarea collagenului total - marcarea cu Sirius Red/Fast Green

Fibroblaștii (HS27) au fost cultivați timp de 24 h în plăci cu 24 de godeuri în mediu de cultură DMEM, suplimentat cu 10 % ser fetal bovin și 1% antibiotic. Celulele au fost tratate timp de 48h dintre care 24h cu stimuli TNF α și PMA, respectiv LPS și PMA. După cele 48h, se colectează mediul de cultură (se va determina activitatea

metaloproteinazelor matriceale secretate în mediul extracelular). Rezultatele sunt reprezentate grafic ca variație procentuală a collagenului sintetizat față de martorul corespunzător:

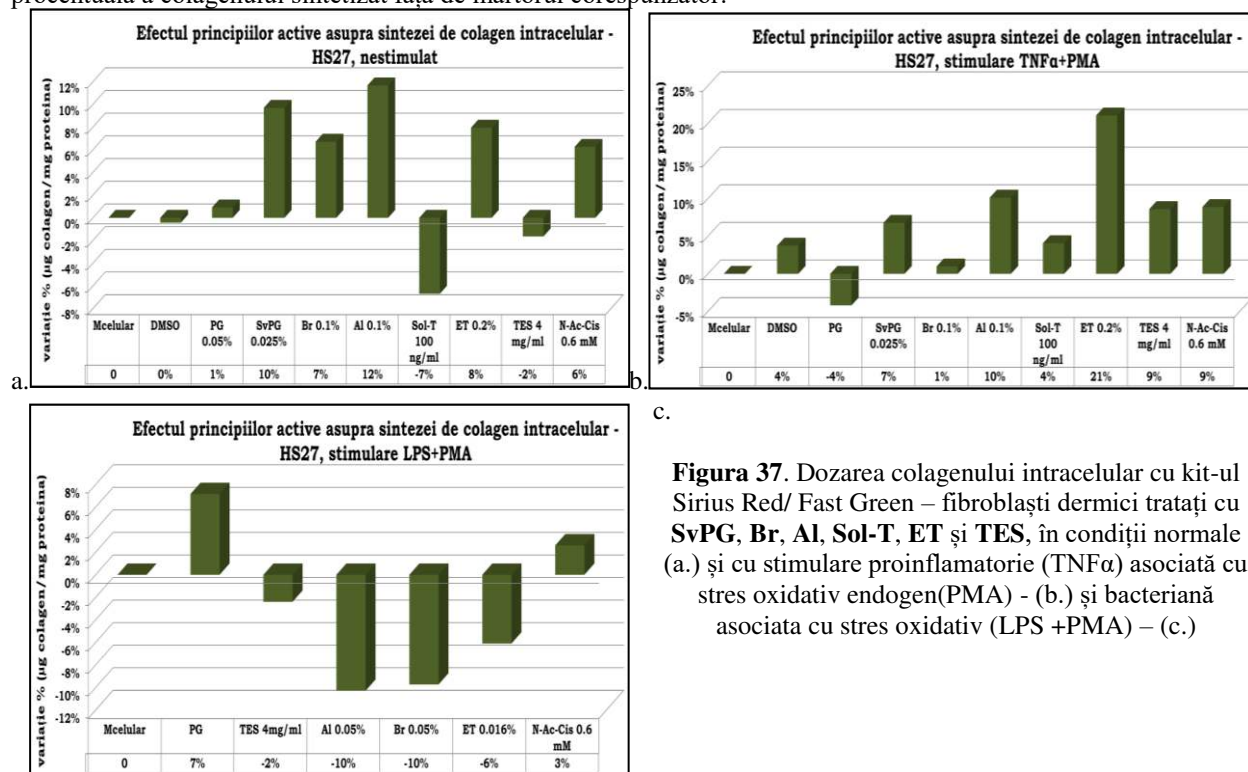


Figura 37. Dozarea collagenului intracelular cu kit-ul Sirius Red/ Fast Green – fibroblaști dermici tratați cu SvPG, Br, Al, Sol-T, ET și TES, în condiții normale (a.) și cu stimulare proinflamatorie (TNFα) asociată cu stres oxidativ endogen(PMA) - (b.) și bacteriană asociată cu stres oxidativ (LPS +PMA) - (c.)

Identificare și dozare metaloproteinaze matriceale

Este o metodă de estimare a concentrației de gelatinaze (MMP-2 și MMP-9) din mediul condiționat ce se bazează pe capacitatea acestor enzime de a se renatura după migrarea electroforetică în geluri de poliacrilamida-SDS copolimerizate cu gelatina și îndepărtarea SDS prin spălări repetate cu Triton X-100, enzimele exercitându-și astfel activitatea proteolitică asupra substratului copolimerizat pe parcursul a 18h de incubare la 37°C într-un tampon corespunzător. Zimogramele au fost scanate și analizate semi-cantitativ cu softul ImageJ prin densitometria benzilor proteice cu activitate enzimatică ce apar ca plaje de liză, iar identificarea tipului de MMP s-a realizat pe baza maselor moleculare.

Expresia metaloproteinazelor matriceale în prezența extractelor SvPG, Br, Al, Sol-T, ET și TES, este redată în figura de mai jos:

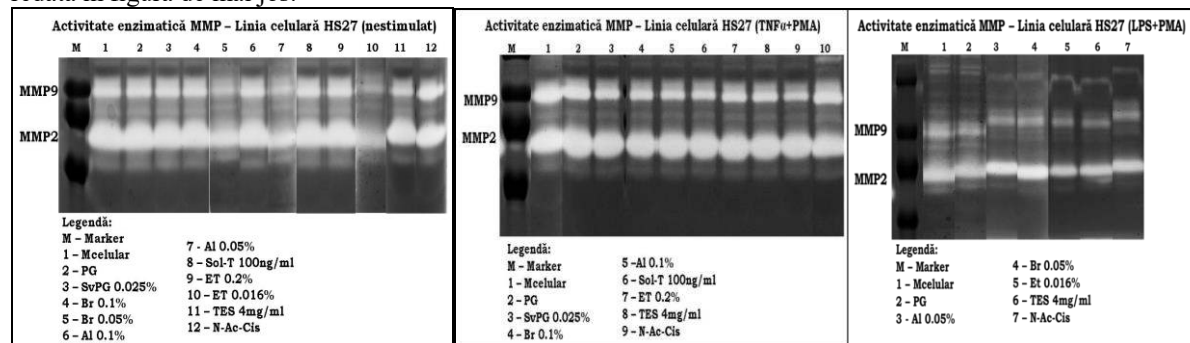


Figura 38. Influența extractelor bioactive asupra activității enzimatică a MMP secretate de fibroblaști: a. nestimulați; b. stimulați cu TNFα + PMA și LPS+PMA

În cadrul acestui model experimental, a fost evaluat efectul extractelor bioactive din *Salvia officinalis* (SvPG), *Solanum lycopersicum* (Sol-T), *Corylus avellana* (Al), *Arctium lappa* (Br), *Trifolium pratense* (ET) și *Vitis vinifera* (TES) asupra procesului de regenerare cutanată prin monitorizarea a două fenomene importante la nivel dermo-epidermic, respectiv diferențiere keratinocitară și remodelare matriceală la nivel de fibroblast dermic.

Mecanism fiziologic relevant: Regenerare cutanată prin		Diferențiere keratinocitară	Sinteza Colagen	MMP
Sursa vegetală/ extract				
<i>Salvia officinalis</i>	SvPG		stimulează sinteza de colagen – 7%	↓↓↓
<i>Arctium lappa</i>	Br		stimulează sinteza de colagen – 12%	↓↓↓↓
<i>Corylus avellana</i>	Al		stimulează sinteza de colagen – 7%	↓↓↓↓
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sol-T	supraexpresia transglutaminazei-1, 7 zile; efect regenerativ epidermal	nu influențează semnificativ procesul de sinteză a colagenului	↓↓↓
<i>Trifolium pratense</i>	ET	efect regenerativ	stimulează sinteza de colagen – 21%	↓↓↓↓
<i>Vitis vinifera</i>	TES	stimulează turn-overul keratinocitelor; efect regenerativ complet	stimulează sinteza de colagen – 9%	↓↓↓↓

Din analiza datelor experimentale, atât în condiții de inducere a diferențierii (prin aport de calciu în mediul extracelular), cât și în mediu sărac în calciu, este reliefat un aport important al fitocompușilor testați în procesul de reînnoiere a epidermului și implicit la prevenția și încetinirea progresiei proceselor degenerative de îmbătrânire a pielii, precum și refacere post traumatică în leziuni de diferite etiologii (arsuri, răni, infecții cutanate, etc). Dintre extractele testate, se remarcă: extractul **Sol-T** induce preponderent supraexpresiei transglutaminazei-1, deci progresia stratului spinos; extractul din deseuri de struguri **TES** stimulează expresia citokeratinei, inducând diferențiere keratinocitară încă din stratul bazal și supraexpresia transglutaminazei-1, deci progresia stratului spinos, dar și a involucrinei, caracteristică stratului corneum complet diferențiat; extractul **ET** stimulează diferențierea keratinocitară datorită impactului pozitiv asupra expresiei tuturor markerilor moleculari analizați în diferite stadii de cornifiere a pielii.

Dintre fitocompușii bioactivi testați, extractele **ET** și **TES** prezintă un efect stimulant semnificativ al sintezei de colagen la nivelul fibroblaștilor dermici, atât în condiții bazale, cât și în condiții de stimulare nespecifică cu TNF α și PMA, contribuind astfel la procesul de regenerare dermică.

Metaloproteinele matriceale au o importanță deosebită în remodelarea tisulară și în vindecarea rănilor, dar reprezintă și un element important în progresia bolilor inflamatorii și în invazia tumorală (activitatea proteolitică a protein-enzimelor fiind corelată cu potențialul metastazic al celulelor tumorale). În urma evaluării activității enzimice a metaloproteinelor matriceale secretate în mediul de cultură extracelular de către fibroblaștii dermici, în prezența extractelor bioactive, se remarcă următoarele: extractele **ET** și **TES**, acționează asupra metaloproteinelor în sensul scăderii activității acestora atât în condiții bazale cât și în urma stimulării cu agenți proinflamatori și bacterieni. Același efect inhibitor asupra metaloproteinelor, îl manifestă și extractul **Sol-T**, care intervine mai pronunțat asupra MMP9, reducându-i activitatea cu până la 27%. Același efect inhibitor se observă și în cazul celulelor stimulate proinflamator și bacterian, și tratate cu extractele de brusture (**Br**) și alun (**Al**).

5.7. Mecanisme implicate în progresia melanomica modulate de asocieri de fitocompuși biologic activi din trifoi roșu și deseuri de struguri

Incidența cancerului de piele are la baza o serie de agenți cauzali, dintre care cel mai important fiind radiația UV, dar și anumiți virusi, compuși mutageni din produsele alimentare sau din substanțe chimice, susceptibilitatea genetică, joacă un rol la fel de important în apariția acestei afecțiuni. Apariția cancerului de piele poate fi prevenită prin eliminarea acestor factori externi și poate fi îndepărtat eficient prin împiedicarea alimentării cu sânge a tumorii (anti-angiogeneză), stopând creșterea tumorală și astfel crește rata de supraviețuire a pacientului. Majoritatea celulelor canceroase dezvoltă modalități de evitare a apoptozei sau prezintă mecanisme de apoptoză defectă, permițând astfel dezvoltarea necontrolată a celulelor. Melanomul malign al pielii este cea mai gravă formă de cancer de piele, apare în melanocitele epidermale și este o malignitate refractară la tratament și metastază, a cărei incidență a crescut constant și semnificativ în ultimele decenii [D’Orazio și colab., 2013].

În cultura de celule de melanom uman expresiile crescute ale MMP-1, MMP-2 și MMP-9 s-au dovedit a fi corelate cu migrația și invazia tumorală. În leziunile melanocitare umane s-a demonstrat o corelație pozitivă între progresia tumorii și expresia MMP-2. Creșterea expresiei MMP-9, pe de altă parte, a fost găsită în principal în faza de creștere radială a melanomului primar, indicând faptul că expresia MMP-9 se corelează cu invazia timpurie a melanomului [Neufeld și colab., 1994].

Efectele adverse severe ale agenților chimioterapeutici precum și dezvoltarea unei rezistențe a organismului la mai multe medicamente utilizate în terapia cancerului, au determinat dezvoltarea unor strategii de eliminare a acestora, strategii ce abordează utilizarea nanoparticulelor, lipozomilor și vehiculelor de eliberare micelară a medicamentelor, cu unele succese raportate [Iyer și colab., 2013]. Datorită acestor efecte nedorite asociate cu terapia

convenționala a cancerului, de-a lungul timpului a devenit tot mai pregnantă necesitatea unor scheme de tratament alternativ în care principiile active din surse naturale au fost preferate în detrimentul celor de sinteză.

Compusii fitochimici care au proprietăți anti-inflamatorii, imuno-modulatoare și anti-oxidante, au, în general, cel mai mare potențial de a manifesta comportamente chimio-preventive în cancerele de piele. S-au făcut numeroase încercări pentru a găsi o corelație între proprietățile antioxidante ale fitocompuşilor și potențialul lor anti-cancer. Deși nu s-a constatat nici o dovadă concretă a unei astfel de corelații, activitatea antioxidantă a unui fitocompus este considerată ca o indicație a potențialei activități anticanceroase. Carotenoizii, flavonoidele și terpenoidele sunt unele dintre grupurile de fitocompuși cu potențial ridicat anticancerigen [Agrawal, 2011].

Resveratrolul (compus regăsit în cantități semnificative în struguri) a fost investigat ca agent anti-cancer și s-a constatat că acesta este capabil să inhibe creșterea celulelor melanotice și amelanotice prin inducerea apoptozei. Potența resveratrolului a fost demonstrată prin capacitatea sa de a induce apoptoza în celulele melanomului murin rezistent la doxorubicină și capacitatea sa de a inhiba creșterea tumorilor melanomului rezistent la doxorubicină la șoareci. Resveratrolul are un potențial anti-metastatic, deoarece s-a raportat că inhibă tranziția epitelială indusă de lipopolizaharide până la tranziția mezenchimală, posibil prin inhibarea semnalizării NF-kB. Există, de asemenea, potențialul de aplicare a resveratrolului ca sensibilizator la radiații în tratamentul melanomului, deoarece s-a observat că celulele melanomului rezistent la radiații au răspuns bine la o combinație de tratament de resveratrol și radiație [Niles și colab., 2003].

Trifoiul roșu (*Trifolium pratense*) este o plantă medicinală utilizată tradițional în tratamentul afecțiunilor cronice ale pielii, ce conține cel puțin patru izo flavone estrogenice: formononetin, biocanina A, daidzeina și genisteina. Pe lângă activitatea lor estrogenică, fitoestrogenii prezintă de asemenea și activități nonhormonale ca cea antioxidantă dar sunt și potențiali agenți antitumorali. De exemplu, s-a demonstrat efectul anticarcinogenic al genisteinei *in vitro*, probabil datorită activității inhibitorii asupra protein-tirozinaz-kinazei și asupra angiogenezei [Kolodziejczyk-Czepas, 2012].

Mecanismele țintă studiate în vederea completării profilului citotoxicitate / eficacitate sunt: sinteza de melanină ca parametru indicator al malignizării; invazivitate tumorală exprimată prin activitatea metaloproteinazelor (MMP 2 și MMP 9); semnalizare inter-celulară prin factorul pro-angiogenic VEGF și citokina IL6; status proliferativ și pro-apoptotic în melanom în condițiile iradierii UV (metode descrise în cadrul capitoului special dedicat) [Crăciun și colab., 2018].

Linia celulară standardizată utilizată este cea de melanom murin - *B16-F10* – cu relevanță și predictibilitate în patologia umană. Celulele au fost cultivate în mediu de cultură DMEM cu 10% ser fetal bovin, 1% soluție antibiotic/ antimicotic, în condiții standard (37°C, 95% aer umidificat și 5% CO₂) 24 de ore înainte de tratament și 48 de ore cu substanțe testate.

Cele două extracte de testat s-au combinat în următoarele proporții: TES:ET_A1= 1:9; TES:ET_A2= 1:5; TES:ET_A3= 1:3; TES:ET_A4= 2:9. Experimentele s-au realizat în triplicat, datele prezentate fiind media valorilor obținute în cele 3 serii experimentale succesive, având ca martori pozitivi: Metotrexat 10mg/ml – agent antiproliferativ cu spectru larg; Colchicina 2μM – antitumoral activ în blocarea ciclului de diviziune celulară.

Evaluarea melaninei ca parametru indicator al malignizării:

Pigmentii melaninici sunt produși la mamifere în special ca protecție față de radiația UV, în special UV-B, direct absorbită de ADN-ul celular. Radiația UV-A acționează în special prin fotosensibilizare, generând specii radicalice ce degradează ADN-ul și alte componente celulare. UV-A penetrează în derm, mai profund decât UV-B, fiind sursa majoră de radiație UV responsabilă de producerea unor anumite tipuri de cancer de piele [Chiarelli-Neto și colab., 2014; Jimbow și colab., 1993].

Rezultatele relevante pentru acțiunea compuşilor TES și ET, singuri și asociați în proporțiile selectate sunt prezentate în tabelul de mai jos:

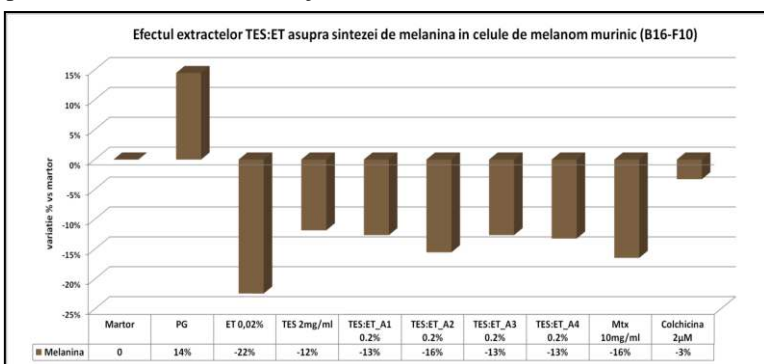


Figura 39. Determinarea sintezei de melanina secretată de celule B16-F10 în prezența combinațiilor TES:ET. Absorbanta pigmentilor melaninici se citește la 450nm.

Evaluarea indicatorilor de invazivitate: VEGF, IL6, Metaloproteinaze (MMP)

Screeningul la nivel de factor pro-angiogenic VEGF și citokina IL6 s-a realizat inițial în condiții bazale de dezvoltare în cultura a melanomului din linia celulară B16-F10, conform descrierii anterioare. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

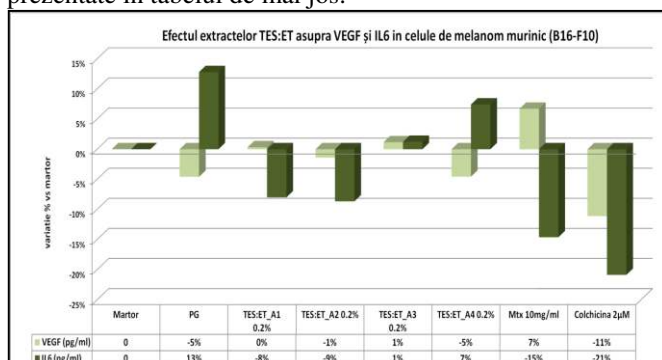


Figura 40. Determinarea VEGF și IL6 în linia celulară B16-F10 în prezența combinațiilor TES:ET.

Expunerea culturii celulare la radiația UV-A și UV-B s-a realizat în doze controlate (UV-A - 10J/cm²; UV-B - 1J/cm², system BIOSUN / Vilber Lourmat). Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

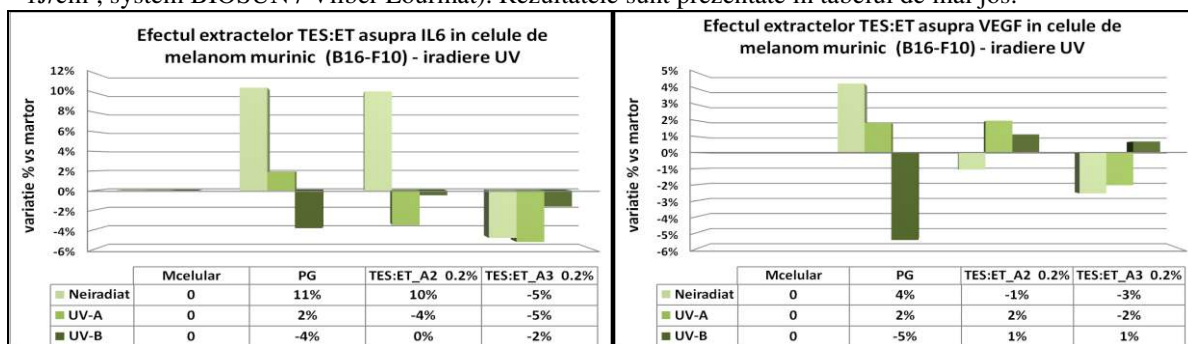


Figura 41. Determinarea VEGF și IL6 în linia celulară B16-F10 neiradiat/ UV-A/ UV-B în prezența extractelor TES:ET_A2 și TES:ET_A3.

Amestecul TES:ET_A3 intervine doar în condițiile iradierii UV-A în cascadele de propagare tumorală coordonate de IL6, prin inhibarea acestora, extractele nefiind active după iradierea UV-B.

Evaluarea efectului extractelor TES:ET asupra activității enzimatice a MMP secretate în mediul de cultură B16-F10:

Melanomul cutanat reprezintă cea mai des întâlnită tumoră malignă la tineri și se caracterizează printr-o capacitate mare de invazie și metastază. În acest proces degradarea ECM și membranei bazale cu enzime proteolitice este un pas esențial, în care MMP joacă un rol important. Supraexpresia, MMP-2 și MMP-9 a fost implicată în migrația și invazia celulelor de melanom S-a arătat că o activitate crescută a MMP-2 este asociată cu progresia tumorală în mai multe tipuri de tumori (tumori cerebrale, carcinom gastric). În leziunile melanocitare, s-a constatat o corelație între exprimarea metaloproteinazei MMP-2 și slăbirea structurii arhitecturale, creștere atipică și metastaze hematogene. Spre deosebire de MMP-2, care a fost asociată cu progresia melanomului, MMP-9 a fost exprimată numai în melanoamele primare avansate și a fost absentă în liniile celulare din etapa incipientă leziunilor primare. [Hofmann și colab., 2000].

În urma migrării electroforetice, zimogramele au fost scanate și analizate semi-cantitativ cu softul ImageLab prin densitometria benzilor proteice cu activitate enzimatică ce apar ca plaje de liză, iar identificarea tipului de MMP s-a realizat pe baza maselor moleculare. Rezultatele sunt reprezentate în graficele de mai jos, ca modificare procentuală față de martorul corespunzător.

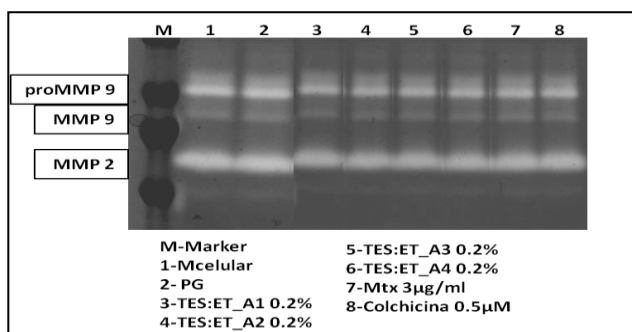


Figura 42. Determinarea activitatii MMP in linia celulara B16-F10 neiradiat în prezența combinațiilor TES:ET.

În condițiile iradierii UV, activitatea enzimatică a MMP secretate în mediul de cultură de celulele melanomice, au fost testate doua dintre cele patru combinații de extracte, respectiv TES:ET_A2 și TES:ET_A3. Zimogramele și cuantificarea benzilor de liză, sunt reprezentate în figura de mai jos:

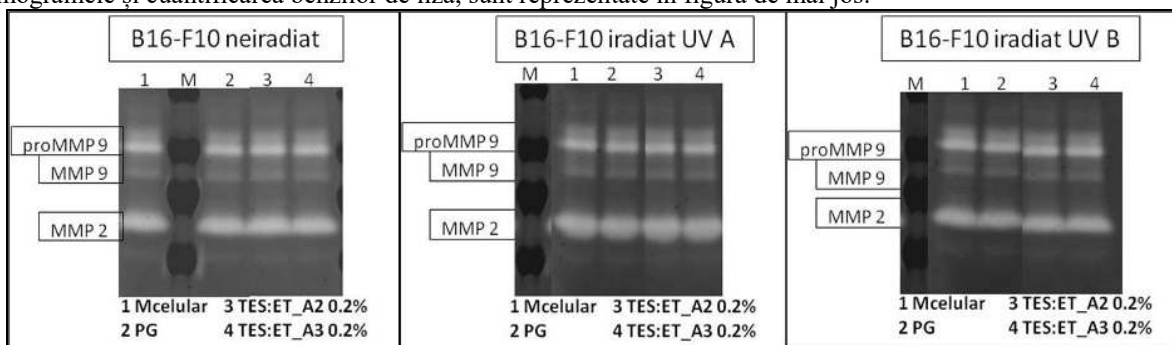


Figura 43. Determinarea activitatii MMP in linia celulara B16-F10 iradiat cu UV-A/ UV-B in prezența combinațiilor TES:ET

Status proliferativ si pro-apoptotic in melanom in conditiile iradierii UV

Studiile au urmarit evidentiarea principalelor procese implicate in progresia tumorală (apoptoza si secventialitatea ciclului celular) in linia celulara de melanom murin B16-F10, in model experimental de iradiere UV. Mecanismele urmarite in testarea acestor extracte, in cadrul modelului de iradiere, au fost urmatoarele: evaluare a procesului apoptotic; evaluare a statusului proliferativ prin evidentiarea generatiilor succesive si a secventialitatii ciclului celular.

S-au realizat 3 serii experimentale ce au constat in celule B16-F10 neiradiate, iradiate UV-A (9J/cm²) si UV-B (1J/cm²). Celulele au fost lasate sa adere 24h, apoi tratate cu extractele timp de 6h, iradiate si cultivate inca 24h in prezenta extractelor. Au fost analizate apoptoza si secventialitatea ciclului celuler, conform metodelor descrise in cadrul capitolului dedicat. Rezultatele sunt prezentate in tabelele de mai jos:

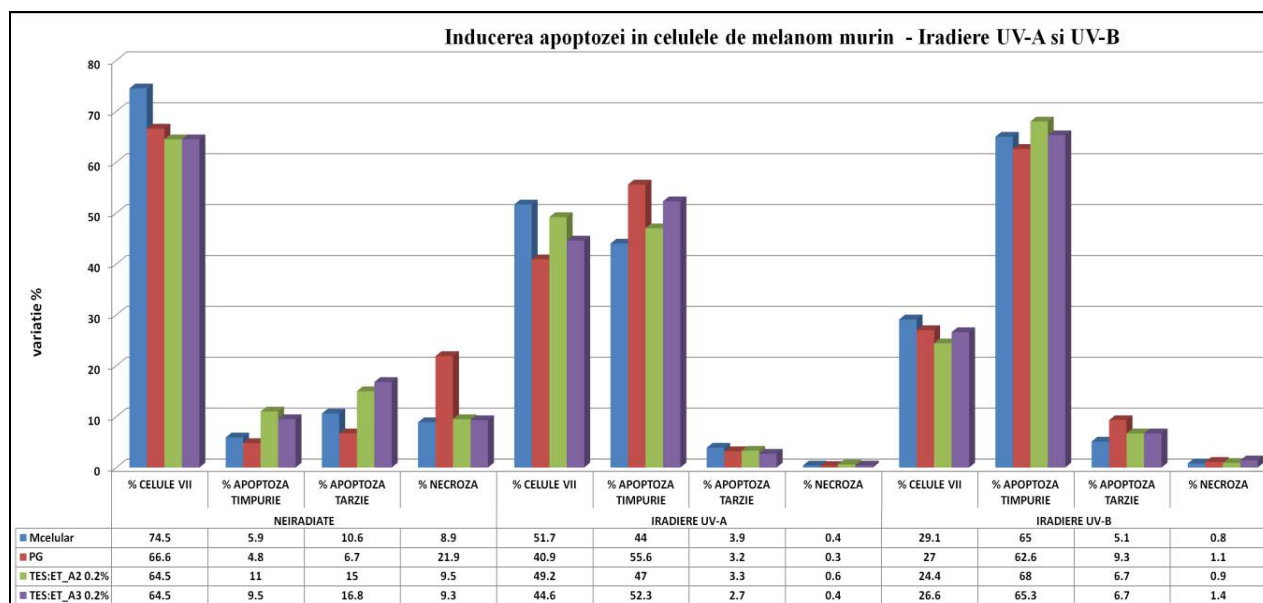


Figura 44. Apoptoza celulelor de melanom murin B16-F10 in prezenta TES:ET

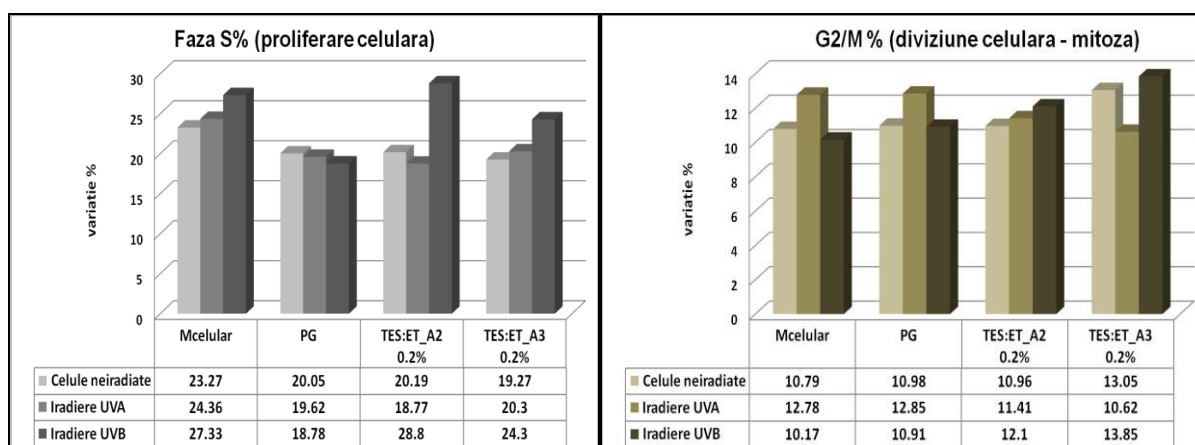


Figura 45. Secventialitatea ciclului celular in conditii de iradiere cu UV-A si UV-B pe linia de melanom murin B10-F16

Secventialitatea ciclului celular nu se modifica in conditiile de iradiere testate, mentinand aceeasi rata de multiplicare accelerata specifica melanomului. Combinatiile de tip A2 si A3 asigura un efect concertat de reducere a propagarii tumorale pe cele doua mecanisme mai sus mentionate. In conditii de iradiere, extractele actioneaza doar in cazul UV-A, mentinand tendinta observata in stadiul bazal. Radiatia UV-B este mult mai agresiva, inducand apoptoza in majoritatea populatiei celulare, prin generare de specii de oxigen reactive.

În cultura de celule de melanom uman expresiile crescute ale MMP-1, MMP-2 și MMP-9 sunt corelate cu migrația și invazia. În leziunile melanocitare umane s-a demonstrat o corelație pozitivă între progresia tumorii și expresia MMP-2. Creșterea expresiei MMP-9, pe de altă parte, a fost găsită în principal în faza de creștere radială a melanomului primar, indicând faptul că expresia MMP-9 se corelează cu invazia timpurie a melanomului [Neufeld și colab., 1994]. In conditii de iradiere UV, se observa un efect inhibitor mai pronuntat asupra MMP 9 si MMP 2, in cazul celulelor tratate cu cele doua amestecuri de extracte, atenuand caracterul invaziv al melanomului murin.

Studiile au urmarit si evidentiarea principalelor procese implicate in progresia tumorala (apoptoza si secventialitatea ciclului celular) in linia celulara de melanom murin B16-F10, in model experimental de iradiere UV. Amestecurile de tip TES:ET_A2 si TES:ET_A3 asigura un efect concertat de reducere a propagarii tumorale pe cele doua mecanisme mai sus mentionate. In conditii de iradiere, extractele actioneaza doar in cazul UV-A, mentinand tendinta observata in stadiul bazal. Radiatia UV-B este mult mai agresiva, inducand apoptoza in majoritatea populatiei celulare, prin generare de specii de oxigen reactive.

CONCLUZII FINALE

Cercetările întreprinse pentru realizarea tezei de doctorat au abordat un studiu complex privind acțiunea unor extracte vegetale bogate în polifenoli, acizi triterpenici, acizi polifenilcarboxilici, poliacetilene, antociani, flavone, glicoalcaloizi steroidici, fitoestrogeni, asupra sistemelor celulare ale țesutului cutanat, pentru restabilirea homeostaziei proceselor fiziologice și patologice dereglate de acțiunea radicalilor liberi. Algoritmul de teste și analize parcurs în cadrul prezentei teze a luat în considerare un screening de parametri relevanți pentru sistemul pro și anti-oxidant acelular pentru o rezultanta obiectivă a datelor de cercetare. Rezultatele obținute aduc plus-valoare în know-how-ul de produs și mecanisme asociate pentru potențial terapeutic crescut în vederea valorificării compușilor naturali din *Salvia officinalis*, *Arctium lappa*, *Corylus avellana*, *Trifolium pratense* și a unor deșeuri vegetale din specii de *Solanum lycopersicum* și *Vitis vinifera*.

Prin urmare au fost elaborate modele experimentale *in vitro* semnificative pentru descrierea proceselor fiziologice și patologice din cadrul statusului celular disfuncțional cu privire la generarea de radicali liberi *in situ* pentru evaluări acelulare; stimulare pro-inflamatorie diferențiată, patologic-specifică: TNF- α (localizare sistemică, prima linie de generare a cascadelor de propagare a inflamației), PMA (pro-oxidant, promotor de inflamație), LPS (infecție bacteriană în leziuni cutanate); expresie molecule de adeziune monocit-endotelială și corelații cu eliberare citokinică în inflamația vasculară; fenomene pro-oxidative și pro-inflamatorii generate de radiația UV cu impact în proliferare și apoptoză la nivel de celulă normală – fibroblast, respectiv melanom; regenerare dermo-epidermică post-lezională, exprimată prin diferențiere keratinocitară și raport optim sinteză/ degradare colagen.

Profilul eficacității / toxicității biocomplexelor luate în studiu și supuse investigării multifactoriale în evenimente/ procese specifice celulare și moleculare a rezultat din analize avansate a relațiilor de interdependență a efectelor *in vitro*, sintetizând următoarele:

A. Screening general, la nivel acelular și celular, privind acțiunea antioxidantă/ antiradicalică a extractelor vegetale:

- Cele 3 metode corelative de evaluare a **capacității antioxidante/ antiradicalice**, aplicate în screeningul antioxidant primar au evidențiat capacitatea biocomplexelor studiate (**SvPG, Al, Br, ET, TES**) de a capta radicalii liberi, direcționând utilizarea acestora în elaborarea unor modele experimentale *in vitro* de screening antioxidant la nivel celular. Acestea vizează modularea principalelor căi metabolice de contracarare a speciilor reactive de oxigen implicate în inițierea și propagarea diferitelor patologii (ateroscleroză, cancer, diabet, afecțiuni hepatice, inflamație, leziuni cutanate, artrita, etc.).
- **La nivel intracelular, în sistemul enzimatic Superoxid dismutaza/ Catalaza** ce implică și generarea și transformarea speciilor reactive de oxigen, biocomplexele **Sol-T, TES, Al și Br**, intervin asupra activității enzimelor implicate în cascada endogenă antioxidantă contracarând atacul radicalilor liberi, prin eliminarea celor de tipul anionilor superoxid și peroxizilor sub acțiunea SOD și respectiv CAT.
- Extractele **SvPG și Sol-T**, demonstrează un **efect antioxidant pronunțat la nivel dermo-epidermic**, prin reducerea speciilor oxidative ($O_2^{\cdot-}$ și H_2O_2) evaluate, **contribuind la protecția celulară în inflamația cutanată asociată infecțiilor bacteriene**. În cazul mimării unor condiții de stres oxidativ endogen (PMA) simultan cu inflamația bacteriană (LPS), nivelul SRO intracelulare, este puternic scăzut în prezența extractului **Al**, manifestând un **efect protector împotriva atacului bacterian asociat afecțiunilor cutanate (arsuri, răni deschise, acnee etc.)**.
- Extractul de salvie **SvPG**, **inhibă producerea de specii reactive de oxigen în celulele endoteliale** stimulate cu TNF α și PMA, efectul fiind unul comparabil cu cel al martorului pozitiv testat în aceleași condiții experimentale. Extractul glicoalcaloidic **Sol-T**, indică un efect reducător asupra anionului superoxid în ambele condiții de stimulare, dar generează o acumulare de apă oxigenată în sistem, ceea ce poate avea ca rezultat o modificare a reactivității vasculare și poate conduce la toxicitate și la alterări ale homeostaziei la nivel vascular.

B. Impactul complexelor vegetale asupra statusului inflamator la nivelul țesutului cutanat prin simularea unor agresiuni inflamatorii (atac fungic sau bacterian, respectiv inflamație nespecifică):

- Extractul glicoalcaloidic **Sol-T** inhibă eliberarea extracelulară a citokinelor IL6, IL8, IL1 α , demonstrând efect antiinflamator și antiirritativ prin blocarea căilor de semnalizare coordonate de aceste citokine. Scăderea factorului pro-angiogenic VEGF eliberat de keratinocite în condițiile stimulării cu TNF α și creșterea acestuia sub acțiunea LPS bacterian recomandă acest compus în afecțiuni dermatologice fără leziuni active (ex. dermatite, iritații cutanate, etc), respectiv vindecarea rănilor suprainfectate (induce formarea microvasculaturii dermice).
- Extractul de salvie **SvPG** stopează semnalizarea extracelulară generată de citokina IL6, cu relevanță inclusiv în maladii dermatologice grave de tipul psoriazis.

- La nivelul fibroblastilor dermici, sub acțiunea unui stimul bacterian asociat cu un stimul generator de stres oxidativ, extractul **Al** acționează asupra citokinelor proinflamatorii, în sensul inhibării lor, demonstrând un efect antiinflamator pronunțat.
- Extractul **Sol-T** prezintă un efect semnificativ în condiții de inflamație nespecifică indusă de $\text{TNF}\alpha$, acționează prin reducerea expresiei extracelulare a citokinelor IL6 și IL8, manifestând astfel un efect antiinflamator la nivel de celulă endotelială. Atacul bacterian la nivel endotelial (stimulare cu LPS), este contracarat de extractul glicoalcaloidic **Sol-T** care prezintă efect reducător asupra expresiei ICAM, parametru caracteristic vaselor sanguine mici.

C. Efectul fotoprotector al principiilor active din *Salvia officinalis* (**SvPG**) și *Corylus avellana* (**Al**) studiate prin modularea mecanismelor celulare dermo-epidermice sub influența radiației UV:

- Principiile active extrase din salvie (**SvPG**), acționează prin împiedicarea progresiei apoptozei timpurii în celulele iradiate cu UV-A sau UV-B. **Extractul de salvie SvPG este deosebit de activ la nivelul reducerii radicalilor liberi oxigenați.**
- Extractul **Al**, prezintă efect de reducere intracelulară a speciilor de oxigen reactive în special în condițiile iradierii UV-B, induce scăderea fenomenului inflamator și de asemenea prezintă o acțiune antiangiogenică în cazul radiației UV-A.

D. Efectul extractelor bioactive din *Salvia officinalis* (**SvPG**), *Solanum lycopersicum* (**Sol-T**), *Corylus avellana* (**Al**), *Arctium lappa* (**Br**), *Trifolium pratense* (**ET**) și *Vitis vinifera* (**TES**) asupra **procesului de regenerare cutanată**:

- În condiții de inducere a diferențierii (prin aport de calciu în mediul extracelular), cât și în mediu sărac în calciu, este reliefat un aport important al fitocompușilor din extractele **Sol-T**, **ET** și **TES** testați în procesul de reînnoiere a epidermului și implicit la prevenția și încetinirea progresiei proceselor degenerative de îmbătrânire a pielii, precum și refacere post traumatică în leziuni de diferite etiologii (arsuri, răni, infecții cutanate, etc).
- Dintre fitocompușii bioactivi testați, **extractele ET, TES, Al și Br prezintă un efect stimulant semnificativ al sintezei de collagen la nivelul fibroblastilor dermici**, atât în condiții bazale, cât și în condiții de stimulare nespecifică cu $\text{TNF}\alpha$ și PMA, contribuind astfel la procesul de regenerare dermică.
- Activitatea MMP în cultura de fibroblasti dermici scade în prezenta extractelor bioactive **ET, TES, Al și Br**, demonstrând o importanță deosebită a acestor biocomplexe în procesele de remodelare tisulară și în vindecarea rănilor, dar și în progresia bolilor inflamatorii și în invazia tumorală.

E. Modelul experimental realizat pentru studiul proceselor celulare și moleculare din patologia dereglărilor hiperproliferative (melanom), s-a realizat prin testarea biocomplexelor TES și ET asociate, atât în condiții normale cât și în urma iradierii cu radiații UV, pe linia celulară standardizată de melanom murinic B16-F10, remarcându-se următoarele:

- Asocierea biocomplexului cu puternic efect antioxidant TES, cu extractul fitoestrogenic ET, reduce cantitatea de melanină (principal parametru indicator al malignizării în cancerul de piele) produsă de celulele melanomice.
- Screeningul la nivel de factor pro-angiogenic VEGF și citokina IL6 a demonstrat efectul inhibitor al amestecului TES:ET_A2, asupra celulelor de melanom aflate în condiții bazale de dezvoltare. În condițiile iradierii UV-A, amestecul TES:ET_A3 intervine doar în cascadele de propagare tumorală coordonate de IL6, prin inhibarea acestora, extractele nefiind active după iradierea UV-B.
- În leziunile melanocitare umane s-a demonstrat o corelație pozitivă între progresia tumorii și expresia MMP-2. Creșterea expresiei MMP-9, pe de altă parte, a fost găsită în principal în faza de creștere radială a melanomului primar. În condiții de iradiere UV, se observă un efect inhibitor mai pronunțat asupra MMP 9 și MMP 2, în cazul celulelor tratate cu cele două amestecuri de extracte, atenuând caracterul invaziv al melanomului murin.
- Amestecurile de tip TES:ET_A2 și TES:ET_A3 asigură un efect concertat de reducere a propagării tumorale pe cele două mecanisme implicate în progresia tumorală (apoptoză și secvențialitatea ciclului celular). În condiții de iradiere, extractele acționează doar în cazul UV-A, menținând tendința observată în stadiul bazal. Radiația UV-B este mult mai agresivă, inducând apoptoză în majoritatea populației celulare, prin generare de specii de oxigen reactive.

Având în vedere concluziile care reies din studii, activitatea biologică complementară a extractelor vegetale, respectiv interrelaționarea unor mecanisme de refacere tisulară, acestea pot fi exploatate și valorificate în aplicații terapeutice cutanate autentice, ca de exemplu:

- **Tratare răni de diferite etiologii:** extract de salvie (**SvPG**) și compuși glicoalcaloidici din deșeuri de tomate (**Sol-T**), prin capacitatea lor de combatere a proceselor inflamatorii, inclusiv cele datorate infecțiilor

microbiene, și extractele de trifoi roșu (**ET**) și componente active din deșeuri de struguri (**TES**), prin restabilirea homeostaziei matricei proteice și a turn-overului celular, cu relevanță în regenerarea cutanată.

- **Fotoprotecție intrinsecă și extrinsecă față de factorii poluanți din mediu:** biocomplexele **SvPG** și **Al** prin inhibiția majoră a SRO și efect antiangiogenic și antiinflamator la nivel epidermic.
- **Infecții bacteriene cutanate (micoze, rani infectate):** extractele **SvPG** și **Sol-T** prin acțiunea protectoare împotriva inflamației și prin efectul antiiritativ, manifestat prin blocarea cailor de semnalizare coordonate de citokinele IL6, IL8 și IL1 α .
- **Efect de stopare a perturbarilor hiperproliferative cutanate (ex: melanom):** asocierea între extractele bioactive din trifoi roșu (**ET**) și fitocompuzii din deșeuri de struguri (**TES**) – **TES:ET_A2** (raport 1:5) și **TES:ET_A3** (raport 1:3) prin reducerea melaninei (principal indicator de malignizare), prin acțiunea antiinflamatorie în melanocitele supuse iradierii cu UV-A, prin reducerea propagării tumorale (inhibiție MMP2, inducerea apoptozei prin generarea SRO).

BIBLIOGRAFIE

- Agustin-Salazar S., Medina-Juárez L.A., Soto-Valdez H., F. Manzanares-López F., Gámez-Meza N., Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc, Australian Journal of Grape and Wine Research, 20, 208–213 (2014).
- Albelda S. M., Buck C. A., Integrins and other cell adhesion molecules. The FASEB Journal, 4(11), 2868–2880 (1990).
- Al-Snafi A.E., The Pharmacological Importance and Chemical Constituents of *Arctium Lappa*. A Review, IJPRS, 3(1), (2014).
- Baek J., Lee M-G., Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology, Redox Report, 21:4, 164-169, (2016).
- Baricevic D., Sosa S., Loggia R.D., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupancic A., Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid, Journal of Ethnopharmacology 75, (2–3) 125–132 (2001).
- Baroni A., Buommino E., De Gregorio V., Ruocco E., Ruocco V., Wolf R., Structure and function of the epidermis related to barrier properties, Clinics in Dermatology 30, 257–262 (2012).
- Biswas S.K., Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?, Oxidative medicine and cellular longevity, 5698931 - 40, (2016).
- Blois M.S., Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, Nature, 181, 1199–1200 (1958).
- Bodemer, A. A. Psoriasis. Integrative Medicine, 726–738.e2. (2018).
- Bosch R., Philips N, Suárez-Pérez J.A., Juarranz A., Devmurari A., Chalensouk-Khaosaat J., González S., Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals, Antioxidants, 4, 248-268 (2015).
- Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E., Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, The Journal of Cell Biology, 106, 761-771, (1988).
- Brenner M., Hearing V.J., The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin, Photochem Photobiol., 84(3): 539–549 (2008).
- Candrea E., Senila S., Tatomir C., Cosgarea R., Active and inactive forms of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma, International Journal of Dermatology, 53, 575–580 (2014).
- Carlo R., Ildo N., Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat. Protoc., 1(3), 1458-1461, (2006).
- Craig S., Earnshaw C.H., Virós A., Ultraviolet light and melanoma, J Pathol., 244: 578–585 (2018)
- Crăciun L.M.**, Dumitriu B.G., Olariu L., Jurcoane S., Cristea S., Adil A, Rosoiu N., Papacoea R., Regenerative and scare healing potential of active compounds from *Camelina sativa* oil and grape pomace. Rom Biotechnol Lett.; 24(6): 1075-1082. (2019) DOI: 10.25083/rbl/24.6/1075.1082.
- Crăciun L.M.**, Dumitriu B.G., Olariu L., Ene D.M., Rosoiu N., Antioxidant effect of a vegetal grape waste complex, demonstrated in relevant dermal and epidermal cellular systems, Rom Biotechnol Lett., ISSN: 2248-3942 – în curs de publicare (RBL10850).
- Crăciun L.M.**, Dumitriu BG., Ene DM., Abdi A., Olariu L., Rosoiu N., Valorification of Grape Marc by Obtaining BioactiveComplexes Tested Through In Vitro Experimental Models, Academy of Romanian Scientists, Annals Series on Biological Sciences, 2017, ISSN 2285 – 4177.
- Craciun M.L.**, Dumitriu B., Ene M.D., Abdi A., Olariu L., Roşoiu N., Valorisation of Vegetable Waste from *Solanum* sp. and Grapes as Sources of Antioxidant and Antiinflammatory Active Ingredients, AOSR, Autumn Scientific Session, 12-14 sept. 2017.
- D’Orazio J., Jarrett S., Amaro-Ortiz A., Scott T., UV Radiation and the Skin, Int. J. Mol. Sci, 14, 12222-12248 (2013).
- Da Silva G.F., Rocha L.W., Meira Quintão N.L., Nutraceuticals, Dietary Supplements, and Functional Foods as Alternatives for the Relief of Neuropathic Pain, Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease, cap. 10, 87-92 (2015).
- Dumitriu B., Olariu L., Ene M.D., Zglimbea Z., 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, 177-188. (2012).
- Dumitriu B.G., Ene M.D., Olariu L., Rosoiu N., Craciun L.M., Abdi A, Manda G., Papacoea T., Grape Pomace and Red Clover Extracts Modulate the Proliferative Response of Murine Melanoma Cells, Academy of Romanian Scientists, Annals Series on Biological Sciences, ISSN 2285 – 4177, (2018).
- El-Bahr S.M., Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. Science International, 1, 111-117 (2013).
- Evers L.H., Bhavsar D., Mailänder P., The biology of burn injury. Exp Dermatol., 19: 777–783 (2010).
- Fiedor J., Burda K., Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease, Nutrients, 6, 466-488 (2014).
- Figueiredo-González M., Valentão P., Andrade P.B., Tomato plant leaves: From by-products to the management of enzymes in chronic diseases, Industrial Crops and Products, 94, 621–629 (2016).
- Fotis L., Agrogianis G., Vlachos I.S., Pantopoulou A., Margoni A., Kostaki M, Verikokos C., Tzivras D., Mikhailidis D.P., Perrea D., Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1 at the Early Stages of Atherosclerosis in a Rat Model, In Vivo, 26(2):243-50 (2012).
- Fukai T., Ushio-Fukai M., Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases, Antioxidants & Redox Signaling, 15(6), 1583-606 (2011).
- Ghorbani A., Esmailzadeh M., Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components, J Tradit Complement Med., 7(4): 433–440. (2017).

31. Gragnani A., Cornick S.M., Chominski V., de Noronha S.M.R., de Noronha S.A.A.C., Ferreira L.M., Review of Major Theories of Skin Aging, Advances in Aging Research, 3, 265-284 (2014).
32. He L., He T., Farrar S., Ji L., Liu T., Ma X., Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species, Cell Physiol Biochem, 44, 532-553 (2017).
33. Hoejberg L., Bastholt L., Schmidt H., Interleukin-6 and melanoma, Melanoma Research, 22:327–333 (2012).
34. Huang H-C., Hsieh W-Y., Niu Y-L., Chang T-M., Inhibitory Effects of Adlay Extract on Melanin Production and Cellular Oxygen Stress in B16F10 Melanoma Cells, Int. J. Mol. Sci., 15, 16665-16679 (2014).
35. Huang, T.-H., Lin, C.-F., Alalaiwe, A., Yang, S.-C., & Fang, J.-Y. (2019). Apoptotic or Antiproliferative Activity of Natural Products against Keratinocytes for the Treatment of Psoriasis. International Journal of Molecular Sciences, 20(10), 2558.
36. Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M., Rahu N., Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 1-9 (2016)
37. Huyut Z., Beydemir S., Gülçin I., Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds, Biochem Res Int., 1-10 (2017).
38. Ighodaro O.M., Akinloye O.A., First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, Alexandria Journal of Medicine, 54, 287–293 (2018).
39. Jamwal K., Bhattacharya S., Puri S., Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 9, 26–38 (2018).
40. Kabera J.N., Semana E., Mussa A.R., He X., Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2, 377-392 (2014).
41. Kammeyer A., Luiten, R.M. Oxidation events and skin aging, Ageing Research Reviews, 21, 16–29. (2015).
42. Kawashima S., Funakoshi T., Sato Y., Saito N., Ohsawa H., Kurita K., Nagata K., Yoshida M., Ishigami A., Protective effect of pre- and postvitamin C treatments on UVB irradiation-induced skin damage, Nature, Scientific Reports, 8:16199, (2018).
43. Kolodziejczyk-Czepas J., Trifolium species – the latest findings on chemical profile, ethnomedicinal use and pharmacological properties, Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 68, 845–861 (2016).
44. Kondo T., Ishida Y., Molecular pathology of wound healing, Forensic Science International, 203, 93–98 (2010).
45. Krueger, G., & Ellis, C. N., Psoriasis—recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. Journal of the American Academy of Dermatology, 53(1), S94–S100 (2005).
46. Kruk J., Duchnik E., Oxidative Stress and Skin Diseases: Possible Role of Physical Activity, Asian Pac J Cancer Prev, 15 (2), 561-568 (2014).
47. Krutmann J., Bouloc A., Sore G., Bernard B.A., Passeron T., The skin aging exposome, J Dermatol Sci., 85, 152–161 (2017).
48. Mahecha A.M., Wang H., The influence of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-2 and -9 in angiogenesis, metastasis, and prognosis of endometrial cancer, OncoTargets and Therapy, 10 4617–4624 (2017).
49. 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).
50. Marionnet C., Caroline Tricaud C., Bernerd F., Exposure to Non-Extreme Solar UV Daylight: Spectral Characterization, Effects on Skin and Photoprotection, Int. J. Mol. Sci., 16, 68-90 (2015).
51. Matejuk A. Skin Immunity, Arch. Immunol. Ther. Exp., 66, 45–54 (2018).
52. Molyneux P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin J. Sci. Technol., 26(2) : 211-219 (2004).
53. Naidoo K., Birch-Machin M.A., Oxidative Stress and Ageing: The Influence of Environmental Pollution, Sunlight and Diet on Skin, Cosmetics, 4(4), 1-8 (2017).
54. 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. Journal of Leukocyte Biology, 84(1), 68–76. (2008).
55. Oliveira I., a, Sousa A., Valentao P., b, Andrade P.B. b, Ferreira I., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L., Pereira J.A., Hazel (Corylus avellana L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds, Food Chemistry, 105, 1018–1025 (2007).
56. Oliveira I., Sousa A., Morais J., Ferreira I., Bento A., Estevinho L., Pereira J.A., Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (Corylus avellana L.) cultivars, Food and Chemical Toxicology 46 ,1801–1807 (2008).
57. Oroian, M.; Escriche R., Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Food Research International, 74,10-36 (2015).
58. Pehlivan F.E., Vitamin C: An Antioxidant Agent. cap 2 in Vitamin C, Amal H. Hamza, IntechOpen, (2017).
59. Phaniendra A.,Jestadi D.B., Periyasamy L., Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases, Ind J Clin Biochem., 30(1):11–26 (2015).
60. Pisoschi A.M., Pop A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review, Eur J Med Chem., 97, 55-74 (2015).
61. Pittayapruek P., Meephansan J., Prapapan O., Komine M., Ohtsuki M., Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis, Int. J. Mol. Sci., 17, 868 (2016).
62. Pogačnik L., Poklar Ulrih N., Application of optimized chemiluminescence assay for determination of the antioxidant capacity of herbal extracts Luminescence, 1-6 (2012).

63. Predes F.S., Ruiz A., Carvalho J.E., Foglio M.A., Dolder H., Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts, Complementary and Alternative Medicine, 11(25), 1472-6882 (2011).
64. Prieto-Granada N.C., Lobo A., Mihm C.M., 20 - Skin Infections, Diagnostic Pathology of Infectious Disease (Second Edition), 542-647 (2018).
65. Reichrath J, Rass K Ultraviolet damage, DNA repair and vitamin D in nonmelanoma skin cancer and in malignant melanoma: an update. Adv Exp Med Biol 810: 208-233(2014).
66. Reuter S, Gupta S.C, Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B, Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med., 49(11): 1603–1616) (2010).
67. Rinnerthaler M., Bischof J., Streubel M.K., Trost A., Richter K., Oxidative Stress in Aging Human Skin, Biomolecules, 5, 545-589 (2015).
68. Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Cell Viability Assays. [Updated 2016]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual (2013).
69. Robert A., Lawley J.S., Lawley J.T, Role of Microvascular Endothelial Cells in Inflammation, J Invest Dermatol., 100:111S–115S, (1993).
70. Robinson J.P., Current protocols in Cytometry, 9.7.1 – 9.7.14 (1997).
71. Rungratanawanich W., Memo M., Uberti D., Redox Homeostasis and Natural Dietary Compounds: Focusing on Antioxidants of Rice (*Oryza sativa* L.), Nutrients, 10, 1605, 1-19 (2018).
72. Saba E., Oh M.-J., Kwak D., Roh S.-S., Kwon H.-W., Kim S.-D., Rhee M.H., *Solanum lycopersicum* (tomato) ethanol extract elicits anti-inflammatory effects via the nuclear factor kappa B pathway and rescues mice from septic shock, Korean J Vet Res., 57(2) : 97-104 (2017).
73. Szadanić D., Mikulić M., Kladar N., Hogervorst J., Atanacković Krstonošić M., Analysis of the factors influencing red clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) isoflavone content, Biologia Serbica, 40(2), 34-41 (2018) DOI 10.5281/zenodo.2452290
74. Siddique M.A.B., Brunton N., Food Glycoalkaloids: Distribution, Structure, Cytotoxicity, Extraction, and Biological Activity, Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life, Joanna Kurek, IntechOpen, (2019).
75. Sies H., On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development Current Opinion in Toxicology, 7, 122–126 (2018).
76. Silva-Beltrán N.P., Ruiz-Cruz S., Cira-Chávez L.A., Estrada-Alvarado M.I., Ornelas-Paz J., López-Mata M.A., Del-Toro-Sánchez C.L., Ayala-Zavala J.F., Márquez-Ríos E., Total Phenolic, Flavonoid, Tomatine, and Tomatidine Contents and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts of Tomato Plant, International Journal of Analytical Chemistry, 4, 1-10, (2015).
77. Stojiljković D., Pavlović D., Arsić I., Oxidative Stress, Skin Aging and Antioxidant Therapy, Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš, 31(4):207-217(2014).
78. Thomsen S.F., Atopic Dermatitis: Natural History, Diagnosis and Treatment, ISRN Allergy, 1-7 (2014).
79. Toshikazu K., Yuko I., Molecular pathology of wound healing, Forensic Science International 203, 93–98 (2010).
80. Trouba K.J., Hamadeh H.K., Amin R.P., Germolec D.R., Oxidative Stress and Its Role in Skin Disease, Antioxid. Redox Signal. 4, 665–673 (2002).
81. Tsala D.E., Amadou D., Habtemariam S., Natural wound healing and bioactive natural products Phytopharmacology, 4(3), 532-560 (2013).
82. Velickovic D.T., Randjelovic N., Ristic M.S., Velickovic A., Smelcerovic A., Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L., J.Serb.Chem.Soc. 68(1), 17–24 (2003).
83. Verdier-Sevrain S., Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators, Climacteric, 10:289–297 (2007).
84. Vila R., Blanca Freixa B., Cañigual S., Antifungal compounds from plants, Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III, 23-43 (2013).
85. Wang P.-H., Huang B.-S., Horng H.-C., Yeh C.-C., Chen Y.-J., Wound healing, J Chin Med Assoc., 81, 94-101 (2018).
86. Wang Y., Branicky R., Noë A., Hekimi S., Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling, J. Cell Biol. 217(6), 1915-1928 (2018).
87. Waringa W.S., Mishra V., Maxwell S., Comparison of spectrophotometric and enhanced chemiluminescent assays of serum antioxidant capacity, Clinica Chimica Acta, 338, 67–71 (2003).
88. Weydert C.J., Cullen J.J., Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue, Nat Protoc., 5(1), 51–66 (2010).
89. Wlaschek M., Tanchcheva-Poor I., Naderi L., Ma W., Schneider L.A., Razi-Wolf Z., Schuller J., Scharffetter-Kochanek K., Solar UV irradiation and dermal photoaging, J Photochem Photobiol B, 63, 41–51 (2001).
90. Xu H., Zheng Y.-W., Liu Q., Liu L.-P., Luo F.-L., Zhou H.-C., Li Y.-M., Reactive Oxygen Species in Skin Repair, Regeneration, Aging, and Inflammation. Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells, cap. 5, 69-87 (2018).
91. Xu Y., Fisher G. J., Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. Journal of Dermatological Science Supplement, 1(2), S1–S8 (2005).
92. Xue M., Le N., Christopher J Jackson C.J., Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing, Expert Opin. Ther. Targets 10(1):143-155 (2006).
93. Yee C., Yen H., Hsiao H.-Y., Su S.-C., Phytochemicals in Skin Cancer Prevention and Treatment: An Updated Review, Int. J. Mol. Sci., 19, 941 (2018)

PUBLICAȚII

A. Lucrări științifice publicate în reviste ISI:

1. **Crăciun M.L.**, Dumitriu B.G., Olariu L., Jurcoane S., Cristea S., Adil A., Rosoiu N., Papacocea R., Regenerative and scare healing potential of active compounds from Camelina sativa oil and grape pomace, **Rom Biotechnol Lett.**, ISSN: 2248-3942, 2019/ **Impact Factor (ISI)** – **0.59/2018**. DOI: 10.25083/rbl/24.6/1075.1082, <https://www.e-repository.org/rbl/vol.24/iss.6/20.pdf>
2. Olariu L., Dumitriu B.G., **Crăciun M.L.**, Buse E., Rosoiu N., Bojinca M., Papacocea T., The in vitro influence of a pharmaceutically active small sea fish extract on apoptosis and proliferation mechanisms amplified by inflammatory conditions, **Farmacăia**, 2018, **Impact Factor** - **1.527/2018** <http://www.revistafarmacăia.ro/201803/2018-03-art-19-Olariu-Bojinca-Papacocea-524-529.pdf>
3. **Crăciun M.L.**, Dumitriu B.G., Olariu L., Ene D.M., Abdil A., Rosoiu N., Antioxidant effect of a vegetal grape waste complex, demonstrated in relevant dermal and epidermal cellular systems, **Rom Biotechnol Lett.**, ISSN: 2248-3942 **Impact Factor (ISI)** – **0.59/2019** – în curs de publicare (RBL10850)
4. Paulet M., Ciobica A., Olariu L., Ene M.D., Antioch I., Ababei D., **Crăciun M.L.**, Adil A., Rosoiu N., Some preliminary results regarding the effects of grape pomace on memory and anxiety in mice, **Rom Biotechnol Lett.**, ISSN: 2248-3942 **Impact Factor (ISI)** – **0.59/2019** – în curs de publicare (RBL-2019-0036)
5. Draga-Coleta S.V., Olariu L., Dumitriu B.G., Ene M.D., **Crăciun M.L.**, Apoptotic and antiproliferative processes from dysplastic and metastatic prostate cells, modulated by proteolytic enzymes of entomological origin, P.09-224, FEBS Open Bio 8 (Suppl.S1) (2018) 105–106, DOI: 10.1002/2211-5463.12453. **Impact Factor (ISI)** – **4.73/2018** <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/2211-5463.12453>
6. **Crăciun M.L.**, Ene M.D., Buse E., Pyatigorskaya N., Pavlov A., Olariu L., Cellular and molecular effects of a small sea fish extract on hyaluronan homeostasis, The FEBS Journal 284 (Suppl. 1), pag. 382, (2017). **Impact Factor (ISI)** – **4.53/2017**
7. **Crăciun M.L.**, L. Olariu, B. Dumitriu, N. Rosoiu, Molecular mechanisms involved in inflammation modulated by vegetal active principles, P-04.04.4-010 The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808, pg.355, **Impact Factor (ISI)** – **3.90/2016**
8. Ene D.M., Pyatigorskaya N., Pavlov A., Dumitriu B., **Crăciun M.L.**, Olariu L., Cellular oxidative processes relevant for articular degenerative pathologies modulated by an active extract from small sea fish, P-09.04.4-011 The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–41 7 DOI: 10.1111/febs.13808, pg.385, **Impact Factor (ISI)** – **3.90/2016**
9. **Crăciun M.L.**, Olariu L., Ene MD., Zglimbea L., In vitro modulation of enzymatic processes using biologic active substances with relevance for cancer therapy, FEBS Journal 281 (Suppl. 1) (2014) 65–783 Issn Print: 1742-464X, **Impact Factor (ISI)** – **4.00/2014**

B. Lucrări științifice publicate în extenso în reviste BDI:

1. **Crăciun M.L.**, Dumitriu BG, Rosoiu N, Ene MD, Manda G, Olariu L, Entomological Compounds Impact on Key Factors of Prostate Adenocarcinoma Progression, Academy of Romanian Scientists Annals - Series on Biological Sciences, 2019, ISSN 2285 – 4177 <http://www.aos.ro/wp-content/anale/BVVol8Nr1Art.4.pdf>
2. Dumitriu B.G., Ene M.D., Olariu L., Rosoiu N., **Crăciun M.L.**, Abdi A, Manda G., Papacocea T., Grape Pomace and Red Clover Extracts Modulate the Proliferative Response of Murine Melanoma Cells, Academy of Romanian Scientists, Annals Series on Biological Sciences, ISSN 2285 – 4177, 2018 <http://www.aos.ro/wp-content/anale/BVVol7Nr2Art.9.pdf>
3. **Crăciun M. L.**, Dumitriu B.G., Ene D.M., Abdi A., Olariu L., Rosoiu N., Valorification of Grape Marc by Obtaining BioactiveComplexes Tested Through In Vitro Experimental Models, Academy of Romanian Scientists, Annals Series on Biological Sciences, 2017, ISSN 2285 – 4177 <http://www.aos.ro/wp-content/anale/BVVol6Nr2Art.1.pdf>
4. **Crăciun M.L.**, Vacaru A.M., Ene M.D., Vacaru A.M., Olariu L., Roșoiu, N., pH influence on different bovine testicular hyaluronidase determination assays, Academy of Romanian Scientists, Annals Series on Biological Sciences, 2016. ISSN 2285 – 4177 <http://aos.ro/wp-content/anale/BVVol5Nr1Art.9.pdf>

C. Lucrări științifice publicate în rezumat - în reviste BDI:

1. Olariu L., Crăciun M.L., Ene M.D., Dumitriu B., Serbu S., Nita R., New approaches in prostate therapy through entomological compounds with biological activity at cellular and molecular level, Catalogul Salonului PRO-INVENT 2020 – în curs de publicare
2. Serbu S., Jurcoane S., Dumitriu B., Olariu L., **Crăciun M.L.**, Cristea S, Copaci S., Rosoiu N., Dermatocosmetic innovations in skin regeneration and antioxidant protection against environmental pollutants, Catalogul Salonului PRO-INVENT 2020 – în curs de publicare
3. Olariu L., Dumitriu B., Ene M.D., **Crăciun M.L.**, Bicu A., Innovative association between entomological compounds and plant extracts in order to design pharmaceutically active complexes, Iasi, Mai 2019, Euroinvent, (**medalie de aur**).
4. Abdi A., **Crăciun M.L.**, Dumitriu B., Olariu L., *In vitro* biological action synergisms in proliferative cutaneous processes with applicability in bioproduction development, National Scientific Conference, Academy of Romanian Scientists, Book of abstracts, Volume 13 issue 1, 2019.

5. **Craciun M.L.**, Dumitriu B., Rosoiu N., Ene M.D., Olariu L., Entomological Active Principles with Antitumor Properties on Prostate Adenocarcinoma Cell Line DU 145, National Scientific Conference, Academy of Romanian Scientists, Book of abstracts, Volume 13 issue 1, 2019.
6. Dumitriu B.G., Ene M.D., Olariu L., Rosoiu N., **Craciun M.L.**, Abdi A., Manda G., Papacoea T., Grape Pomace and Red Clover Extracts Modulate the Proliferative Response of Murine Melanoma Cells, National Scientific conference Academy of Romanian Scientists, Scientific research for Sustainable Development, book of abstracts, volume 12, issue 1, 2018.
7. Paulet M., Ciobica A., Olariu L., Ene M.D., Antioch I., Ababei D., **Craciun M. L.**, Adil Abdi, Rosoiu N., Some Preliminary results regarding the effects of grape pomace on memory and anxiety in mice, National Scientific conference Academy Of Romanian Scientists, Scientific research for Sustainable Development, book of abstracts, volume 12, issue 1, 2018.
8. Olariu L., Buse E., Dumitriu B., **Craciun M.L.**, Draga-Coleta S.V., Papacoea R., New cellular and molecular effects, relevant for osteoarthicular pathology, proved for and Romanian original product on specific, predictive, in vitro systems, Iasi, 19 mai 2018, EUROINVENT, (**medalie de aur**).
9. Olariu L., Dumitriu B., Ciuhrii V., **Craciun M.L.**, Roșoiu N., Entomological Complex with Pro-Apoptotic and Antiproliferative Effect on Prostatic Dysplasia Cells, AOSR , Autumn Scientific Session, 12-14 sept. 2017.
10. **Craciun M.L.**, Ene M.D., Olariu L., Rosoiu N., Study on enzymatic activity of hyaluronidase from bovine testes using different substrate sources, AOSR , Spring Scientific Session, mart. 2017.
11. **Craciun M.L.**, Dumitriu B., Ene M.D., Abdi A., Olariu L., Roșoiu N., Valorisation of Vegetable Waste from Solanum sp. and Grapes as Sources of Antioxidant and Antiinflammatory Active Ingredients, AOSR, Autumn Scientific Session, 12-14 sept. 2017.
12. Olariu L., Vacaru A., Pyatigorskaya N., Vacaru A.M., Pavlov A., Dumitriu B.G., Ene M.D., **Craciun M.L.**, Original romanian product involved in cellular chondro - modulatory mechanisms, EUROINVENT 2016, Catalog EUROINVENT pg. 437. (**medalia de aur**).
13. Olariu L., Dumitriu B.G., **Craciun M. L.**, Roșoiu N., Cascade proinflamatorii modulate citokinic de extracte bioactive de Salvia officinalis, Asculum hippocastanum și Calendula officinalis, – prezentare orală la Sesiunea Științifică de Toamnă a AOȘR, septembrie 2016, Durău – Neamț.
14. Olariu L., Dumitriu B., **Craciun M.L.**, Ene M.D., Rosoiu N., Extract de peste marin marunt- agent antioxidant activ in procese celulare asociate cu patologii degenerative articulare, – prezentare orală la Sesiunea Științifică de Toamnă a AOȘR, septembrie 2016, Durău – Neamț.
15. **Craciun, M.L.**, Vacaru, A.M., Ene, M.D., Vacaru, A.M., Olariu, L., Roșoiu, N., pH influence on different bovine testicular hyaluronidase determination assays, Conferinta AOSR, Martie 2016, Bucuresti, Romania.

D. Participări la Congrese științifice internaționale

1. 39th FEBS-EMBO Conference, 2014, Paris, France – poster
2. 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life, 2015 was scheduled for Kuşadası (live event cancelled), Turkey – abstract
3. 42nd FEBS Congress, From Molecules to Cells and Back, 2017, Jerusalem, Israel – poster
4. 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever, 2018, Prague, Czech Republic
5. European Exhibition of Creativity and Innovation, 2016, Iași, România - poster
6. European Exhibition of Creativity and Innovation, 2018, Iași, România – poster

E. Participari in calitate de membru in echipa in proiecte de cercetare naționale/ internaționale:

1. **UEFISCDI/INOVARE/CTR 3 SEH/2012**

Impact eficient pe piața externă al unui produs românesc high-tech inovativ în algoritmul de restabilire a homeostaziei în boli inflamatorii, degenerative și reumatice.

2. **UEFISCDI/INOVARE/CTR 26DPST/2012**

Valorificarea unor compuși entomologici eficienți în diverse patologii degenerative - capacitate inovativă autentică a unui IMM românesc pe piața farmaceutică.

3. **POSCCE/ ID 1639/SMIS 47515 /546/29.08.2013**

Soluții inovative pentru determinarea gradului de contaminare cu reziduuri toxice-metale grele și pesticide în produse de origine vegetală

4. **PN-III-P2-2.1-PTE-2016-0160/ CTR 49**

Prototip de produse medicamentoase cu eliberare controlată pe baza de compozite chitosan-zeolit;

5. **PN-III-P2-2.1-PTE-2016-0166/ CTR 21**

Prototipuri pentru un biopesticid și un produs antimicrobic pe baza de biocomplexe vegetale obținute prin biotehnologii superioare de exploatare a speciilor de Solanum și Camelina sativa.

6. **Proiect AOSR, 2017-2019**

Valorificarea reziduurilor din vinificație ca aditivi alimentari și antioxidanți în industrie