

RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ

I. Raportul Științific și Tehnic 2017

Contract nr. 98CI/2017

Cod proiect: PN-III-P2-2.1-CI-2017-0406

METODE ENZIMATICE DE EVALUARE *IN VITRO* A EFICACITĂȚII UNOR EXTRACTE DIN ȚESUTURI MERISTEMATICE

Acronim proiect: MERISTENZIMET

Durata proiect: 25.07.2017-31.12.2017

Punerea la dispoziția populației a unor produse conforme cu scopul pentru care au fost produse este o preocupare continuă a autorităților dar și a producătorilor. Eficiența și siguranța produselor naturale, incluzând în această categorie și extractele vegetale, este în primul rând o importantă responsabilitate a producătorului. În acest context, se impune necesitatea dezvoltării unor metode simple, operante, de control a calității și eficienței terapeutice a extractelor vegetale, care să vină în sprijinul producătorului.

Studiile raportate până în prezent aduc informații insuficiente referitoare la proprietățile farmacologice ale extractelor meristemate, ceea ce justifică interesul producătorului și a cercetătorilor pentru acest domeniu de cercetare. Proiectul "Metode enzimatic de evaluare *in vitro* a eficacității unor extracte din țesuturi meristemate" a avut ca și scop dezvoltarea unor metode enzimatic care să demonstreze potențiale efecte biologice ale unor extracte gemoterapice existente în gama de produse ale beneficiarului, respectiv firma SC PlantExtrakt SRL. Cercetările au fost realizate de o echipă de cercetători de la Facultatea de Farmacie, catedra de Farmacognozie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj- Napoca.

Principalele direcții de cercetare au avut în vedere:

- Evaluarea capacității antioxidante asupra radicalilor superoxid. Radicalii superoxid sunt generatori a unor radicali activi de oxigen și hidroxil care induc stresul oxidativ la nivelul întregului organism uman determinând o patologie largă.
- Evaluarea eficienței antioxidante prin cuantificarea scăderii activității xantinoxidazei. Inhibarea xantinoxidazei de către diferitele componente ale extractelor indică implicarea lor în metabolismul purinic, iar potențialul lor de reducere a sintezei de acid uric determină o reducere a depunerilor de acid uric la nivelul articulațiilor.
- Evaluarea efectului antiinflamator prin evaluarea activității anti-proteolitice evidențiază potențialul de inhibare al serin-proteinazelor ce determină liza unor proteine implicate în procesele inflamatorii.
- Evaluarea efectului antiulceros prin cuantificarea inhibării ureazei, una dintre enzimele importante implicate în patologii digestive induse de *Helicobacter pylori*.
- Evaluarea efectului antiulceros prin evaluarea inhibării alfa-chimotripsinei, o serin-protează implicată în procesul ulcerativ și liza/digestia polipeptidelor din țesuturile afectate de ulceratie.
- Evaluarea efectului antineurodegenerativ prin cuantificarea inhibării activității acetilcolinesterazei, o enzimă care descompune acetilcolina, deficitară într-o serie de afecțiuni neurologice degenerative cum ar fi boala Alzheimer.
- Evaluarea efectului antineurodegenerativ prin evaluarea inhibării activității tirozinazei, o enzimă implicată în sinteza melaninei, care catalizează oxidarea tirozinei și dopaminei. Oxidarea dopaminei, la nivelul sistemului nervos central duce la boli neurodegenerative de tipul bolii Parkinson.

Aceste metode au fost adaptate specific extractelor meristemate, cum ar fi: Extractul din muguri de coacăz negru (*Ribes nigrum* L.), Extractul din muguri de arin negru (*Alnus glutinosa* L.), Extractul

din muguri de smochin (*Ficus carica* L.), Extractul din muguri de nuc (*Juglans regia* L.) și Extractul din mlădițe de merișor (*Vaccinium vitis-idaea* L.)

Cap. 1. Evaluarea capacității antioxidante asupra radicalilor superoxid

Datorită reactivității lor, radicalii liberi cu oxigen reactiv și în special radicalul superoxid duc la distrugerii oxidative la nivelul nucleului și membranei celulare, interacționând cu ADN-ul, proteinele, lipidele și glucidele.

Oxidarea proteinelor de către radicalii liberi, mai ales de radicalii superoxid, se poate realiza prin: oxidarea aminoacizilor specifici, metionina, cisteina, arginina și histidina fiind mai sensibili la oxidare; ruperea lanțului polipeptidic mediată de radicali sau formarea de punți de legătură în molecula proteică prin intermediul produșilor de peroxidare a lipidelor.

Peroxidarea lipidelor se realizează mai ales de către radicalii hidroxil respectiv superoxid care la descompunere pun în libertate tot radicali hidroxil. Peroxidarea lipidică poate induce afecțiuni neurodegenerative, ischemie, diabet zaharat, este implicată în procesul de îmbătrânire, în apariția aterosclerozei, în carcinogeneză și în toxicitatea anumitor xenobiotice.

Deși anionul radical peroxid este un oxidant slab, acesta se transformă ușor în puternicul radical oxidant hidroxil și radical de oxigen singlet, ca urmare este important să se evalueze și posibilitatea de neutralizare a acestor radicali peroxid sau superoxid.

Evaluarea capacității antioxidante asupra radicalilor superoxid s-a realizat *in vitro* prin metoda SOD, care se bazează pe eliberarea de radicali anionici superoxid într-un tampon, la pH 8 din tetrazoliu nitro-blue, nicotinamid dinucleotid respectiv metosulfat de fenază. Adăugarea unui extract sau a unei substanțe cu efect antioxidant cu efect antioxidant va împiedica formarea complexului de culoare albastru-violet inițiat de metosulfatul de fenază.

Materiale și aparate:

Evaluarea s-a realizat spectrofotometric utilizând un aparat Cintra 101, GBC, Australia.

S-au folosit: soluție de tetrazoliu nitro-blue 0,3 mM, soluție de nicotinamid dinucleotid 0,936 mM, tampon Tris-acid clorhidric 16 mM pH de 8 și soluție de metosulfat de fenază 0,12 mM. Ca și standard s-a folosit Trolox. Toate soluțiile s-au realizat în apă ultrapurificată de la un sistem Millipore Simplicity, Millipore-Merck, SUA.

Metoda spectrofotometrică:

Probele: la 2 ml de soluție tetrazoliu nitro-blue 0,3 mM și 2 ml soluție de nicotinamid dinucleotid 0,936 mM s-au adăugat câte 4 ml de extracte gemoterapice de *Alnus glutinosa*, *Ficus carica* și *Ribes nigrum* respectiv 1 ml de extract de *Juglans regia* respectiv *Vaccinium vitis idaea* în amestec cu 3 ml apă ultrapurificată. La aceste amestecuri s-au adăugat 2 ml tampon Tris-acid clorhidric respectiv 2 ml metosulfat de fenază 0,12 mM. Toate amestecurile s-au incubat pentru 5 minute la 25°C.

Control: la 2 ml de soluție tetrazoliu nitro-blue 0,3 mM și 2 ml soluție de nicotinamid dinucleotid 0,936 mM s-au adăugat câte 4 ml apă ultrapurificată, apoi s-au adăugat 2 ml tampon Tris-acid clorhidric respectiv 2 ml metosulfat de fenază 0,12 mM. Amestecul s-a incubat pentru 5 minute la 25°C.

Standard: la 2 ml de soluție tetrazoliu nitro-blue 0,3 mM și 2 ml soluție de nicotinamid dinucleotid 0,936 mM s-au adăugat câte 4 ml de soluție Trolox având conținând câte 0,0023; 0,0046; 0,0092; 0,0138 respectiv 0,0184 mmoli. La aceste amestecuri s-au adăugat 2 ml tampon Tris-acid clorhidric respectiv 2 ml metosulfat de fenază 0,12 mM. Toate amestecurile s-au incubat pentru 5 minute la 25°C.

Blank: apă ultrapurificată.

Lungimea de undă: 560 nm.

Toate determinările s-au realizat în triplicat, iar fiecare probă în parte s-a citit de 3 ori la aparat. Datele s-au prelucrat cu ajutorul softului Office, Excel.

Rezultate:

În tabelul 1.1 sunt prezentate datele pentru probele standard, iar în figura 1.1 curba de calibrare pentru standardul Trolox. În tabelul 1.2 sunt prezentate rezultatele pentru extractele gemoterapice.

Tabelul 1.1

mMoli Trolox	Absorbanta (Control-Proba)
0.0023	0.1918
0.0046	0.3182
0.0092	0.4894
0.0138	0.5937
0.0184	0.7435

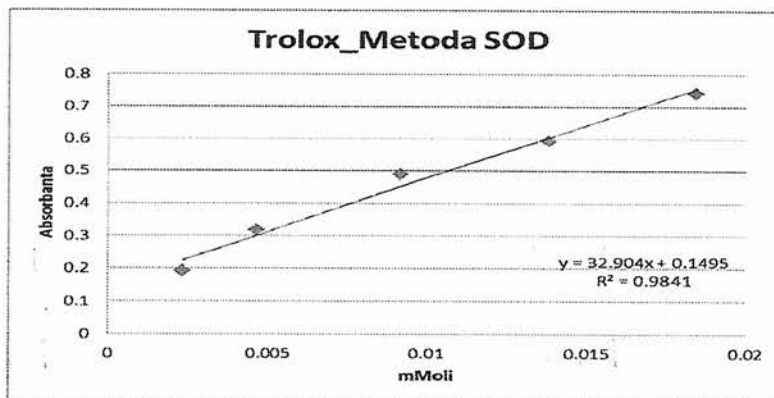


Fig. 1.1

Tabelul 1.2

Proba	micromoli echivalenți Trolox / 100 ml extract
<i>Alnus glutinosa</i> MG=D1	464
<i>Ficus carica</i> MG=D1	0
<i>Juglans regia</i> MG=D1	2387
<i>Ribes nigrum</i> MG=D1	359
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> MG=D1	3755

Concluzii:

Acest studiu a indicat că extractele din muguri de Nuc – *Juglans regia* respectiv din mlădițe de Merișor – *Vaccinium vitis-idaea* au potențialul antioxidant cel mai puternic împotriva radicalilor superoxid. Observațiile clinice ale medicilor au indicat extractul din muguri de Nuc - *Juglans regia* în diabet zaharat, iar cel din mlădițe de Merișor – *Vaccinium vitis-idaea* în combaterea îmbătrânirii. Și extractul din muguri de Arin negru – *Alnus glutinosa* prezintă un potențial antioxidant semnificativ fiind observate la acest extract efecte benefice în ateroscleroză. Pe de altă parte prezența radicalilor superoxid este legată de instalarea unor afecțiuni ca diabetul zaharat, ateroscleroza sau a proceselor de îmbătrânire.

Cap. 2. Evaluarea inhibării xantinoxidazei

Radicalii liberi provin din procese metabolice normale, din reacții enzimatice și non-enzimatice, de ionizare. Sunt produși de respirație, fagocitoză, sinteza de prostaglandine (calea arahidonatilor), de sistemul citocromului P450, xantinoxidază, în caz de inflamație, exercițiu fizic sau ischemie. Ei fiind prezenți în mitocondrie și peroxizomi. Xantinoxidaza, lipogenaza sau ciclooxygenaza sunt câteva dintre enzimele care pot produce stres oxidativ de termen scurt, proces care este indus și de traumatisme, infecții, arsuri, hipertoxie, toxine sau exercițiu fizic, ducând la activarea fagocitozei, eliberarea de ioni de fier și cupru și întreruperea transportului de electroni în fosforilarea oxidativă având ca rezultat formarea de radicali liberi. Eliberarea de xantinoxidază indică afectare hepatică sau infecții gripale. Inhibarea xantinoxidazei duce la reducerea acidului uric sintetizat și prin acesta la protecția articulațiilor. Poate aduce beneficii prin întărirea sănătății cardio-vasculare, reduce stresul oxidativ și

ameliorează simptomele din bronhopatia cronică obstructivă respectiv în afecțiunile oculare date de stresul oxidativ.

Metoda xantinoxidazei folosește xantină ca și substrat pentru enzimă și determină puterea de inhibare a enzimei de către antioxidant, astfel că acesta nu mai poate folosi substratul (xantina).

Materiale și aparate:

Evaluarea s-a realizat spectrofotometric utilizând un aparat Cintra 101, GBC, Australia.

S-au folosit: soluție de xantinoxidază 0,2 U/ml, soluție de xantină 0,15 mM și tampon fosfat pH 7,4. Ca și standard s-a folosit alopurinol. Toate soluțiile s-au realizat în apă ultrapurificată de la un sistem Millipore Simplicity, Millipore-Merck, SUA.

Metoda spectrofotometrică:

Probele: la câte 1,5 ml soluție probă conținând 0,5 microl de extract gemoterapic de *Ribes nigrum*, câte 1 microl din extractele gemoterapice de *Alnus glutinosa* respectiv *Ficus carica* și 5 microl din extractul de *Vaccinium vitis-idaea* în apă ultrapurificată se adaugă 3,9 ml de tampon fosfat respectiv 0,6 ml xantinoxidază 0,2 U/ml. Toate amestecurile s-au incubat pentru 10 minute la 25°C, apoi s-a adăugat la fiecare câte 4,5 ml xantină 0,15 mM și s-au mai incubat 30 minute la 25°C.

Control: la 1,5 ml apă ultrapurificată se adaugă 3,9 ml de tampon fosfat respectiv 0,6 ml xantinoxidază 0,2 U/ml. Amestecul s-a incubat pentru 10 minute la 25°C, apoi s-a adăugat 4,5 ml xantină 0,15 mM și s-a mai incubat 30 minute la 25°C.

Standard: la 1,5 ml apă ultrapurificată conținând 195 microg alopurinol se adaugă 3,9 ml de tampon fosfat respectiv 0,6 ml xantinoxidază 0,2 U/ml. Amestecul s-a incubat pentru 10 minute la 25°C, apoi s-a adăugat 4,5 ml xantină 0,15 mM și s-a mai incubat 30 minute la 25°C.

Blank: la 9 ml apă ultrapurificată se adaugă 3,9 ml de tampon fosfat respectiv 0,6 ml xantinoxidază 0,2 U/ml. Amestecul s-a incubat pentru 40 minute la 25°C.

Lungimea de undă: 293 nm.

Toate determinările s-au realizat în triplicat, iar fiecare probă în parte s-a citit de 3 ori la aparat. Datele s-au prelucrat cu ajutorul softului Office, Excel.

Rezultate:

În tabelul 2.1 sunt prezentate rezultatele pentru extractele gemoterapice și standard.

Tabelul 2.1

Proba	% Inhibiție
<i>Ribes nigrum</i> MG=D1	12.03
<i>Alnus glutinosa</i> MG=D1	12.14
<i>Ficus carica</i> MG=D1	13.21
<i>Juglans regia</i> MG=D1	0
<i>Vaccinium vitis idaea</i> MG=D1	0.64
Alopurinol 195 microg	61.67

Concluzii:

Trei extracte gemoterapice au un potențial de inhibare a xantinoxidazei la cca 20 % față de de alopurinol (doza zilnică recomandată fiind de 200 mg): extractele din muguri de *Ribes nigrum*, *Alnus glutinosa* și *Ficus carica*, dar dozele la care exercită acest potențial sunt foarte mici, de cca 1000-2000 ori mai mici față de doza uzuală recomandată la o administrare. Ca urmare, la dozele de administrare acest potențial se preconizează a fi semnificativ mult mai mare, similar chiar cu alopurinolul. Extractele din muguri de *Juglans regia* și mlădițe de *Vaccinium vitis-idaea* practic nu au potențial de inhibare a xantinoxidazei. Potențialul de inhibare a xantinoxidazei poate fi unul dintre mecanismele prin care extractul de *Ribes nigrum* își exercită efectele benefice în gripă, afecțiuni ale căilor respiratorii sau în durerile articulare. Pentru extractele din muguri de *Alnus glutinosa* respectiv *Ficus carica* acest potențial de inhibare a xantinoxidazei deschide posibilități de noi utilizări.

Cap. 3. Evaluarea activității antiproteolitice

Proteazele, și în special serin-proteazele, sunt implicate în procesele inflamatorii, ca urmare evaluarea activității antiproteolitice poate sugera un efect antiinflamator al extractelor sau substanțelor studiate.

Activitatea antiproteolitică s-a evaluat folosind procesul de hidroliză a albuminei din serul bovin de către tripsină, una dintre cele mai importante serin-proteaze din organismul uman. Proteinele rămase s-au precipitat cu acid tricloracetic și s-au evaluat prin metoda Lowry.

Materiale și aparate:

Evaluarea s-a realizat spectrofotometric utilizând un aparat Cintra 101, GBC, Australia.

S-au folosit: soluție de tripsină 0,05 % conservată cu EDTA, soluție de albumină serină bovină 10 mg/ml în tampon fosfat pH 7,6, soluție de acid tricloracetic 10 %, reactiv cupric alcalin (50 ml carbonat de sodiu 2 % în hidroxid de sodiu 0,1 M amestecat cu 1 ml sulfat de cupru 0,5 % în tartrat de sodiu și potasiu 1 %), reactiv fosfomolibdenic obținut din molibdat de sodiu și acid fosforic și tampon fosfat pH 7,6. Ca și standard s-a folosit acid salicilic. Toate soluțiile s-au realizat în apă ultrapurificată de la un sistem Millipore Simplicity, Millipore-Merck, SUA.

Metoda spectrofotometrică:

Probele: la câte 1 ml din fiecare extract gemoterapic se adaugă 0,2 ml tripsină 0,05 % și se incubează probele la 37°C timp de 20 minute. Apoi se adaugă 2 ml soluție de albumină serină bovină 10 mg/ml, 4 ml tampon fosfat și apoi se mai incubează la 37°C timp de 20 minute. La final se adaugă 2 ml acid tricloracetic 10 %, 1 ml reactiv cupric alcalin și 0,1 ml reactiv fosfomolibdenic.

Control: la 1 ml apă ultrapurificată se adaugă 0,2 ml tripsină 0,05 % și se incubează probele la 37°C timp de 20 minute. Apoi se adaugă 2 ml soluție de albumină serină bovină 10 mg/ml, 4 ml tampon fosfat și apoi se mai incubează la 37°C timp de 20 minute. La final se adaugă 2 ml acid tricloracetic 10 %, 1 ml reactiv cupric alcalin și 0,1 ml reactiv fosfomolibdenic.

Standard: la 1 ml acid salicilic 1 mM (118 microg/ml) se adaugă 0,2 ml tripsină 0,05 % și se incubează probele la 37°C timp de 20 minute. Apoi se adaugă 2 ml soluție de albumină serină bovină 10 mg/ml, 4 ml tampon fosfat și apoi se mai incubează la 37°C timp de 20 minute. La final se adaugă 2 ml acid tricloracetic 10 %, 1 ml reactiv cupric alcalin și 0,1 ml reactiv fosfomolibdenic.

Blank: apă ultrapurificată.

Lungimea de undă: 750 nm.

Toate determinările s-au realizat în triplicat, iar fiecare probă în parte s-a citit de 3 ori la aparat. Datele s-au prelucrat cu ajutorul softului Office, Excel.

Rezultate:

În tabelul 3.1 sunt prezentate rezultatele pentru extractele gemoterapice și standard.

Tabelul 3.1

Proba	% Inhibiție
<i>Ribes nigrum</i> MG=D1	6.97
<i>Alnus glutinosa</i> MG=D1	0
<i>Ficus carica</i> MG=D1	5.35
<i>Juglans regia</i> MG=D1	12.97
<i>Vaccinium vitis idaea</i> MG=D1	5.47
Acid salicilic 118 microg	1.98

Concluzii:

Extractele din muguri de *Juglans regia* și *Ribes nigrum* prezintă activitatea antiproteolitică mai intensă, fiind de 6,5 respectiv 3,5 ori mai mari față de activitatea a 118 microg de acid salicilic, un standard antiinflamator cunoscut. Aceste date confirmă efectul antiinflamator bun observat la extractul gemoterapic de *Ribes nigrum*, iar pentru cel de *Juglans regia* deschide noi perspective în folosire la nivel intestinal și datorită acțiunii antiproteolitice, antiinflamatoare. Un efect antiproteolitic de cca 2,7 mai mare ca 118 microg de acid salicilic prezintă și extractele gemoterapice de *Ficus carica* și *Vaccinium vitis-idaea*, efect necunoscut până în prezent. Nu s-a constatat o activitate antiproteolitică la extractul gemoterapic de *Alnus glutinosa*.

Cap. 4. Evaluarea potențialului de inhibare a ureazei

Ureazele catalizează hidroliza ureei cu obținerea de amoniac și dioxid de carbon. Ureazele pot fi asociate cu multe simptome și alterări din organism incluzând coma și encefalopatia hepatică, infecții și ulcerații peptice. Studii recente au arătat că *Helicobacter pylori* poate cauza coma și encefalopatia hepatică, ciroză și chiar și ulcer. Dar studiile au arătat și faptul că această bacterie secretă urează, ceea ce poate constitui un marker clinic pentru diagnostic, iar inhibitorii de urează pot avea potențial de a reduce infecția cu *Helicobacter pylori*, de a proteja ficatul și de a proteja stomacul de ulcer peptic.

Efectul de inhibare a ureazei s-a evidențiat pe baza cantității de amoniac eliberat din ureea adăugată, iar identificarea amoniacului se realizează cu reactivul Nessler.

Materiale și aparate:

Evaluarea s-a realizat spectrofotometric utilizând un aparat Cintra 101, GBC, Australia.

S-au folosit: soluție de urează 0,1 mg/ml, soluție de uree 60 mM, soluție de acid tricloracetic 10 %, reactiv Nessler (iodomercurat de potasiu alcalin) și tampon Tris-acid clorhidric pH 8. Ca și standard s-a folosit tiourea. Toate soluțiile s-au realizat în apă ultrapurificată de la un sistem Millipore Simplicity, Millipore-Merck, SUA.

Metoda spectrofotometrică:

Probele: la câte 0,2 ml din fiecare extract gemoterapic se adaugă 0,2 ml urează 0,1 mg/ml, 4 ml tampon Tris-acid clorhidric pH 8 și 0,2 ml uree 60 mM, apoi amestecurile se incubează la 30°C timp de 20 minute. La final se adaugă 2 ml acid tricloracetic 10 % și 0,5 ml reactiv Nessler.

Control: la 0,2 ml apă ultrapurificată se adaugă 0,2 ml urează 0,1 mg/ml, 4 ml tampon Tris-acid clorhidric pH 8 și 0,2 ml uree 60 mM, apoi amestecurile se incubează la 30°C timp de 20 minute. La final se adaugă 2 ml acid tricloracetic 10 % și 0,5 ml reactiv Nessler.

Standard: la 0,2 ml soluție aposă de tiouree (181 microg) se adaugă 0,2 ml urează 0,1 mg/ml, 4 ml tampon Tris-acid clorhidric pH 8 și 0,2 ml uree 60 mM, apoi amestecurile se incubează la 30°C timp de 20 minute. La final se adaugă 2 ml acid tricloracetic 10 % și 0,5 ml reactiv Nessler.

Blank: apă ultrapurificată.

Lungimea de undă: 436 nm.

Toate determinările s-au realizat în triplicat, iar fiecare probă în parte s-a citit de 3 ori la aparat. Datele s-au prelucrat cu ajutorul softului Office, Excel.

Rezultate:

În tabelul 4.1 sunt prezentate rezultatele pentru extractele gemoterapice și standard.

Tabelul 4.1

Proba	% Inhibiție
<i>Ribes nigrum</i> MG=D1	75.19
<i>Alnus glutinosa</i> MG=D1	0
<i>Ficus carica</i> MG=D1	93.38
<i>Juglans regia</i> MG=D1	38.65
<i>Vaccinium vitis idaea</i> MG=D1	61.35
Tiouree 181 microg	7.97

Concluzii:

Extractele din muguri de *Ficus carica*, *Ribes nigrum* și mlădițe de *Vaccinium vitis idaea* prezintă potențialul inhibitor cel mai puternic asupra ureazei, confirmând observațiile clinice conform cărora extractul gemoterapic de *Ficus carica* este benefic în ulcer peptic, cel de *Ribes nigrum* în infecții gripale, iar cel de *Vaccinium vitis-idaea* în infecții intestinale. Un efect ureazo-inhibitor semnificativ prezintă și extractul din muguri de *Juglans regia* explicând parțial efectul benefic în infecții intestinale. Extractul gemoterapic din *Alnus glutinosa* nu prezintă efect inhibitor asupra ureazei.

Cap. 5. Evaluarea potențialului de inhibare a α -chimotripsinei

α -chimotripsina este o enzimă pancreatică, care eliberată în duoden produce proteoliză, acționând ca un antiinflamator, împiedicând formarea de edeme. Produce fibrinoliza prevenind formarea de cheaguri și ajută digestia prin efectul specific proteolitic. Cu toate aceste efecte benefice o sinteză exagerată duce la dezechilibru și simptome nedorite în organism, în primul rând la ulcer duodenal, proliferarea de *Helicobacter pylori* care duce la afectare hepatică, infecții și ulcer peptic, respectiv la proliferarea celulelor tumorale.

Efectul de inhibare a α -chimotripsinei s-a evaluat folosind ca și substrat N-benzoil-L-tirozin-etil ester, fiind cunoscut faptul că α -chimotripsina clivează specific tirozina, triptofanul și fenilalanina.

Materiale și aparate:

Evaluarea s-a realizat spectrofotometric utilizând un aparat Cintra 101, GBC, Australia.

S-au folosit: soluție de α -chimotripsină 16 U/ml, soluție de N-benzoil-L-tirozin-etil ester 1,18 mM, soluție de clorură de calciu 20 mM în tampon Tris-acid clorhidric 80 mM pH 7,8. Toate soluțiile s-au realizat în apă ultrapurificată de la un sistem Millipore Simplicity, Millipore-Merck, SUA.

Metoda spectrofotometrică:

Probele: la câte 1 microl din fiecare extract gemoterapic respectiv 0,1 microl din extracte în 1 ml apă purificată se adaugă 0,1 ml α -chimotripsină 16 U/ml, și apoi amestecurile se incubează la 25°C timp de 20 minute. La final se adaugă 2,8 ml N-benzoil-L-tirozin-etil ester 1,18 mM și 3 ml clorură de calciu 20 mM în tampon Tris-acid clorhidric.

Control: la 1 ml apă purificată se adaugă 0,1 ml α -chimotripsină 16 U/ml, și apoi amestecurile se incubează la 25°C timp de 20 minute. La final se adaugă 2,8 ml N-benzoil-L-tirozin-etil ester 1,18 mM și 3 ml clorură de calciu 20 mM în tampon Tris-acid clorhidric.

Blank: apă ultrapurificată.

Lungimea de undă: 256 nm.

Toate determinările s-au realizat în triplicat, iar fiecare probă în parte s-a citit de 3 ori la aparat. Datele s-au prelucrat cu ajutorul softului Office, Excel.

Rezultate:

În tabelul 5.1 sunt prezentate rezultatele pentru extractele gemoterapice.

Tabelul 5.1

Proba	% Inhibiție
<i>Ribes nigrum</i> MG=D1	5.10
<i>Alnus glutinosa</i> MG=D1	6.09
<i>Ficus carica</i> MG=D1	3.24
<i>Juglans regia</i> MG=D1	4.71
<i>Vaccinium vitis idaea</i> MG=D1	3.38

Concluzii:

Extractele din muguri de *Alnus glutinosa*, *Ribes nigrum* și *Juglans regia* prezintă efectul inhibitor mai puternic asupra α -chimotripsinei, dar și extractele din muguri de *Ficus carica* și mlădițe de *Vaccinium vitis idaea* prezintă efect inhibitor semnificativ. Efectele inhibitoare s-au constatat la cantități foarte mici de extracte, ceea ce indică un posibil efect mai puternic la dozele uzuale recomandate. Rezultatele confirmă observațiile clinice conform cărora extractul gemoterapic de *Alnus glutinosa* are efect benefic în caz de ulcer duodenal, iar cel de *Juglans regia* reglează activitatea pancreatică.

Cap. 6. Evaluarea potențialului de inhibare a tirozinazei

Tirozinaza este enzima responsabilă de reglarea sintezei de melanină și prin acesta controlează hiperpigmentarea la nivel cutanat. Dar tot tirozinaza este responsabilă de oxidarea unor structuri fenolice, incluzând și catecolaminele cum ar fi și dopamina. Studiile au demonstrat faptul că scăderea concentrației de dopamină la nivelul structurii din corpului striat din creier duce la instalarea bolii Parkinson deoarece nu se mai pot transmite neuronal impulsurile nevoase mediate de dopamină legate

de mișcare. Astfel, apar simptomele nedorte de tremor, rigiditate, bradichinezie. Inhibitorii de tirozinază ar putea avea efect benefic în boala Parkinson prin reducerea degradării dopaminei de către tirozinază.

Evaluarea efectului de inhibare a tirozinazei s-a realizat folosind ca substrat L-DOPA.

Materiale și aparate:

Evaluarea s-a realizat spectrofotometric utilizând un aparat Cintra 101, GBC, Australia.

S-au folosit: soluție de tirozinază 250 U/ml, soluție L-DOPA 10 mM și tampon fosfat pH 7. Ca și standard s-a folosit acid ascorbic. Toate soluțiile s-au realizat în apă ultrapurificată de la un sistem Millipore Simplicity, Millipore-Merck, SUA.

Metoda spectrofotometrică:

Probele: la câte 0,4 ml din fiecare extract gemoterapic se adaugă 0,4 ml tirozinază 250 U/ml și 7,4 ml tampon fosfat, apoi amestecurile se incubează la 30°C timp de 15 minute. La final se adaugă 0,2 ml L-DOPA 10 mM.

Control: la 0,4 ml tirozinază 250 U/ml se adaugă 7,8 ml tampon fosfat, apoi se incubează la 30°C timp de 15 minute. La final se adaugă 0,2 ml L-DOPA 10 mM.

Standard: la 0,4 ml soluție cu 200 microg acid ascorbic se adaugă 0,4 ml tirozinază 250 U/ml și 7,4 ml tampon fosfat, apoi amestecurile se incubează la 30°C timp de 15 minute. La final se adaugă 0,2 ml L-DOPA 10 mM.

Blank: apă ultrapurificată.

Lungimea de undă: 475 nm.

Toate determinările s-au realizat în triplicat, iar fiecare probă în parte s-a citit de 3 ori la aparat. Datele s-au prelucrat cu ajutorul softului Office, Excel.

Rezultate:

În tabelul 6.1 sunt prezentate rezultatele pentru extractele gemoterapice și standard.

Tabelul 6.1

Proba	% Inhibiție
<i>Ribes nigrum</i> MG=D1	25.46
<i>Alnus glutinosa</i> MG=D1	48.64
<i>Ficus carica</i> MG=D1	37.81
<i>Juglans regia</i> MG=D1	15.46
<i>Vaccinium vitis idaea</i> MG=D1	46.20
Acid ascorbic 200 microg	71.85

Concluzii:

Extractele din muguri de *Alnus glutinosa* și mlădițe de *Vaccinium vitis-idaea* prezintă efectul inhibitor mai puternic asupra tirozinazei, cam la 67 % din efectul a 200 microg acid ascorbic, dar și extractul din muguri de *Ficus carica* prezintă efect inhibitor semnificativ. Extractele gemoterapice de *Ribes nigrum* și *Juglans regia* prezintă efect inhibitor mai scăzut. Rezultatele confirmă observațiile clinice conform cărora extractul gemoterapic de *Alnus glutinosa* are efect benefic asupra funcțiilor creierului. Studiul deschide noi perspective de recomandare pentru extractele din mlădițe de *Vaccinium vitis-idaea*.

Cap. 7. Evaluarea potențialului de inhibare a acetilcolinesterazei

Acetilcolinesteraza este enzima care hidrolizează acetilcolina și alte coline. Acetilcolina este un neurotransmițător important fiind implicat în multe procese la nivel cerebral și în joncțiunea neuromusculară. La nivel cerebral acetilcolina joacă rol important în procesele de atenție, memorie, motivare. Studiile au arătat eficiența unor anti-acetilcolinesterazice reversibile în boala Alzheimer și miastenia gravis.

Evaluarea efectului de inhibare a acetilcolinesterazei s-a realizat folosind ca substrat acetilcolina și ca reactiv acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic.

Materiale și aparate:

Evaluarea s-a realizat spectrofotometric utilizând un aparat Cintra 101, GBC, Australia.

S-au folosit: soluție de acetilcolinesterază 6 U/ml, soluție de acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic 3 mM, soluție de iodură de acetilcolină 15 mM și tampon Tris-acid clorhidric 50 mM pH 8. Ca și standard s-a folosit paration, un pesticid organofosforic, cunoscut ca un inhibitor ireversibil de acetilcolinesterază. Toate soluțiile s-au realizat în apă ultrapurificată de la un sistem Millipore Simplicity, Millipore-Merck, SUA.

Metoda spectrofotometrică:

Probele: la câte 0,01 ml din fiecare extract gemoterapic respectiv 0,001 ml din extractul gemoterapic de *Juglans regia* în 1 ml apă purificată se adaugă 6 ml tampon Tris-acid clorhidric, 0,05 ml acetilcolinesterază 6 U/ml, apoi amestecurile se incubează la 30°C timp de 15 minute. La final se adaugă 0,1 ml acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic 3 mM și 0,1 ml acetilcolină 15mM.

Control: la 1 ml apă purificată se adaugă 6 ml tampon Tris-acid clorhidric, 0,05 ml acetilcolinesterază 6 U/ml, apoi amestecurile se incubează la 30°C timp de 15 minute. La final se adaugă 0,1 ml acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic 3 mM și 0,1 ml acetilcolină 15mM.

Standard: la 1 ml apă purificată care conține 8,11 microg paration se adaugă 6 ml tampon Tris-acid clorhidric, 0,05 ml acetilcolinesterază 6 U/ml, apoi amestecurile se incubează la 30°C timp de 15 minute. La final se adaugă 0,1 ml acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic 3 mM și 0,1 ml acetilcolină 15mM.

Blank: apă ultrapurificată.

Lungimea de undă: 320 nm.

Toate determinările s-au realizat în triplicat, iar fiecare probă în parte s-a citit de 3 ori la aparat. Datele s-au prelucrat cu ajutorul softului Office, Excel.

Rezultate:

În tabelul 7.1 sunt prezentate rezultatele pentru extractele gemoterapice și standard.

Tabelul 7.1

Proba	% Inhibiție
<i>Ribes nigrum</i> MG=D1	13.36
<i>Alnus glutinosa</i> MG=D1	7.90
<i>Ficus carica</i> MG=D1	16.05
<i>Juglans regia</i> MG=D1	20.15
<i>Vaccinium vitis idaea</i> MG=D1	11.94
Paration 8,11 microg	14.07

Concluzii:

Extractele din muguri de *Juglans regia* și *Ficus carica* prezintă efectul inhibitor mai puternic asupra acetilcolinesterazei, chiar mai mare ca 8,11 microg de paration, dar și extractele din muguri de *Ribes nigrum* și mlădițe de *Vaccinium vitis-idaea* prezintă efect inhibitor semnificativ. Extractul gemoterapic de *Alnus glutinosa* prezintă efect inhibitor mai scăzut. Studiul deschide noi perspective de recomandări pentru extractele studiate.

Concluzii finale:

S-au dezvoltat 7 metode enzimactice, *in vitro*, spectrale de evaluare a eficacității extractelor gemoterapice. Aceste metode s-au aplicat în cadrul acestui proiect la 5 extracte specifice ale beneficiarului de proiect: Extractul din muguri de coacăz negru (*Ribes nigrum* L.), Extractul din muguri de arin negru (*Alnus glutinosa* L.), Extractul din muguri de smochin (*Ficus carica* L.), Extractul din muguri de nuc (*Juglans regia* L.) respectiv Extractul din mlădițe de merișor (*Vaccinium vitis-idaea* L.).

Studiile au confirmat anumite beneficii observate deja ale acestor extracte, dar au relevat și valențe noi. Trebuie menționat faptul că efectele s-au putut pune în evidență și la doze foarte mici de până la 1000 de ori sub doza recomandată la o administrare, ceea ce ne prefigurează posibilitatea unor efecte semnificativ mai puternice la dozele recomandate.

La extractul din muguri de coacăz negru (*Ribes nigrum* L.) s-a confirmat efectul benefic în afecțiuni - infecții respiratorii, gripă, dureri articulare datorită efectului inhibitor asupra xantinoxidazei și ureazei respectiv efectul antiinflamator datorită activității antiproteolitice, dar s-au pus în evidență și noi valențe benefice – efectul antiulceros (inhibitor al α -chymotripsinei) respectiv antineurodegenerativ (inhibitor de acetilcolinesterază și moderat de tirozinază).

În cazul extractului din muguri de arin negru (*Alnus glutinosa* L.) s-a confirmat efectul benefic în caz de ateroscleroză datorită efectului antioxidant asupra radicalilor superoxid, antiulceros la nivel de duoden datorită efectului inhibitor asupra α -chimotripsinei și antineurodegenerativ datorită efectului inhibitor asupra tirozinazei și slab asupra acetilcolinesterazei. S-a constatat în plus efect inhibitor asupra xantinoxidazei care subliniază efectul antioxidant al acestui extract, dar deschide și noi perspective de recomandări.

În cazul extractului din muguri de smochin (*Ficus carica* L.) s-a confirmat efectul antiulceros prin inhibarea atât a ureazei cât și a α -chimotripsinei, dar s-au demonstrat și efecte necunoscute până acum cum ar fi activitatea antiproteolitică cu potențial efect antiinflamator, efect antineurodegenerativ datorită inhibării tirozinazei și acetilcolinesterazei, respectiv cel de inhibare a xantinoxidazei.

La extractul din muguri de nuc (*Juglans regia* L.) s-a confirmat efectul benefic în diabet zaharat prin efectul antioxidant asupra radicalilor superoxid, în infecții intestinale prin efectul inhibitor asupra ureazei și de reglare a funcției pancreatice prin inhibarea α -chimotripsinei. Ca și efecte mai puțin cunoscute ale acestui extract studiile au relevat efect antiproteolitic puternic sugerând efect antiinflamator și efect antineurodegenerativ prin inhibarea acetilcolinesterazei respectiv moderat-slab a tirozinazei.

În cazul extractului din mlădițe de merișor (*Vaccinium vitis-idaea* L.) s-a confirmat efectul antiîmbătrânire prin efect antioxidant asupra radicalilor superoxid, efectul benefic în infecții și tranzit intestinal perturbat prin efect inhibitor asupra ureazei și α -chimotripsinei. S-a mai demonstrat la acest extract efect antiproteolitic moderat, posibil efect antiinflamator moderat și efect antineurodegenerativ prin inhibarea tirozinazei și a acetilcolinesterazei.

Metodele dezvoltate în cadrul proiectului sunt aplicabile produselor beneficiarului și aduc confirmarea unor observații care nu aveau fundament științific corespunzător sau demonstrează efecte încă necunoscute ale acestor extracte gemoterapice cu efect pozitiv asupra creșterii calității vieții populației și adaugă valoare acestor produse.

Echipa de cercetare a realizat cele propuse în proiect – a dezvoltat și aplicat metodele la extracte gemoterapice și a predat metodologia beneficiarului pentru a fi implementate în specificația de calitate a produselor în vederea controlului eficienței acestor produse, a pus pe baze științifice anumite observații clinice care nu erau suficient de fundamentate conform cerințelor actuale. Astfel, aceste extracte ale beneficiarului au primit o nouă valoare atât pentru profesioniștii din domeniul sănătății cât și pentru populație. Pornind de la aceste metode beneficiarul va putea testa și alte extracte din portofoliul său, crescând valoarea acestor produse și piața lor de desfacere.

Contractor - Furnizor de servicii

Director general

Reprezentant legal

Rector

Nume și prenume

Prof. Dr. Alexandru IRIMIE

Semnătura

Ștampila

Sef Serviciu Financiar Contabilitate

Nume și prenume

Ramona Persida GHERASIM

Semnătura

Responsabil Proiect

Nume și prenume

Conf. Dr. Daniela Hanganu

Semnătura

Avizat,

Contractor - Beneficiar

Director general

Reprezentant legal

Administrator

Nume și prenume

Igor Kiril PEEV

Semnătura

Ștampila

Director economic

Nume și prenume

Mircea HĂRĂSTĂȘAN

Semnătura

Responsabil Proiect

Nume și prenume

Conf. Dr. Neli-Kinga OLAH

Semnătura

