

## Proiect:

### Studii pe modele in vitro si pe tumori experimentale privind efectul antioxidant al unor produse naturali

Acronim:  
PAOT

Director de proiect:  
Prof. dr. Adriana Muresan

Parteneri :

CO: Universitatea de Medicina si Farmacie „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca – Director de proiect: Prof. dr. Adriana Muresan

P1: Institutul Oncologic “PROF.I.CHIRICUTA” Cluj-Napoca - Responsabil de proiect: CSI dr. Ion Dan Postescu

P2: Universitate de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Cluj-Napoca - Responsabil de proiect: Prof. dr. Nastasia Pop

P3: INCDO-INOE2000, filiala Institutul de Cercetari pentru Instrumentatie Analitica Cluj-Napoca - Responsabil de proiect: CSIII dr. Tiberiu Frentiu

P4: Universitatea Babes-Bolyai Cluj-Napoca - Responsabil de proiect: Prof. dr. Grigore Damian

Perioada de desfasurare:  
2005-2008

Valoarea contractului: 1.000.000

Membrii echipei: gradul didactic si titlul stiintific numele si prenumele (eventual adresa de mail).

UMF "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca (Coordonator)

- |                                  |                    |
|----------------------------------|--------------------|
| 1. Prof. dr. Adrian Muresan      | - director proiect |
| 2. Conf. dr. Soimita Suci        | - membru proiect   |
| 3. Conf. dr. Clichici Simona     | - membru proiect   |
| 4. CS III dr. Doina Colcear      | - membru proiect   |
| 5. CSI. dr. Doina Daicoviciu     | - membru proiect   |
| 6. Sef lucrari dr. Lavinia Sabau | - membru proiect   |
| 7. Conf. dr. Achim Marcela       | - membru proiect   |
| 8. Sef lucrari dr. Joanta Adela  | - membru proiect   |
| 9. Sef lucrari dr. Chis Irina    | - membru proiect   |
| 10. Chim. Decea Nicoleta         | - membru proiect   |
| 11. Sef lucrari dr. Alb Camelia  | - membru proiect   |
| 12. Dr. Mitre Daniela            | - membru proiect   |

Parteneri proiect

**Institutul Oncologic “PROF.I.CHIRICUTA” Cluj-Napoca**

- |                               |                          |
|-------------------------------|--------------------------|
| 13. CS I dr. Postescu Ion Dan | - responsabil de proiect |
| 14. Dr. Soritau Olga          | - membru proiect         |
| 15. Dr. Perde-Schrepler Maria | - membru proiect         |
| 16. Dr. Brie Ioana            | - membru proiect         |
| 17. Chim. Tatomir Corina      | - membru proiect         |
| 18. Dr. Chereches Gabriela    | - membru proiect         |
| 19. Biol. dr. Virag Piroska   | - membru proiect         |
| 20. Chim. Fischer-Fodor Eva   | - membru proiect         |
| 21. Marina Ileana             | - membru proiect         |

**Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Cluj-Napoca**

- |                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| 22. Prof. dr. Nastasia Pop      | - responsabil de proiect |
| 23. Sef lucrari drd. Anca Babes | - membru proiect         |

- 24. Asist drd. Claudiu Bunea - membru proiect
- 25. Asist drd. Ioana Micu - membru proiect
- 26. Tiberia Ioana Pop - membru proiect
- 27. Matea Cristian Tudor - membru proiect

**INCDO-INOE 2000, Filiala Institutul de Cercetari pentru Instrumentatie Analitica Cluj-Napoca**

- 28. CSIII. dr. Tiberiu Frentiu - responsabil proiect
- 29. CSIII Maria Paul - membru proiect
- 30. CSIII Ursu Monica - membru proiect
- 31. CSIII Gomoiescu Despina - membru proiect
- 32. CSIII Abraham Bela - membru proiect
- 33. CSIII Incze Ana Maria - membru proiect
- 34. Colcear Ioan - membru proiect
- 35. CS drd. Senila Marin - membru proiect
- 36. CS drd. Konradi Levei Erika - membru proiect
- 37. Ladar Lucia - membru proiect

**Universitatea Babes-Bolyai Cluj-Napoca**

- 38. Prof. dr Grigore. Damian - responsabil proiect
- 39. Con. dr. Miclaus Vasile - membru proiect
- 40. Conf. dr. Cimpoiu Claudia - membru proiect
- 41. Asist drd. Vedeanu Nicoleta - membru proiect
- 42. Fiz. dr. Petrisor Dina - membru proiect

**Obiective generale:**

- realizarea unor studii pe modele in vitro/ in vivo (tumori experimentale) si RES a stresului oxidativ si evaluarea efectului antioxidant al unor produse naturali (bogati in catechine, tocotrienoli si cisteina).
- implicarea si formarea de tineri specialisti in domeniul abordat

**Obiective specifice:**

Proiectul, si-a propus realizarea urmatoarelor obiective masurabile:

- Studii pentru realizarea unor modele experimentale in vitro si in vivo, pentru inducerea stresului oxidativ si evaluarea efectului antioxidant al unor produse naturali (bogati in catechine, tocotrienoli si cisteina)
  - Studii pentru identificarea unor surse naturale de catechine, tocotrienoli, cisteina
  - Metoda de obtinere extractelor catechinice din struguri rosii, vinuri
  - Metoda de obtinere a unor solutii concentrate cu catechine, tocotrienoli si cisteina
  - Elaborare, realizare, modele experimentale: in vivo - ascita Ehrlich la soareci-, in vitro - pe linii celulare-, metoda RES pe sisteme biologice, pentru inducerea, evaluarea si combaterea stresului oxidativ prin catechine, tocotrienoli si cisteina
    - Experimentare modele de studiu in vivo/in vitro a unor produse naturali (bogati in catechine, tocotrienoli, cisteina)
      - Evaluarea si demonstrarea efectului antioxidant al catechinelor, tocotrienolilor, cisteinei, pe modele experimentale in vivo, in vitro, RES
      - Diseminarea pe scara larga prin comunicarea, publicarea nationala si internationala a rezultatelor si participarea la manifestari stiintifice, in vederea schimbului de informatii (articole, pagini WEB, CD-ROM) si in vederea realizarii de parteneriate public-private.

**Rezumatul proiectului**

Proiectul de cercetare a urmarit realizarea unor studii pe modele in vitro si in vivo (tumori experimentale), asupra efectelor stresului oxidativ si evaluarea efectului antioxidant al unor produse naturali (bogati in catechine, tocotrienoli si cisteina). Demonstrarea implicarii stresului oxidativ in carcinogeneza atrage dupa sine si gasirea unor solutii de contracarare a efectului speciilor reactive de oxigen. Pe plan mondial se acorda o importanta din ce in ce mai mare produsilor naturali care au o biodisponibilitate crescuta si nu prezinta toxicitate. Proiectul nostru, prin obiectivele propuse, s-a alaturat efortului general de gasire a unor solutii naturale, inovative, de combatere a stresului oxidativ si implicit de prevenire a bolii canceroase cu implicatii deosebite in cresterea gradului de sanatate a populatiei. La ora actuala se fac studii privitoare la efectul antioxidant si antitumoral al unor noi compusi naturali cum sunt tocotrienolii, cisteina si

catechinele. In ceea ce priveste efectul antioxidant al tocotrienolilor, s-a stabilit ca sunt de 40-60 de ori mai puternic antioxidanti decat tocoferolii din Vitamina E.

Catechinele, care se gasesc in strugurii rosii, au o puternica actiune antioxidanta prin captarea radicalilor liberi oxigenati. Actiunea antioxidanta a catechinelor din strugurii rosii a fost studiata in ultimii ani mai ales in ceea ce priveste efectul de reducere a oxidarii LDL colesterolului si mai putin ceea ce priveste efectul antitumoral. Proiectul a constituit o modalitatea de studiere si evaluare proprietatilor antioxidante si/sau posibile antitumorale ale unor produse naturali, pentru dezvoltarea unor noi procese si biotehnologii pentru sanatate.

Acestea vor contribui la imbunatatirea prevenirii cancerului si, implicit, la optimizarea asigurarii serviciilor de sanatate pentru cetatenii europeni

## **Etapa I - Studii modele experimentale in vitro/ in vivo, RES stres oxidativ. Identificare surse, elaborare, realizare metode obtinere extracte cu catechine, tocotrienoli, cisteina.**

**Perioada de desfasurare**  
oct. 2005 - dec. 2005

### **Obiective etapa**

Etapa I a urmarit: realizarea activitatii de documentare privind implicatiile stresului oxidativ in dezvoltarea bolii canceroase (invazie, metastazare), efectele antioxidante ale unor produsilor naturali hidro si lipo solubili (catechine, cisteina si tocotrienoli), cat si o documentare privind realizarea unor modele experimentale in vivo pentru evaluarea stresului oxidativ si influenta antioxidantilor naturali in bolile canceroase; realizarea activitatii de documentare privind metodele de laborator si studii pe modele experimentale in vitro privind multiplele efecte biologice pe care produsii de studiat le prezinta (catechine, tocotrienoli, compusi tiolici); realizarea cercetarii in literaturii de specialitate privind metoda RES pe sisteme biologice si realizarea activitatii de documentare privind sursele naturale de catechine, tocotrienoli, cisteina, metode de obtinere si determinare ca si activitate de cercetare aplicativa (recoltarea de probe de struguri in vederea obtinerii de extracte catechinice; prelucrarea probelor cu separarea

Pentru realizarea etapei I de executie, Planul de realizare, conform contract, a prevazut urmatoarele obiective:

*Activitate I.1 Studii modele experimentale in vitro/ in vivo, RES -stres oxidativ. Identificare surse naturale antioxidanti*

*Activitatea I.2 Elaborare si realizare metoda de laborator de obtinere a extractelor catechinice din struguri rosii pe directii diferite de productie (struguri de masa, vinuri)*

### **Rezumat etapa**

S-a realizat activitatea de documentare privind **implicatiile stresului oxidativ in dezvoltarea caracterului malign**: crestere necontrolata, instabilitate genomica, rezistenta la chimioterapie, invazie si metastazare. Prezenta stresului oxidativ in cancer este sugerata de nivelul mult mai mare al 8-hidroxi-2-dezoxiguanozinei in tesuturile tumorale comparativ cu tesuturile normale corespunzatoare. Exista mai multi factori care contribuie la acest fenomen. In primul rand in tumori apar modificari metabolice. Celulele tumorale pot produce cantitati mai mari de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ca rezultat al actiunii NADPH-oxidazei, enzima reglata de GTP-aza Rac1 aflata sub controlul oncogenei Ras. De asemenea in tesuturi cum este cel al tumorilor mamare in care este supraexprimata timidin fosforilaza excesul de SRO se datoreaza si actiunii reducatoare puternice a 2-dezoxi-D-ribozo1-fosfatului.

Un alt factor care poate determina un exces de SRO in carcinoame este hipoxia si reducerea nivelului glucozei ca urmare a unei slabe vascularizatii. Un alt factor care contribuie la cresterea stresului oxidativ in tumori este prezenta macrofagelor care infiltreaza tesutul tumoral. Aceste celule produc de asemenea un numar considerabil de SRO. Un aport important de radicali este adus de diferitele interventii terapeutice: administrarea de citostatice si iradierea sunt binecunoscute generatoare de stres oxidativ.

Studiu privind efectele antioxidante ale unor produse naturali hidro si lipo solubili (catechine, cisteina si tocotrienoli).

Catechinele sau flavanolii: denumesc o familie de compusi polifenolici raspanditi predominant in ceaiul verde dar cantitati mai mici din acesti compusi flavonoidici se gasesc si in ceaiul negru ( fermentat ), vin si struguri. Datorita activitatii lor antioxidante puternice, de aproximativ 25-100 ori mai puternice decat cea a vitaminelor C si E, acesti derivati au fost studiatii in legatura cu proprietatile anticancerigene, cardio- sau imunoprotectoare. Polifenolii din alimente de origine vegetala si unele bauturi (ceai verde, vin rosu) par a fi determinanti ai unui risc redus de cancer. Aceasta ipoteza se bazeaza pe dovezi din ce in ce mai numeroase provenite din studii epidemiologice, studii pe animale si experimente in vitro.

Tocoferoli: efectul de stingere al radicalilor este comparabil pentru  $\alpha$ -tocopherol si  $\alpha$ -tocotrienol in solutie de hexan. In schimb in lipozomi constanta de viteza de reactie a  $\alpha$ -tocotrienolului este de 1,5 ori mai mare ca a  $\alpha$ -tocopherolului. In microzomii de ficat de sobolan eficacitatea  $\alpha$ -tocotrienolului in protectia contra peroxidarii lipidice ( indusa cu  $Fe^{2+} + NADPH$  ) a fost de 40 ori mai mare decat in cazul  $\alpha$ -tocopherolului. De asemenea,  $\alpha$ -tocotrienolul a fost de 65 de ori mai puternic in protectia citocromului P 450 in oxidarea peroxidica. Au fost propuse explicatii referitor la aceste diferente :  $\alpha$ -tocotrienolul este localizat mai aproape de suprafata membranei (evidenta prin studii RMN) si totodata are o distributie mai uniforma in stratul dublu membranal proprietati care faciliteaza o mai buna interactiune cu radicalii peroxil.

Cisteina (acidul  $\alpha$ -amino- $\beta$ -propionic) : este un aminoacid continut intr-o larga varietate de proteine care are actiune antioxidanta. Mecanismul sugerat de autori ar fi cresterea nivelului sintezei GSH si prin aceasta un efect de detoxifiere, dar si de stimulare a sistemului imunitar. Cisteina determina si efecte inhibitorii ale progresiei tumorale a angiogenezei atat in sisteme in vitro cat si in vivo. **Catechine**: studiile pe animale purtatoare de tumori transplantate sau carora li se induce tumori prin agenti chimici sau fizici sunt foarte utile pentru a constata care sunt efectele protectoare ale unor agenti antioxidanti in vivo. O serie de experimente efectuate pe soareci SENCAR carora li s-au administrat compusi catechinici prezenti in ceaiul verde fie prin aplicare topica fie prin administrare pe cale orala si care au fost supusi ulterior carcinogenezei pielii cu 7,12 dimetilbenz(a) antracen au demonstrat prelungirea perioadei de aparitie si reducerea numarului de tumori ale pielii. In carcinogeneza cu radiatie UV-B la soareci nuzi SKH s-au obtinut de asemenea un numar mai mic de tumori la animalele tratate cu amestecul catechinic administrat fie oral fie aplicat topic. Efectul a fost mai puternic atunci cand acesta a fost administrat continuu pe cale orala. Aplicarea topica individuala a unor compusi polifenolici a inhibat inflamatiile produse de promotor - TPA- iar efectul a fost dependent de doza si de natura polifenolilor studiatii. **Tocotrienoli**: studii in vitro au demonstrat ca fractia bogata in tocotrienoli din uleiul de palmier inhiba cu 50% cresterea celulelor tumorale mamare de soarece in timp ce la aceeasi doza  $\gamma$ -tocopherolul nu are nici un efect.  $\alpha$ - si  $\gamma$ - tocotrienolul au fost eficiente in tratamentul tumorilor de transplant sarcomul 180, ascita Ehrlich si carcinomul IMC dar s-au dovedit ineficace fata de leukemia P388 la doze de 5-40mg/kg/zi comparative cu  $\alpha$  tocoferolul prelungind semnificativ timpul de supravietuire al animalelor purtatoare de tumora Ehrlich fara a fi eficiente in cazul sarcomului 180 si carcinomului IMC. Activitatea antitumorală a  $\gamma$ -tocotrienolului a fost mai eficient decat izomerul  $\alpha$ . **Cisteina**: intr-o serie de experimente a fost urmarit efectul administrarii de NAC si doxorubicina (DOX) la soareci purtatori de melanom B16-F10. DOX a redus semnificativ numarul de metastaze pulmonare dupa administrare i.v. ulterior grefei i.v. de celule tumorale, iar NAC a inhibat aparitia metastazelor atunci cand a fost introdus in mediul de suspensie al celulelor grefate/tratamentul combinat de DOX si NAC a fost foarte eficient prezentand un efect sinergic cu reducerea numarului de metastaze pulmonare.

**Studii privind metoda RES pe sisteme biologice.** Principalele caracteristici ale spectroscopiei de rezonanta electronica de spin (RES), date de selectivitate, specificitate, sensibilitate si caracter non-invaziv, impune aceasta tehnica in domenii medicale si biotehnologice. Metoda de detectie a radicalilor liberi prin spectroscopie RES, este de observare directa in cazul cand stabilitatea acestora este mare (radicalii din mediile solide) si utilizarea capcanelor de spin.

**Studii pentru identificarea unor surse naturale de catechine, tocotrienoli, cisteina, metode de obtinere si determinare a catechinelor, tocotrienolilor si cisteinei.** S-a elaborat un studiu privind metodele de prelucrare a extractelor catechinice:

*Tehnici de extractie* - se utilizeaza de regula metanol, in amestec cu acetona si apa, la temperatura camerei. Din extractul brut se face o repartitie apa : eter etilic, acizii fenolici liberi fiind retinuti in eter. Formele conjugate si insolubile se saponifica cu NaOH in mediu inert, iar extractul saponificat este apoi extras in eter.

*Compusi fenolici:* s-au separat prin extractie in amestecuri de solventi organici si apoi evaluati prin diverse metode: metoda spectrofotometrica *Folin-Ciocalteu*, metode de precipitare, metode enzimice; electroforeza pentru separarea acizilor fenolici

*Taninuri condensate (proantocianii):* s-au obtinut prin extractie in amestecuri de solventi si apoi determinare prin metoda spectrofotometrica - *testul cu vanilina* si metode cromatografica HPLC - separarea si fractionarea taninurilor de acizii fenolici.

*Tocoferoli:* produsii extrasi din plantele bogate in lipide precum si uleiurile vegetale sunt principalele surse de vitamina E. Tocotrienolii se regasesc in concentratii ridicate in uleiul de palmier si taratele de orez . Alte surse naturale sunt: uleiul de cocos , untul de cacao, soia, germeni de orz si grau. Tocotrienoli se gasesc de asemenea in carne si oua. Uleiul de floarea soarelui , alune, arahide , susan si masline contin doar tocoferoli.

*Cisteina:* proteina din zer, proteina din soia au o biodisponibilitate mai crescuta si ofera si alti compusi care participa la sinteza glutatationului, cum sunt acidul glutamic si glicina. Dintre acestea, proteina din zer s-a dovedit ca determina a cresterea a glutatationului si a enzimei glutatation-peroxidaza implicata in reducerea oxidarii lipidelor. Ca urmare, a constarii ca taninurile catechinice se gasesc in cantitate mai mare in strugurii rosii, comparativ cu cei albi, pentru realizarea obiectivelor, studiul propus in proiect a fost efectuat pe astfel de soiuri. Acumularea catechinelor este influentata de biotop, de aceea recoltarea probelor de struguri s-a realizat din doua zone viticole diferite, atat din soiuri de struguri de masa cat si soiuri de struguri pentru vin. Strugurii proaspeti au fost adusi si prelucrati in laborator. S-a facut analiza mecanica a probelor de de struguri, prin separarea partilor solide: rahis, pielite si seminte, in urma tehnologiei de vinificare. Probele obtinute din struguri de diferite soiuri, au fost analizate in continuare in cadrul laboratorului. S-au prelucrat probele prin tehnica extractiei in amestec de solventi organici metanol acetona si apa si apoi s-a determinat continutul total in polifenoli, total taninuri, catechine, epicatechine, etc.

### **Concluzii etapa I**

S-a realizat activitatea de documentare privind:

- Studii legate de implicatiile stresului oxidativ in dezvoltarea bolii canceroase (invazie, metastazare);
- Studii privind efectele antioxidante ale unor produse naturali hidro si lipo solubili (catechine, cisteina si tocotrienoli), ca si o documentare privind realizarea unor modele experimentale in vivo pentru evaluarea stresului oxidativ si influenta antioxidantilor naturali in bolile canceroase;
- Studii privind metoda RES pe sisteme biologice;
- Studii privind sursele naturale de catechine, tocotrienoli, cisteina, metode de obtinere si determinare ca si activitate de cercetare aplicativa care a constat in recoltarea de probe de struguri in vederea obtinerii de extracte catechinice; s-a facut prelucrarea probelor cu separarea partilor componente (pielite, seminte, rahis) si uscarea lor; s-au obtinut extracte catechinice si s-a elaborat metodologia de determinare a catehinelor din probele uscate.

**Etapa II - Experimentare extracte catechinice , determinari HPLC. Elaborare/realizare metoda de obtinere solutii tocotrienoli, cisteina; Modele in vivo/in vitro, RES-evaluare efect antioxidant/antitumoral a solutiilor cu catechine.**

**Perioada de desfasurare**  
**dec. 2005 - iulie 2006**

### **Obiective etapa**

Etapa II a fost destinata experimentarii metodei de laborator de obtinere a extractelor si concentratelor catechinice din struguri rosii si determinarii prin metoda HPLC a continutului de catechine din concentratele obtinute. S-a elaborat si realizat metoda de obtinere a unor solutii concentrate cu tocotrienoli si cisteina, modele in vivo -ascita Erlich la soareci- pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu catechine. S-a elaborate si realizat modelul experimental in vitro- linii celulare, pentru evaluarea efectului antioxidant al solutiilor cu catechine precum si studiul RES in vivo/in vitro a solutiilor cu catechine.

Pentru realizarea etapei de executie Planul de realizare, conform contract, a prevazut urmatoarele obiective:

*All.1 Experimentare metoda de laborator de obtinere extractelor si concentratelor catechinice din struguri rosii si determinari prin metoda HPLC a continutului de catechine din concentratele obtinute;*

*All.2 Elaborare si realizare metoda de obtinere a unor solutii concentrate cu tocotrienoli si cisteina;*

*All.3 Elaborare si realizare modele in vivo -ascita Erlich la soareci- pentru evaluat efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu catechine. Elaborare si realizare model experimental in vitro- linii celulare- pentru evaluarea efectului antioxidant al solutiilor cu catechine. Elaborare si realizare de studiu RES in vivo/in vitro a solutiilor cu catechine.*

## **Rezumat etapa**

Au fost obtinute si caracterizate, inclusiv HPLC, extracte cu catechine provenite din parti diferite ale mai multor soiuri de struguri rosii. Pentru experimentare a fost ales extractul de seminte de struguri rosii din soiul Burgund Mare de Recas, care a prezentat un continut ridicat de polifenoli, ca si o intensa activitate antioxidanta, apreciata prin masuratori biochimice si RES. Dozele cu efect antioxidant si efectele toxice ale extractului au fost determinate pe linii celulare stabilizate DL 50 si efectele antioxidante, si antitumorale au fost urmarite pe tumora Ehrlich la soareci. Au fost realizate metode de obtinere a solutiilor de tocotrienoli si cisteina.

Etapa II, **a avut ca scop identificarea unor surse naturale de catechine in taninurile din diferitele parti componente ale strugurilor, identificarea metodelor de obtinere si determinare a acestor compusi cu efect antioxidant.** Strugurele contine un numar mare de substante fenolice a caror importanta, in metabolismul si dezvoltarea vitei de vie, este egala cu a glucidelor, acizilor organici, substantelor proteice si a sarurilor minerale. Polifenolii se acumuleaza in partile solide ale strugurilor (rahis, pielite, seminte) si prin procesul de macerare-fermentare pe bostina trec in must si vin. Polifenolii totali in struguri au valori cuprinse intre: 2,9-5,7 g/kg.

Cantitatea de compusi fenolici din struguri, depinde de soi, de conditiile climatice anuale, de sol si factori agrotehnici. Ca urmare, a faptului ca taninurile catechinice se gasesc in cantitate mai mare in strugurii rosii, comparativ cu cei albi, studiul propus in proiect a fost efectuat pe soiuri rosii.

Acumularea catechinelor este influentata de biotop, de aceea recoltarea probelor de struguri s-a realizat din doua zone viticole diferite, atat din soiuri de struguri de masa (Muscat de Hamburg), cat si soiuri de struguri pentru vin (Burgund mare, Cabernet Sauvignon, Merlot).

Avand in vedere, data tarzie a aprobarii proiectelor, probele de struguri au fost recoltate din singurele zone unde nu se incheiase recoltatul strugurilor: Recas si Buzau (centrul viticol Merei).

Strugurii proaspeti au fost adusi si prelucrati in laboratorul de Viticultura de la Facultatea de Horticultura, USAMV, Cluj-Napoca. S-a facut analiza mecanica a probelor de cate un kilogram de struguri, prin separarea mustului si a partilor solide: rahis, seminte, pielite si seminte. Probele obtinute dintr-un kilogram de struguri din fiecare proba, au fost analizate in continuare in laboratorul „AGRIAL”, de la USAMV Cluj-Napoca, unde s-a determinat continutul in polifenoli totali, taninuri, catechine, epicatechine, galocatechine, epigalocatechine, etc.

Etapele de lucru au constat in: prelucrarea probelor, determinarea amprentei spectrale UV-VIS (190-600 nm), dozarea fenolilor totali (Metoda Folin – Ciocilteu) si determinarea gruparilor catecol si galoil prin complexare cu fier.

Probele supuse analizei au fost: must (M), pielita (P), seminte (S), rahis (R). Mustul (M) a fost filtrat si pastrat la congelator. Pielita, semintele si rahisul (P, S, R) au fost uscate in etuva la 65 °C. Dupa uscare, probele au fost macinate si pastrate la  $t < 25$  °C, la loc uscat pentru determinari ulterioare.

Evidentierea spectrofotometrica directa pe baza absorbtiei specifice in UV, realizarea amprentei spectrale, a evidentiat unele clase de compusi fenolici. S-a folosit spectrul UV-VIS pe domeniul de lungime de unda  $\lambda = 190-600$  nm, cu spectrofotometrul Jasco V-530. Pentru toate probele au fost facute diverse dilutii, pentru a include spectrul in domeniul de absorbtii dorit.

Determinarea continutului de fenoli totali din must (M), pielita (P), seminte (S) si rahis (R), s-a realizat prin masurarea densitatii optice a unui extract primar obtinut din probe, care prin complexare cu reactivul Folin-Ciocilteu absoarbe in domeniul Vis ( $\lambda = 750$  nm). Evaluarea spectrofotometrica a (epi)catechinelor si a (epi)galocatechinelor s-a realizat prin complexare diferentiata cu  $Fe^{3+}$  cu formarea de complexi  $Fe^{3+}$ -catechine si respectiv  $Fe^{3+}$ -galocatechine, complexi cu absorbtii specifice la  $\lambda = 580$  nm si respectiv  $\lambda = 680$  nm. Rezultate obtinute au fost urmatoarele: determinarea polifenolilor, prin amprenta spectrala UV-VIS (190-600 nm), la unele soiuri de struguri rosii a evidentiat prezenta polifenolilor in cantitati mai mari la soiurile de struguri

pentru vin, comparativ cu cele pentru masa. Pe probe, s-au inregistrat valori in domeniul de unda 270-280nm pentru pielita, seminte si rahis. Cantitati mai mari de polifenoli, s-au inregistrat la soiurile: Burgund Mare si Cabernet Sauvignon (Recas) in seminte, urmate de soiul Merlot-Dealul Mare si Merlot-Recas. In schimb, la must s-a constatat o distributie larga de semnale fara individualizare.

Determinand amprenta spectroscopica la probele de rahis(ciorchini), pielita, seminte si vin s-a evidenciat prezenta semnalului caracteristic polifenolilor din clasa acizilor benzoici si a flavon 3-olilor (catechine), in domeniul de unda cu lungime de 270-280nm. Acest semnal este maxim la: soiul Merlot – Recas, proba din rahis, la probele de seminte din Cabernet Sauvignon si Burgund mare – Recas si la probele din pielite si vin la soiul Merlot de Dealul Mare. In cazul mustului probele prezinta o distributie larga de semnale in domeniul lungimilor de unda 240-400 nm, fara semnale individualizate, nefiind evidenciate semnale caracteristice antocianilor si acizilor fenolici.

Continutul probelor in polifenoli totali, obtinute prin metoda Folin-Ciocalteu, precum si dozarea gruparilor catechil si galoil, in unitati de absorbtie (UA) , au valorile cele mai mari la soiul Burgund mare-Recas mai ales in probele din seminte, urmate apoi de cele din rahis.

Se constata ca semintele au continutul maxim de 29.800 mg/kg catechine si de 28.840 mg/kg galocatechine libere, mai ales la proba Muscat Hamburg, urmata de proba de seminte din Cabernet Sauvignon de 27.800 mg/kg catechine si 27.360 mg/kg galocatechine libere. Valorile obtinute la rahis sunt in general inferioare, cu exceptia soiului Merlot Recas 41.540 mg/kg catechine si 36.300 mg/kg galocatechine libere. La probele de pielite, toate concentratiile in catechine libere au avut valori sub 500 mg/kg .

Determinarea spectrofotometrica a catechinelor totale eliberate din taninuri consta in precipitarea taninurilor cu albumina serica bovina, urmata de separarea precipitatului prin centrifugare si tratarea supernatantului cu solutie de FeCl<sub>3</sub>. Intensitatea culorii obtinute este proportionala cu cantitatea de catechine totale (catechine, epicatechine, galocatechine si epigalocatechine) si se masoara spectrofotometric la 510 nm.

Valorile obtinute pentru catechine totale, au fost mai mari la probele din rahis la soiul Muscat Hamburg, 11.526 mg/kg si de 3.973mg/kg la proba din seminte la soiul Cabernet Sauvignon-Recas.

Concentratiile de catechine totale obtinute la probele din pielita au fost sub 100 mg/kg, iar la cele din vin sub 100 mg/l. Din cele trei subclase de compusi catechinici investigati (catechine, galocatechine, si catechine din taninuri), la toate probele investigate, clasa cea mai abundenta este reprezentata de catechine, in raport general de 1: 0,7: 0,2 ( pentru rahis) si 1:1: 0,4 ( pentru seminte).

Semintele sunt mai bogate in catechine decat rahis, in raport general de 1,5:1, cu exceptia probei Merlot Recas, unde continutul total de catechine a fost superior in ciorchini(rahis). In pielite si must sau vin, continutul de catechine este scazut. In consecinta, pentru a obtine preparate bogate in catechine, sunt recomandate amestecuri de rahis si seminte.

O a doua activitate din faza a doua a studiului propus a avut ca obiectiv **obtinerea extractelor si concentratelor catechinice si caracterizarea acestora**. Extractele vegetale sunt preparate fluide sau uscate obtinute prin extractia unor produse continute in plante cu diferiti solventi sau amestecuri de solventi. Operatiunea poate fi urmata de o evaporare partiala sau totala a solventului si aducerea masei reziduale la concentratia dorita. Pentru obtinerea extractelor au fost folosite 4 procedee de extractie, utilizând ca solventi apa, respectiv amestecul de etanol:apa in proportie de 1;1, in doua regimuri de temperatura, temperatura camerei si in reflux. Soiurile de struguri care au servit ca sursa de extractiei au fost: 1-Burgund Mare de Recas, 2-Merlot, Dealul Mare, 3-Cabernet Sauvignon, Recas, 4-Merlot, Recas si 5-Muscat Hamburg, Recas. Eficienta procedeelelor de extractie si a sistemelor de solventi utilizate a fost evaluata prin determinarea continutului de fenoli totali prin metoda Folin-Ciocalteu.

Astfel, cea mai eficace metoda de extractie a fost refluxul intr-un amestec etanol/apa 1:1 (50/50, v/v), la o proportie: 1 g material vegetal la 20 ml solvent iar cel mai ridicat continut in derivati fenolici s-a gasit in seminte, urmând in ordine pielitele si ciorchinii. Dintre extractele din seminte cele mai bogate in compusi fenolici au fost soiurile BMR, MDM si MHM.

Aducerea la sec a extractelor, in vederea pastrarii indelungate, s-a facut prin doua metode: extractele apoase s-au liofilizat, iar cele hidroalcoolice s-au evaporat. Rezultatele noastre au aratat ca cel mai bogat continut in fenoli il au semintele, urmate de pielite si ciorchini (rahis). Mentionam, de asemenea, ca cel mai ridicat continut in polifenoli il au varietatile Burgund Mare, Recas, Merlot Dealul Mare si Muscat Hamburg, Recas. Randamentul net superior in polifenoli totali la extractele de seminte ne-a determinat sa facem studiul comparativ al metodelor de extractie doar pe aceasta parte din planta.

O a treia activitate a fazei a doua a studiului a constat in **evaluarea "in vitro" a functiilor antioxidante ale extractelor obtinute**. Aceasta s-a facut prin doua metode diferite: masurarea capacitatii de reducere a radicalului DPPH si prin masuratori RES.

Testul DPPH s-a realizat prin tehnica descrisa de Molyneux, cu mici modificari. Folosirea radicalului liber DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazil) in determinarea capacitatii de reducere a unor compusi se bazeaza pe faptul ca molecula de DPPH este un radical stabil datorita unei delocalizari a sarcinii electronice extinsa pe intreaga molecula, care genereaza o culoare violeta in solutie. In prezenta unui donator de protoni rezulta forma redusa, incolora. Efectul de stingere a radicalilor cu acest test este atribuit caracterului donator de hidrogen al probei de analizat. Capacitatea antioxidanta cea mai mare a fost gasita pentru extractul de seminte de struguri rosii din soiul BMR.

Spectroscopia de Rezonanta Electronica de Spin (RES) permite detectia si analiza speciilor paramagnetice din diferite sisteme, in particular sistemele biologice. In sistemele biologice o mare majoritate a proceselor metabolice, fiziologice si biochimice, au loc in urma unor dinamici care implica formarea sau tranzitarea prin intermediul unor structuri paramagnetice (in general radicali liberi tranzienti) si care se pot detecta si analiza prin spectroscopie RES. De asemenea spectroscopia RES permite evaluarea capacitatii de reducere a radicalilor de catre diferite medicamente sau extracte naturale utilizate in scop terapeutic, folosind compusi radicalici inserati in mod controlat in sistemul studiat.

In aceasta etapa a desfasurarii actualului proiect s-a elaborat si testat metoda RES in evaluarea caracterului antioxidant al unor extracte de struguri precum si metodologia de aplicare a acestei metode in detectia radicalilor liberi tranzienti.

*Evaluarea efectului antioxidant al unor extracte din struguri.* Au fost selectate cateva extracte de samburi si pielite de la diferite soiuri de struguri si vitamina C, in vederea studierii caracterului antioxidant, folosind ca si radical nitroxidic Tempolul (2,2,6,6-tetrametil-4-hydroxipiperidin-oxil). O cantitate de 5 µl Tempol a fost dizolvata in 20 µl de extract. Concentratia solutiei de Tempol folosita a fost de  $5.8 \cdot 10^{-4}$  M/l. Potentialul redox standard al derivatilor nitroxidici ( $E_0 = 0.2$  eV) este destul de mare pentru a oxida compusi cum ar fi derivati ai radicalilor fenolici. Rata de oxidare este dependenta de structura chimica a radicalilor nitroxidici si a agentilor reductor, iar caracterul paramagnetic al radicalului nitroxidic este distrus, obtinandu-se o specie diamagnetica care nu da semnal RES. Scaderea in timp a semnalului RES este cauzata de interactiunea radicalilor nitroxidici cu produsii fenolici. Din aceasta scadere se pot obtine informatii cantitative despre caracteristicile antioxidante ale unor extracte naturale. Evaluarea cantitativa are la baza faptul ca intensitatea semnalului este proportionala cu cantitatea de specii paramagnetice existente in proba. Prin dubla integrare a semnalului probei la diferite momente se poate urmari evolutia reactiilor de oxidare a radicalilor in mediul respectiv si prin urmare caracterul antioxidant. Prin aceasta metoda au fost analizate caracteristicile antioxidante ale extractelor de samburi, pielite, rahis si strugure integral, din soiurile Burgund, Merlot si Cabernet Sauvignon din zonele Recas, si Dealul Mare. S-a observat o competitie intre doua specii antioxidante cu viteze de reactie diferite. Functia de fitare este o suma dintre doua exponentiale de tipul:  $y = y_0 + a_1 \cdot e^{(-k_1 \cdot t)} + a_2 \cdot e^{(-k_2 \cdot t)}$  unde parametrii  $a_1$  si  $a_2$  sunt constante de fitare, iar  $k_1$  si  $k_2$  sunt constante cinetice de reactie specifice tipului de extract (pielita, samburi, rahis sau strugure integral), a soiului de strugure si zonei de provenienta. Constanta  $k$  este specifica fiecarui tip de extract si tipului de procesare reprezinta viteza de oxido-reducere a radicalilor nitroxidici in timp. Evaluand valoarea acestei constante pentru fiecare tip de proba a fost caracterizata puterea antioxidanta a fiecarui tip de extract in parte. Concluzia care a fost evidentiata in urma acestei caracterizari, a fost aceea ca efect antioxidant pronuntat se gaseste in pielite si seminte de struguri din soiul Burgund, Merlot si Cabernet Sauvignon. Rezultatele acestei cercetarii sunt acceptate ca prezentari la conferinta internationala "Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems" sept. 3-6, 2006, Cluj Napoca [1. *Comparative study of antioxidant activity of some grape skin and seeds extracts*, autori : Anamaria Hosu, Claudia Cimpoiu, Vasile Miclaus, Grigore Damian, Dina Petrisor, 2. *EPR investigation of antioxidant characteristics of some irradiated natural extracts* , autori: Dina Petrisor, G.Damian, S.Simon, Gabriella Schmutzer, Anamaria Hosu, V.Miclaus]

*Detectia radicalilor tranzienti.* Una dintre cele mai studiate specii de radicali liberi este cea a radicalilor hidroxil. Radicalul hidroxil este extrem de reactiv, radical oxidativ care va reactiona cu majoritatea biomoleculelor la rate controlate de difuzie, ceea ce inseamna ca reactiile cu biomoleculele este foarte rapid. Pentru detectie prin spectroscopie RES, a fost folosit un reactiv diamagnetic numit *capcana de spin*, care conduce in urma reactiei cu radicalul liber tranzient, la formarea unui radical persistent, numit *spin adduct*. Procedeu se refera la o asa numita metoda de captare a spinului, si este folosit pentru monitorizarea reactiilor care implica radicali intermediari



reactivi la concentratii prea scazute pentru a fi observati direct. Capcane de spin tipice sunt compusii C- nitroso si nitronele, la care radicalii reactivi vor adera rapid, formand radicali nitril. A fost investigata formarea si reactia unor radicali liberi generati via reactia Fenton in prezenta cetearil alcoolului si a acidului lauric, folosind o capcana de spin nitronica obisnuita, N-t-Butil- $\alpha$ -phenilnitrona (PBN). In urma acestor experimente s-a tras concluzia ca reactia Fenton in sisteme complexe poate genera specii radicalice diferite. Capcana de spin PBN este capabila sa capteze cateva din aceste specii. Pe langa binecunoscutul radical ( $\text{OH}\bullet$ ), spectrele RES arata existenta unor radicali liberi centrati pe carbon, cum ar fi  $\text{CH}_3\bullet$ ,  $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3\bullet$ ,  $\text{COCH}_3\bullet$  conducand la aducti de spin inruditi. Aductii de spin obtinuti au caracteristici specifice exprimate prin timpi de viata diferiti. De asemenea, pe durata masuratorilor RES a fost observata o dependenta de timp a caracteristicilor spectrale si a intensitatilor semnalelor.

A patra activitate a constat in **elaborarea unui model experimental pe linii celulare stabilizate pentru studiul efectelor antioxidante ale catechinelor, stabilirea dozelor pentru studiul efectelor antioxidante si a modului de administrare si masurarea efectelor toxice**. Toate extractele hidroalcoolice (1:1) au fost supuse unor teste "in vitro" in scopul de a face o evaluare a proprietatilor lor antioxidante. In acest scop am folosit masurarea capacitatii de reducere a radicalului DPPH. S-a gasit o relatie inalt semnificativa intre continutul fenolic si proprietatile antioxidante. In cazul celor 3 extracte (BMR, MDM si MHR) valorile  $\text{EC}_{50}$ , adica concentratia echivalenta pentru neutralizarea a 50 % din speciile reactive de oxigen, au indicat proprietati antioxidante mai mari pentru extractul BMR ( $\text{EC}_{50}$  cel mai mic la 5 min. cât si la 60 min.).

Acelesi extracte au fost testate pentru evaluarea efectului lor citotoxic pe 2 linii celulare stabilizate: fibroblasti de plamân uman (Hfl) si carcinom epitelial de col uterin (HeLa). Cresterea sau reducerea populatiilor celulare si a potentialului lor regenerativ sunt parametri de analiza ai sensibilitatii celulelor la actiunea unui produs ce urmeaza a fi caracterizat. Testele de viabilitate sunt folosite pentru a masura celulele viabile ramase in urma tratamentului cu un agent potential toxic. Testul pe care noi l-am utilizat este un test de culoare in care o sare de tetrazoliu de culoare galbena este transformata de reductazele mitocondriale ale celulelor vii in formazan, solubil in solventi organici. Intensitatea culorii estimata la lungimea de unda de 492 nm este proportionala cu numarul celulelor viabile. Efectul a fost urmarit pentru 8-10 dilutii succesive intr-o zona larga de concentratii cuprinse intre 9-10g AG/l si 450-500mg AG/l ale extractului. Raspunsul biologic in procente celule (fata de martor) in functie de concentratie, permite calculul valorilor  $\text{IC}_{50}$  care se definesc ca o concentratie necesara pentru a reduce numarul celulelor la jumătate. Daca valorile absorbantei sunt convertite in procente de crestere celulara si acestea se figureaza in functie de concentratie rezulta o curba sigmoidala din care se calculeaza intervalul de confidenta 95%. Cele mai mari valori  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{LD}_{50}$ ) adica efect toxic minim s-a gasit pentru preparatul BMR atât la 24 h cât si la 48 h. Acest preparat arata cea mai mica crestere a toxicitatii la 48 h precum si un efect toxic diferentiat in sensul ca citotoxicitatea lui este mai mare pentru celulele tumorale. Informatiile vor fi folosite in alegerea dozelor ce vor fi administrate.

Acest preparat va fi folosit in continuare in testele "in vitro" si "in vivo" cuprinse in proiect.

A cincea activitate a constat in **elaborarea si realizarea unui model experimental "in vivo"- ascita Ehrlich la soarece - pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu catechine**. Tumora ascitica Ehrlich este o tumora experimentală transplantabilă, care se preteaza la studiul efectelor antioxidante si antitumorale ale unor compusi extrasi din plante. Aceasta tumora este bine caracterizata, are o crestere reproductibila si prezinta sensibilitate la actiunea medicamentelor.

Totodata materialul biologic prelevat de la animale este in cantitate suficienta pentru a permite investigarea modificarilor parametrilor care servesc la evidentierea capacitatii antioxidante si antitumorale a substantelor testate. In plus, la animalele purtatoare de tumori transplantabile, ca ascita Ehrlich, este posibila determinarea unor modificari care se produc ca urmare a administrarii unor substante supuse cercetarii.

Celulele tumorale Ehrlich utilizate de noi au provenit de la Laboratorul de Patologie Experimentală al Institutului Oncologic « I.Chiricuta » Cluj-Napoca, fiind obtinute de la un soarece Swiss purtator de carcinom ascitic Ehrlich. Tumora a fost mentinuta in biobaza Catedrei de Fiziologie a UMF « I.Hatieganu » Cluj-Napoca prin inoculari succesive la 10 zile interval.

Au fost administrate urmatoarele substante:

1. *Doxorubicina*, care este un medicament antitumoral din clasa antraciclinelor, fiind cea mai utilizata din aceasta categorie. Doxorubicina si-a dovedit eficacitatea intr-o varietate larga de carcinoame, in unele sarcoame, in leucemii acute si in limfoame. Doza de doxorubicina administrata la animalele de experienta a fost  $2 \times 0,1\text{mg/soarece}$ . Alegerea dozei de doxorubicina s-a bazat pe  $\text{DL}_{50}$  la soareci consemnata in literatura si pe datele unor studii anterioare pe

soareci cu ascita Ehrlich ale membrilor colectivului. S-a apreciat ca un tratament repetat cu doxorubicina este analog tratamentului in serii succesive aplicat in clinica.

2. *Extractul de seminte de struguri.* Avand in vedere rezultatele obtinute de partenerul Institutul Oncologic „I. Chiricuta” Cluj-Napoca (IO) in studiile „*in vitro*” privind activitatea antioxidanta si citotoxicitatea diferitelor extracte de struguri, am ales pentru experimentele „*in vivo*” extractul de seminte de struguri Burgund Mare de Recas (BMR). Continutul de polifenoli exprimat in acid galic (AG) al extractului original a fost de 11.477mg/L. *Doza de extract de seminte de struguri* cu continut de catechine administrata a fost stabilita pornind de la DL50 obtinuta in studiul de toxicitate acuta. Aceasta doza a fost de 3 x 0,79mg AG/soarece. Stabilirea DL50 are o mare importanta intrucât aceasta caracterizeaza toxicitatea substantei cu care se lucreaza. In experimentele noastre, pentru a determina DL50 al extractului de seminte de struguri cu continut catechinic au fost utilizati 48 soareci Swiss masculi impartiti in 8 loturi. Pentru administrare s-a ales calea intraperitoneala (i.p.) deoarece studiul efectului extractului la animalele cu ascita Ehrlich urmareste atât activitatea antioxidanta cât si activitatea antitumorală a substantei. In acest scop tratamentul se aplica intratumoral. Intrucât extractul de seminte de struguri are o solubilitate redusa in apa sau ser fiziologic, pentru administrarea i.p. s-a utilizat o suspensie in solutie de carboximetilceluloza 0,5%. Dozele calculate pe soarece au fost injectate in 0,5ml suspensie. Valoarea DL50 pentru administrare i.p. la soarecii masculi este de 42,13mg/kg cu un interval de confidenta 95% de la 27,5 la 64,57mg/kg.

3. *Vitamina C (acidul ascorbic)* este considerata cel mai important antioxidant solubil in apa, prezent in plasma sanghina si in celulele mamiferelor. Ea joaca un rol central in protectia fata de leziunile celulare produse ca urmare a actiunii radicalilor liberi. La ora actuala s-a demonstrat insa ca in anumite conditii aceasta poate avea si efecte prooxidante. Tinând cont de proprietatile antioxidante ale vitaminei C, am considerat ca in studiul intreprins de noi aceasta substanta poate servi ca termen de comparatie pentru extractul de seminte de struguri administrat in asociere cu doxorubicina. *Doza de vitamina C* a fost de 3 x 0,250mg/soarece si se incadreaza in domeniul de doze administrat la animale in vederea protectiei antioxidante.

**Model experimental:** studiile au fost efectuate pe un numar de 70 soareci Swiss masculi in greutate de 20±2g care au fost inoculati in ziua 0 a experimentului cu 1x10<sup>6</sup> celule tumorale Ehrlich. Animalele au fost impartite in 7 loturi: lot I, martor netratat; lot II tratat cu doxorubicina, lot III tratat cu vitamina C, lot IV tratat cu extract de seminte de struguri rosii, lot V tratat cu doxorubicina si vitamina C, lot VI tratat cu doxorubicina si extract de seminte de struguri rosii si lot VII tratat cu vehicul (carboximetilceluloza). Cresterea tumorii ascitice Ehrlich a fost apreciata prin evaluarea volumului tumoral absolut (volumul ascitei) si prin numararea celulelor carcinomatoase Ehrlich. Pentru evaluarea prezentei stresului oxidativ am urmarit produși de oxidare ai constituentilor lipidici. Din analiza rezultatelor obtinute se constata ca doza de doxorubicina administrata are efecte antitumorale evidentiate prin scaderea numarului total de celule tumorale. Tratamentul cu doxorubicina produce stres oxidativ evidentiat prin cresterea nivelului de peroxizi lipidici in plasma soarecilor purtatori de carcinom ascitic Ehrlich. O alta constatare a fost aceea ca vitamina C in doza aleasa de noi nu influenteaza dezvoltarea tumorii la animale, insa asocierea vitaminei C la doxorubicina duce la scaderea semnificativa a nivelului plasmatic al peroxizilor lipidici. Nu in ultimul rând, am stabilit ca extractul de seminte de struguri in doza administrata nu influenteaza dezvoltarea ascitei Ehrlich la soareci, dar un tratament asociat doxorubicina - extract de seminte de struguri reduce semnificativ peroxidarea lipidica.

In concluzie, a fost stabilita DL 50 a extractului de seminte de struguri rosii Burgund Mare de Recas la soarecii Swiss in administrare intraperitoneala, ca si doza de doxorubicina care produce stres oxidativ si doza de vitamina C cu efect antioxidant. De asemenea, a fost realizat modelul experimental propus.

A sasea activitate a constat in elaborarea **si realizarea unor metode de obtinere de solutii bogate in tocotrienoli si cisteina**. Cei patru izomeri ai tocotrienolului ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) au fost determinati prin metoda HPLC cu detectie fluorimetrica. (Ex=295 nm., Em=330 nm.) in uleiul de palmier. Produsul brut a fost supus extractiei in faza lichida cu sistemele hexan si eter de petrol/dietil eter. Proba (10  $\mu$ l) a fost injectata pe o coloana faza normala Knauer Lichospher-100 Diol (i.d=4mm, l=250mm; marimea particulelor 5 $\mu$ ). Sistemul de elutie a fost 6% tertbutilmetileter in izooctan. Atribuirea timpilor de retentie a celor 4 tocotrienoli liberi au fost stabilita fata de un standard extern. Continutul in izomeri exprimat la 100 g material a fost:  $\alpha$ -tocotrienol 23 mg;  $\beta$ -tocotrienol 25 mg;  $\gamma$ -tocotrienol 52 mg;  $\delta$ -tocotrienol 8,1 mg; fiind calculat fata de standardul extern calibrat de tocotrienoli.

Solutii bogate in cisteina au fost obtinute din laptele integral de vaca; analiza produsului (continutul in aminoacizi) a fost realizata prin HPLC.

## Concluzii etapa II:

- S-au obtinut si caracterizate, inclusiv HPLC, extracte cu catechine provenite din parti diferite ale mai multor soiuri de struguri rosii. Pentru experimentare a fost ales extractul de seminte de struguri rosii din soiul Burgund Mare de Recas, care a prezentat un continut ridicat de polifenoli, ca si o intensa activitate antioxidanta, apreciata prin masuratori biochimice si RES.
- S-a elaborat un model experimental privind dozele cu efect antioxidant si efectele toxice ale extractului au fost determinate pe linii celulare stabilizate DL 50 si efectele antioxidante, si antitumorale au fost urmarite pe tumora Ehrlich la soareci.
- Au fost realizate metode de obtinere a solutiilor de tocotrienoli si cisteina.

## Rezultate etapa II

- Rezultatul studiului privind masuratori RES a fost prezentat la "7th International Balkan Workshop on Applied Physics", July 5-7th, 2006, Constanta, Romania. Free Radicals Detection by ESR PBN Spin-Trap Technique, autori: Grigore Damian, Dina Petrisor and Vasile Miclaus]

## Etapa III - Experimentare modele in vivo, in vitro, RES - solutii cu catechine Elaborare/realizare model in vivo, in vitro, RES evaluare efect antioxidant solutii cu tocotrienoli.

**Perioada de desfasurare**  
**iulie 2006 - dec.2006**

### Obiective etapa

Etapa III a fost destinata experimentarii modelelor *in vivo -ascita Erlich la soareci-* pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu catechine, model *in vitro* pe culturi celulare si a metodei RES pe modele de studiu *in vivo/in vitro* al solutiilor cu catechine.

Pentru realizarea etapei de executie Planul de realizare, conform contract, a prevazut urmatoarele obiective

*Activitate III.1 Experimentare modele in vivo -ascita Erlich la soareci-* pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu catechine. *Experimentare model in vitro, pe culturi celulare, pentru evaluarea efectului antioxidant al solutiilor cu catechine. Experimentare metoda RES pe modele de studiu in vivo/in vitro al solutiilor cu catechine.*

*Activitate III.2 Elaborare si realizare model experimental in vivo pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu tocotrienoli. Elaborare si realizare model experimental in vitro pe linii celulare pentru evaluarea efectului antioxidant al solutiilor cu tocotrienoli.*

*Elaborare si realizare metoda RES pe modele de studiu in vivo/in vitro a solutiilor cu tocotrienoli.*

### Rezumat etapa

Investigatiile au inclus determinarea modificarilor induse prin alterarea echilibrului redox celular in inducerea stresului oxidativ si apoi o reabilitare a acestor dezechilibre prin tratament cu diferite concentratii de extract hidroalcoolic BMR.

S-au facut masuratori secventiale, care au permis estimarea efectelor protectoare : antioxidant, inhibitor al cresterii si antiinvaziv ale extractului. Masuratorile s-au efectuat la nivel celular (supravietuire/inhibitie, citotoxicitate si clonogenitate) si molecular (fragmentari ADN, peroxizi lipidici, metaloproteaze matriceale). Acesti parametri au fost evaluati in momentul de stres oxidativ si apoi in urma tratamentelor cu extract de produs vegetal.

Pe scurt, rezultatele de etapa pot fi sumarizate astfel :

- pentru a facilita alegerea dozelor de produs vegetal s-a incercat diferentierea efectelor de inhibitie a cresterii celulare cu cele ce determina moartea celulara, prin aplicarea a doua teste distincte.

- in experimentele de inducere a statusului prooxidativ cu doxorubicina tratamentul cu extract BMR, la concentratii ce nu afecteaza viabilitatea celulara, induce un efect protector in fibroblastii normali (Hfl 1), in timp ce in celulele tumorale (HeLa, M1/15) sporeste efectul toxic, inhibitor al cresterii

- la administrare de peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) am studiat supravietuirea celulara la doua temperaturi : 0°C si 37°C. Rezultatele noastre arata ca diferentele in valorile  $IC_{50}$  sunt doar invers proportionale cu activitatea catalazei (enzima cheie in neutralizarea radicalilor  $\bullet OH$ .) la cele

doua temperaturi de referinta. Doza medie letala  $D_0$  este apropiata valorilor gasite prin testul viabilitatii celulare (MTT) fapt care demonstreaza aportul decisiv a a leziunilor ADN dublu-catenare in inducerea mortii celulare. Adaosul de BMR aduce beneficii mai reduse dar tendinta se pastreaza in sensul cresterii in viabilitate pentru celulele normale in timp ce pentru celulele tumorale o usoara suplimentare in inhibitia cresterii

1.genotoxicitatea determinata prin testul cometei a indicat ca la iradiere exista un efect radioprotector in cazul tratamentului cu BMR, la celulele tratate cu doxorubicina scorul de lezare mai mic poate fi interpretat printr-un proces de stimulare a repararii

2.modificarea oxidativa a lipidelor (peroxizi lipidici) . Stresul oxidativ indus prin administrarea de doxo in celulele normale s-a tradus printr-o crestere (1,8 ori) a produsilor peroxidarii lipidice. In urma asocierii cu extract BMR nivelul peroxizilor descreste proportional cu cresterea concentratiilor produsului coborand chiar sub nivelul initial (bazal). Pentru celulele tumorale concentratia peroxizilor revine la nivelul bazal dar fara a evidentia relatia doza-efect

3.in ceea ce priveste activitatea metaloproteazelor matriceale am constatat activitatea inhibitorie a extractului BMR, la nivelul MMP-2, atat in celulele normale de fibroblaste si coculturi cat si cu activator sau doxorubicina.

Studiul comparativ al inducerii si combaterii stresului oxidativ pe mai multe linii celulare (normale, transformate malign si cu inalta capacitate de metastazare), continuate pot aduce lamuriri suplimentare privind probabilitatea de modulare a alterarilor celulare prin acest tip de produs.

O alta activitate a acestei etape a constatat in **experimentarea in vivo, a efectului antioxidant/antitumoral, al extractului de struguri rosii cu continut bogat in catechine**. Modelul a fost reprezentat de carcinomul ascitic Ehrlich la soareci Swiss. Toxicitatea extractului de seminte de struguri a fost caracterizata prin stabilirea DL 50, a carei valoare pentru administrare i.p. la soarecii Swiss masculi am stabili a fi de 42,13mg/kg.

Pentru evaluarea efectelor antioxidante/antitumorale ale extractului de struguri rosii BMR animalelor li s-au administrat urmatoarele substante: -Doxorubicina , in doza de 2 x 0,1mg/soarece; -Extractul de seminte de struguri: cu un continut de polifenoli exprimat in acid galic (AG) de 11.477mg/L, in doza de 3 x 0,79mg AG/soarece; -Vitamina C (acidul ascorbic): a servit ca termen de comparatie pentru extractul de seminte de struguri administrat in asociere cu doxorubicina. Doza administrata a fost de 3 x 0,250mg/soarece. S-a lucrat pe 7 loturi a cate 10 animale, dupa cum urmeaza: lot I, martor netratat; lot II tratat cu doxorubicina, lot III tratat cu vitamina C, lot IV tratat cu extract de seminte de struguri rosii, lot V tratat cu doxorubicina si vitamina C, lot VI tratat cu doxorubicina si extract de seminte de struguri rosii si lot VII tratat cu vehicul (carboximetilceluloza). Au fost urmariti urmatorii parametri: *starea biologica a animalelor, cresterea tumorii ascitice Ehrlich si stresul oxidativ*. S-a evaluat, de asemenea, timpul mediu de supravietuire.

O a treia activitate prevazuta a se desfasura in aceasta etapa a fost **experimentarea metodei RES pe modelele in vitro/in vivo a efectelor antioxidante a extractului de samburi de struguri cu continut bogat de catechine, ca si elaborarea si realizarea unei metode RES pe sisteme biologice pentru studiul efectului antioxidant al solutiilor cu tocotrienoli**. Spectroscopia de Rezonanta Electronica de Spin (RES) permite detectia si analiza speciilor paramagnetice din diferite sisteme, in particular sistemele biologice. Metoda de studiu utilizatata a fost aceea a "*radicalilor nitroxidici*", numiti si "*markeri de spin*" ("spin label"). Existenta centrului paramagnetic din radicalii nitroxidici si sensibilitatea acestuia la interactiunile cu mediul in care sunt inserati, ii face usor detectabili prin spectroscopie RES. In studiul nostru a fost folosit Tempolul (2,2,6,6-tetrametil-4-hydroxipiperidin-oxil). Pentru experiment, au fost constituite 3 loturi de soareci: A.)soareci carora nu li s-a administrat nici un fel de antioxidant ; B.)soareci carora li s-a administrat extract de seminte de struguri 0,79 mg/soarece in carboximetilceluloza 0,5 ml i.p.; C.) soareci carora li s-a administrat vitamina C 75 mg/kg corp,i.p. Analiza RES s-a realizat pe probe de sange recoltate la 15 minute si la 1 ora de la administrare de antioxidant si vitamina C. Intrucat s-a demonstrat ca metoda cu radicali nitroxidici este adecvata pentru studiul in vivo a cineticii radicalilor liberi si a efectului antioxidant al unor compusi, aceasta va fi utilizata si in etapa urmatoare pentru studiul efectelor uleiului de palmier bogat in tocotrienoli.

S-a realizat un model microparticulat pentru marirea biodisponibilitatii produsului natural (uleiul de palmier) bogat in tocotrienoli. Scopul acestei activitati a fost obtinerea unei dispersii de lipozomi cu ulei de palmier, destinata testarii pe culturi de celule si administrarii intraperitoneale la soareci. Am optat pentru lipozom, preparati prin metoda hidratarii filmului lipidic, la 40°C. S-au obtinut lipozomi multilamelari, care au fost transformati in lipozomi unilamelari mici prin ultrasonicare.

O alta activitate a etapei raportate a fost aceea de **elaborare a unui model experimental pe culturi celulare pentru studiul in vitro a efectului antioxidant al**

**solutiilor bogate in tocotrienoli.** Extractul nefiind solubil in apa este necesara conditionarea acestuia intr-o forma care sa permita administrarea in culturile celulare. Pentru acestea am propus modelul experimental de incorporare a produsului in lipozomi care s-a testat pe cele trei tipuri de celule in intervalul de concentratie 10mg-0,5mg/ml. In acest domeniu nu s-a inregistrat toxicitate (supravietuirea celulara  $\geq 94\%$ ) in nici una din liniile testate. Prin urmare, administrarea sub forma de dispersie de lipozomi permite folosirea uleiului la concentratii de  $\leq 10$  mg/produs.

De asemenea, in aceasta etapa s-a **realizat un model experimental de studiu in vivo a efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor bogate in tocotrienoli.** Am utilizat ca model experimental soareci Swiss inoculati cu  $1 \times 10^6$  celule de carcinom ascitic Ehrlich. Au fost stabilite dozele si modul de administrare pentru urmatoarele substante: - Doxorubicina, in doza de  $2 \times 0,1$ mg/soarece, i.p. in 0,5 ml ser fiziologic;- Ulei de palmier. In doza de  $3 \times 50$ mg/kg corp. Uleiul de palmier a fost inglobat in lipozomi (s-au preparat doze a cate 0,5 ml dispersie, cu un continut de 50 mg ulei de palmier/kg corp). -Vitamina E. A fost aleasa ca substanta de referinta pentru aprecierea efectelor antioxidante ale uleiului de palmier. Preparatul utilizat de noi a fost Vitamina E (acetat de  $\alpha$ -tocoferil) (Biofarm), in doza de 50 mg/kg corp, in ulei de floarea soarelui, i.m. Au fost stabilite 6 loturi test, a cate 10 animale, dupa cum urmeaza:-Lotul I martor grefat cu ascita Ehrlich; -Lotul II grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina ; -Lotul III grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu vitamina E; -Lotul IV grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu ulei de palmier cu continut de tocotrienoli. Uleiul de palmier a fost introdus in liposomi; -Lotul V grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina si vitamina E; -Lotul VI grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina si ulei de palmier cu continut de tocotrienoli. In ziua +11 dela grefa a fost recoltat sange, s-a separat plasma, in care s-au dozat gruparile sulfhidril totale si peroxizii lipidici.

### **Concluzii etapa III :**

- S-auevaluat, pe modele experimentale in vitro –culturi de celule- si in vivo- carcinomul ascitic Ehrlich la soarece- efectele antioxidante/antitumorale ale extractului de seminte de struguri rosii din soiul Burgund Mare de Recas, prin metode complexe;
- S-a stabilit DL50 pentru extractul de seminte de struguri BMR la soareci Swiss masculi;
- *In studiile in vitro* s-au facut masuratori la nivel celular (supravietuire/inhibitie, citotoxicitate si clonogenitate) si molecular (fragmentari ADN, peroxizi lipidici, metaloproteaze matriceale, MMP);
- *In studiile in vivo* s-a determinat doza letala 50 ca masura a toxicitatii produsului; a fost urmarit timpul mediu de supravietuire. S-au urmarit indicatori ai starii biologice ai animalelor, indicatori ai cresterii tumorale, markeri de stres oxidativ si parametri ai apararii antioxidante;
- S-a utilizat o metoda extrem de valoroasa si inovatoare, RES, pentru evaluarea efectului antioxidant al extractului de seminte de struguri rosii;
- S-au realizate modele experimentale pentru studiul atat in vitro, cat si in vivo, al efectelor uleiului de palmier bogat in tocotrienoli. A fost realizat un model microparticulat (lipozomi) pentru marirea biodisponibilitatii solutiei de tocotrienoli in modelele experimentale realizate.

### **Rezultatele etapei III :**

- S-a stabilit DL50 pentru extractul de seminte de struguri BMR la soareci Swiss masculi ;
- S-a stabilit timpul mediu de supravietuire; acesta nu este influentat de administrarea de extract de struguri rosii ;
- A fost experimentat modelul de studiu in vivo al efectului antioxidant/antitumoral al extractului de seminte de struguri BMR. Am constatat ca : - extractul de seminte de struguri BMR nu influenteaza cresterea tumorala; - extractul bogat in catechine reduce stresul oxidativ la soarecii cu carcinom ascitic Ehrlich; - asocierea extractului de seminte de struguri la tratamentul cu doxorubicina reduce intensitatea stresului oxidativ generat de aceasta antraciclina.

### **Publicatii:**

- Muresan Adriana, Soimita Suci, Simona Clichici, Doina Daicoviciu, Nicoleta Decea, Nastasia Pop, I.D.Postescu: **Study on the effects of grape seed extract in Ehrlich ascitic carcinoma.** Bulletin USAMV-CN, 63/2006,332-335. (revista categorie B+).

**Etapa IV Experimentare modele in vivo, in vitro, RES - solutii cu tocotrienoli.  
Elaborare/realizare model invivo, in vitro, RES evaluare efect antioxidant  
solutii cu cisteina.**

**Perioada de desfasurare  
dec. 2006 - oct .2007**

**Obiective etapa**

Etapa IV a fost destinata experimentarii modelelor *in vivo -ascita Erlich la soareci-* pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu catechine, model *in vitro* pe culturi celulare si a metodei RES pe modele de studiu *in vivo/in vitro* al solutiilor cu catechine.

Pentru realizarea etapei de executie Planul de realizare, conform contract, a prevazut urmatoarele obiective

*Activitatea IV.1 Experimentare modele in vivo -ascita Erlich la soareci- pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu tocotrienoli. Experimentare model in vitro, pe culturi celulare, pentru evaluarea efectului antioxidant al solutiilor cu tocotrienoli. Experimentare metoda RES pe modele de studiu in vivo/in vitro al solutiilor cu tocotrienoli..*

*Activitatea IV.2 Elaborare si realizare model experimental in vivo pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu cisteina. Elaborare si realizare model experimental in vitro pe linii celulare pentru evaluarea efectului antioxidant al solutiilor cu cisteina. Elaborare si realizare metoda RES de studiu in vivo/in vitro a solutiilor cu cisteina.*

**Rezumat etapa**

In etapa anterioara au fost obtinute si caracterizate, inclusiv HPLC, extracte cu catechine provenite din parti diferite ale mai multor soiuri de struguri rosii. Pentru experimentare a fost ales extractul de seminte de struguri rosii din soiul Burgund Mare de Recas, care a prezentat un continut ridicat de polifenoli, ca si o intensa activitate antioxidanta, apreciata prin masuratori biochimice si RES. Dozele cu efect antioxidant si efectele toxice ale extractului au fost determinate pe linii celulare stabilizate. S-a stabilit modelul experimental in vivo (tumora Ehrlich la soareci) pentru determinarea DL 50 si urmarirea efectelor antioxidante si antitumorale ale extractului de seminte de struguri rosii. Au fost realizate metode de obtinere a solutiilor de tocotrienoli si cisteina.

In aceasta etapa, **o prima activitate** a avut drept obiectiv **experimentarea, pe model de studiu in vitro, a efectului antioxidant al extractului de seminte de struguri rosii cu continut bogat de catechine**. Planul tematic a cuprins un studiu complex, "in vitro", pe sisteme de linii celulare stabilizate, privind diverse aspecte ale inducerii stresului oxidativ prin iradiere, administrare de doxorubicina si peroxid de hidrogen. Atat agentul fizic cat si cei doi produse administrati sunt producatori de specii reactive de oxigen (SRO), in speta radicali •OH.

Liniile celulare au fost alese in conformitate cu scopul propus. Astfel, am folosit linii celulare (fibroblaste plaman uman, Hfl 1), o linie transformata tumoral (carcinom epitelial de col uterin, HeLa), melanom uman cu capacitate mare de metastazare (M1/15) si o linie indicata pentru experimente de radiobiologie (celule de carcinom chinezesc, CHO).

Investigatiile au inclus determinarea modificarilor induse prin alterarea echilibrului redox celular in inducerea stresului oxidativ si apoi o reabilitare a acestor dezechilibre prin tratament cu diferite concentratii de extract hidroalcoolic BMR.

S-au facut masuratori la nivel celular (supravietietuire/inhibitie, citotoxicitate si clonogenitate) si molecular (fragmentari ADN, peroxizi lipidici, metaloproteaze matriceale). Acesti parametri au fost evaluati in momentul de stres oxidativ si apoi in urma tratamentelor cu extract de produs vegetal. Astfel de determinari secventiale au permis estimarea efectelor protectoare : antioxidant, inhibitor al cresterii si antiinvaziv ale extractului.

**O a doua activitate** a acestei etape a avut drept obiectiv **experimentarea, pe model de studiu in vivo, a efectului antioxidant/antitumoral, al extractului de seminte de struguri rosii cu continut bogat in catechine**. Aceasta activitate a presupus un studiu complex, realizat pe modelul experimental in vivo stabilit in etapa anterioara, si anume soareci Swiss inoculati cu carcinom ascitic Ehrlich. Intr-un prim timp, a fost stabilita DL 50, de mare importanta, intrucat aceasta caracterizeaza toxicitatea substantei cu care se lucreaza . In experimentele noastre, pentru a determina DL50 al extractului de seminte de struguri cu continut catechic au fost utilizati 48 soareci Swiss masculi impartiti in 8 loturi. Pentru administrare s-a ales calea

intraperitoneala (i.p.) deoarece studiul efectului extractului la animalele cu ascita Ehrlich urmareste atat activitatea antioxidanta cat si activitatea antitumorală a substantei. In acest scop tratamentul se aplica intratumoral. Valoarea DL50 pentru administrare i.p. la soarecii masculi este de 42,13mg/kg cu un interval de confidenta 95% de la 27,5 la 64,57mg/kg.

Pentru evaluarea efectelor antioxidante/antitumorale ale extractului de struguri rosii BMR animalelor li s-au administrat urmatoarele substante: -Doxorubicina, medicament antitumoral din clasa antraciclinelor, eficace intr-o varietate larga de tumori, in doza de 2 x 0,1mg/soarece; - Extractul de seminte de struguri. Avand in vedere rezultatele obtinute naterior in studiile *in vitro*, ca si *in vivo*, am ales extractul de seminte de struguri Burgund Mare de Recas (BMR) cu un continut de polifenoli exprimat in acid galic (AG) de 11.477mg/L. Doza de extract de seminte de struguri cu continut de catechine administrata a fost stabilita pornind de la DL50 obtinuta in studiul de toxicitate acuta. Aceasta doza a fost de 3 x 0,79mg AG/soarece; -Vitamina C (acidul ascorbic): a servit ca termen de comparatie pentru extractul de seminte de struguri administrat in asociere cu doxorubicina. Doza administrata a fost de 3 x 0,250mg/soarece. S-a lucrat pe 7 loturi a cate 10 animale, dupa cum urmeaza: lot I, martor netratat; lot II tratat cu doxorubicina, lot III tratat cu vitamina C, lot IV tratat cu extract de seminte de struguri rosii, lot V tratat cu doxorubicina si vitamina C, lot VI tratat cu doxorubicina si extract de seminte de struguri rosii si lot VII tratat cu vehicul (carboximetilceluloza). Au fost urmariti urmatorii parametri: *starea biologica a animalelor* (evolutia greutatii, dozarea hemoglobinei, numararea elementelor figurate), *cresterea tumorii ascitice Ehrlich* (prin evaluarea volumului tumoral absolut (volumul ascitei) si prin numararea celulelor carcinomatoase Ehrlich), *stresul oxidativ* prin determinari de produsii de peroxidare (peroxizi lipidici, malonaldehida libera, proteine carbonilate) si parametri ai apararii antioxidante (capacitatea de donator de hidrogen, continutul de grupuri sulfhidril totale, activitatea superoxidismutazei) in plasma, omogenate tisulare, lizat eritrocitar. S-a evaluat, de asemenea, timpul mediu de supravietuire. In acest scop s-au pus in lucru loturi a cate 15 soareci Swiss inoculati cu celule de carcinom ascitic Ehrlich si tratate conform schemei prezentate mai sus. Animalele au fost urmarite timp de 45 zile, notandu-se mortalitatea. S-a calculat timpul mediu de supravietuire a animalelor cu ajutorul unor formule matematice.

O a **treia activitate** prevazuta a se desfasura in aceasta etapa a fost **experimentarea metodei RES pe modelele in vitro/in vivo a efectelor antioxidante a extractului de samburi de struguri cu continut bogat de catechine, ca si elaborarea si realizarea unei metode RES pe sisteme biologice pentru studiul efectului antioxidant al solutiilor cu tocotrienoli**. Intrucat caracterul antioxidant al extractului de seminte de struguri rosii a fost caracterizat in etapa anterioara, in acuala etapa a contractului s-a avut in vedere testarea *in vivo* a caracterului antioxidant al acestui extract. Spectroscopia de Rezonanta Electronica de Spin (RES) permite detectia si analiza speciilor paramagnetice din diferite sisteme, in particular sistemele biologice. Metoda de studiu utilizatata a fost aceea a "*radicalilor nitroxidici*", numiti si "*markeri de spin*" ("spin label"). Caracteristica principala a radicalilor nitroxidici este data de existenta unui centru paramagnetic stabil format dintr-un electron neimperecheat localizat pe legatura dintre un atom de azot si oxigen. Existenta centrului paramagnetic si sensibilitatea acestuia la interactiunile cu mediul in care sunt inserati, ii face usor detectabili prin spectroscopie RES. Aceasta tehnica de investigare, utilizeaza proprietatile de interactiune din sistemele cuplate si este o metoda importanta de caracterizare nedistructiva a proprietatilor dinamice si structurale la nivel molecular. In studiul nostru a fost folosit Tempolul (2,2,6,6-tetrametil-4-hydroxipiperidin-oxil) ca radical nitroxidic. Pentru experiment, au fost constituite 3 loturi de soareci si anume: soareci carora nu li s-a administrat nici un fel de antioxidant (lotul A); soareci carora li s-a administrat extract de seminte de struguri 0,79 mg/soarece in carboximetilceluloza 0,5 ml i.p. (lotul B); soareci carora li s-a administrat vitamina C (lotul C) in doza de 75 mg/kg corp,i.p. Analiza RES a probelor de sange recoltate la 15 minute si la 1 ora de la administrare de antioxidant si vitamina C, prin integrarea dubla a semnalului, arata o cinetica de reoxidare diferita pentru loturile analizate. Am constatat ca prezenta vitaminei C si a extractelor de seminte de struguri rosii BMR conduce la o reducere semnificativa a speciilor reactive din sange, lucru observat in special dupa 1 ora de la administrarea radicalului nitroxidic. Asadar, ca urmare a acestor experiente *in vivo*, privind efectul antioxidant al extraselor din seminte de struguri, se dovedeste ca spectroscopia RES este capabila de a evalua cinetica proceselor de reducere si reoxidare a radicalilor nitroxidici in prezenta speciilor reactive ale oxigenului. Intrucat s-a demonstrat ca metoda cu radicali nitroxidici este adecvata pentru studiul in vivo a cineticii radicalilor liberi si a efectului antioxidant al unor compusi, aceasta va fi utilizata si in etapa urmatoare pentru studiul efectelor uleiului de palmier bogat in tocotrienoli.

O **alta activitate a etapei** raportate a fost aceea de **elaborare a unui model experimental pe culturi celulare pentru studiul in vitro a efectului antioxidant al**

***solutiilor bogate in tocotrienoli.*** Aceasta activitate a urmarit stabilirea formelor de administrare a extractului din ulei de palmier care contine cei patru izomeri ai tocotrienolului. Extractul nefiind solubil in apa este necesara conditionarea acestuia intr-o forma care sa permita administrarea in culturile celulare. Pentru acestea am propus modelul experimental de incorporare a produsului in lipozomi care s-a testat pe cele trei tipuri de celule in intervalul de concentratie 10mg-0,5mg/ml. In acest domeniu nu s-a inregistrat toxicitate (supravietuirea celulara  $\geq 94\%$ ) in nici una din liniile testate.

Cand s-a folosit polietilenglicolul (PEG 400) in acelasi interval de concentratie a aparut un efect toxic progresiv cu cresterea dozelor de ulei.

Prin urmare, administrarea sub forma de dispersie de lipozomi permite folosirea uleiului la concentratii de  $\leq 10$  mg/produs.

De asemenea, in aceasta etapa s-a realizat un model experimental de studiu in vivo a efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor bogate in tocotrienoli. Am utilizat ca model experimental soareci Swiss inoculati cu  $1 \times 10^6$  celule de carcinom ascitic Ehrlich. Au fost stabilite dozele si modul de administrare pentru urmatoarele substante: - Doxorubicina, in doza de 2 x 0,1mg/soarece, i.p. in 0,5 ml ser fiziologic in zilele +1 si +4 de la grefa; - Ulei de palmier. Doza administrata animalelor in studiul intreprins de noi a fost de 3 x 50mg/kg corp, injectata i.p in zilele 0, +1 si +4 de la grefa. Uleiul de palmier a fost inglobat in lipozomi (v.mai jos). Continutul de tocotrienoli al uleiului de palmier a fost determinat in etapa anterioara; -Vitamina E. A fost aleasa ca substanta de referinta pentru aprecierea efectelor antioxidante ale uleiului de palmier. Preparatul utilizat de noi a fost Vitamina E (acetat de  $\alpha$ -tocoferil) (Biofarm), in doza de 50 mg/kg corp, in ulei de floarea soarelui, administrat i.m. Au fost stabilite, de asemenea, 6 loturi test, a cate 10 animale, dupa cum urmeaza: -Lotul I martor grefat cu ascita Ehrlich; -Lotul II grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina; -Lotul III grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu vitamina E; -Lotul IV grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu ulei de palmier cu continut de tocotrienoli. Uleiul de palmier a fost introdus in lipozomi; s-au preparat doze a cate 0,5 ml dispersie, cu un continut de 50 mg ulei de palmier/kg corp. Doza totala administrata a fost de 3,75 mg ulei de palmier/soarece, impartita in 3 doze; -Lotul V grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina si vitamina E; -Lotul VI grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina si ulei de palmier cu continut de tocotrienoli. Animalele au fost urmarite timp de zece zile dupa grefa de ascita Ehrlich. In ziua +11 a fost recoltat sange, pe anticoagulant (EDTA), din sinusul retroorbital al soarecilor. A fost separata plasma, in care s-au dozat gruparile sulfhidril totale si peroxizii lipidici.

S-a realizat, de asemenea, un model microparticulat pentru marirea biodisponibilitatii produsului natural (uleiul de palmier) bogat in tocotrienoli. Scopul acestei activitati a fost obtinerea unei dispersii de lipozomi cu ulei de palmier, destinata testarii pe culturi de celule si administrarii intraperitoneale la soareci. Am optat pentru lipozomi intrucat sunt biocompatibili si se prepara usor. Ne-am propus sa preparam lipozomi prin metoda hidratarii filmului lipidic. S-a ales ca temperatura de realizare a hidratarii filmului lipidic valoarea de 40°C. S-au obtinut lipozomi multilamelari, care au fost transformati in lipozomi unilamelari mici prin ultrasonicare. Continutul in ulei de palmier / ml dispersie preparata pentru studiile in vivo a fost de 100 mg.

#### **Concluzii etapa IV:**

- Au fost evaluate, pe modele experimentale in vitro –culturi de celule- si in vivo- carcinomul ascitic Ehrlich la soarece- efectele antioxidante/antitumorale ale extractului de seminte de struguri rosii din soiul Burgund Mare de Recas. Aceste efecte au fost evaluate prin metode complexe. Astfel, in studiile in vitro s-au facut masuratori la nivel celular (supravietuire/inhibitie, citotoxicitate si clonogenitate) si molecular (fragmentari ADN, peroxizi lipidici, metaloproteaze matriceale, MMP).
- In studiile in vivo s-a determinat doza letala 50 ca masura a toxicitatii produsului; a fost urmarit timpul mediu de supravietuire. S-au urmarit indicatori ai starii biologice ai animalelor, indicatori ai cresterii tumorale, markeri de stres oxidativ si parametri ai apararii antioxidante. O metoda extrem de valoroasa si inovatoare a fost utilizarea RES pentru evaluarea efectului antioxidant al extractului de seminte de struguri rosii.
- Au fost realizate modele experimentale pentru studiul atat in vitro, cat si in vivo, al efectelor uleiului de palmier bogat in tocotrienoli. A fost realizat un model microparticulat (lipozomi) pentru marirea biodisponibilitatii solutiei de tocotrienoli in modelele experimentale realizate.

#### **Rezultate etapa IV:**



- S-a incercat diferentierea efectelor de inhibitie a cresterii celulare cu cele ce determina moartea celulara, prin aplicarea a doua teste distincte. Acest fapt faciliteaza alegerea dozelor pentru produsul vegetal in functie de scopul urmarit;
- In experimentele de inducere a statusului prooxidativ cu doxorubicina tratamentul cu extract BMR, la concentratii ce nu afecteaza viabilitatea celulara, induc un efect protector in fibroblastii normali (Hfl 1), in timp ce in celulele tumorale (HeLa, M1/15) sporesc efectul toxic, inhibitor al cresterii;
- La administrare de peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) s-a studiat supravietuirea celulara la douatemperaturi :  $0^\circ C$  si  $37^\circ C$  (date fiind rezultatele din literatura care semnaleaza diferente mari in toxicitatea acestui produs la cele doua temperaturi), la doi timpi de expunere la actiunea oxidantului. Rezultatele obtinute arata ca aceste diferente in valorile  $IC_{50}$  sunt doar invers proportionale cu activitatea catalazei (enzima cheie in neutralizarea radicalilor  $\bullet OH$ .) la cele doua temperaturi de referinta. Doza medie letala  $D_0$ , exprima o genotoxicitate calculata la iradiere (3,36 Gy) si respectiv  $28\mu M$  la incubare cu  $H_2O_2$  (calculata prin testul de clonogenitate ) este apropiata valorilor gasite prin testul viabilitatii celulare (MTT) fapt care demonstreaza aportul decisiv a a leziunilor ADN dublu-catenare) in inducerea mortii celulare. Adaosul de BMR aduce beneficii mai reduse dar tendinta se pastreaza in sensul cresterii in viabilitate pentru celulele normale in timp ce pentru celulele tumorale o usoara suplimentare in inhibitia cresterii;
- S-a incercat diferentierea efectelor de inhibitie a cresterii celulare cu cele ce determina moartea celulara, prin aplicarea a doua teste distincte. Acest fapt faciliteaza alegerea dozelor pentru produsul vegetal in functie de scopul urmarit;
- Genotoxicitatea determinata prin testul cometei a indicat ca la iradiere exista un efectradioprotector in cazul tratamentului cu BMR, la celulele tratate cu doxorubicina scorul de lezare mai mic poate fi interpretat printr-un proces de stimulare a repararii;
- Modificarea oxidativa a lipidelor (peroxizi lipidici). Stresul oxidativ indus prin administrarea de doxo in celulele normale s-a tradus printr-o crestere (1,8 ori) a produsilor peroxidarii lipidice. In urma asocierii cu extract BMR nivelul peroxizilor descreste proportional cu cresterea concentratiilor produsului coborand chiar sub nivelul initial (bazal). Pentru celulele tumorale concentratia peroxizilor revine la nivelul bazal dar fara a evidentia relatia doza-efect;
- Pentru studiul modificarilor metaloproteazelor matriceale s-a realizat in model in vitro de cultura in contact direct (cocultura) format din celule normale (fibroblasti) si celule maligne cu capacitate ridicata de metastazare (M1/15), ce conduce la o supraexprimare a celor doua metaloproteaze, in special MMP-2. Astfel nivelul MMP-2 a crescut atat in cocultura cat si prin adausul unui activator organometalic al proteazelor, dar a fost redus prin administrare de BMR. De asemenea, la inducerea stresului prin doxorubicina, nivelul MMP-2 crescut atat in fibroblaste cat si in cocultura a fost semnificativ diminuat prin administrare de BMR. Experimentul confirma activitatea inhibitorie a extractului BMR, la nivelul MMP-2, atat in celulele normale de fibroblaste si coculturi cat si cu activator sau doxorubicina;
- A fost stabilita DL50 pentru extractul de seminte de struguri BMR la soareci Swiss masculi;
- A fost stabilit timpul mediu de supravietuire la soareci Swiss purtatori de carcinom ascitic Ehrlich tratati cu un citostatic de referinta din clasa antraciclinelor (doxorubicina) si cu extract de seminte de struguri BMR. Am constatat ca extractul de seminte de struguri nu influenteaza timpul mediu de supravieturie;
- A fost experimentat modelul de studiu in vivo al efectului antioxidant/antitumoral al extractului de seminte de struguri BMR. S-a constatat ca:
  - a) extractul de seminte de struguri BMR nu influenteaza cresterea tumorala; administrarea concomitenta de vitamina C sau extract de seminte de struguri nu a influentat scaderea numarului total al celulelor de carcinom ascitic Ehrlich indusa de administrarea de doxorubicina;
  - b) extractul bogat in catechine reduce stresul oxidativ la soarecii cu carcinom ascitic Ehrlich, evidentiat prin scaderea nivelurilor de peroxizi lipidici si proteine carbonilate, cresterea capacitatii antioxidante neenzimatice in omogenatul de ficat si in lichidul de ascita;
  - c) asocierea extractului de seminte de struguri la tratamentul cu doxorubicina reduce intensitatea stresului oxidativ generat de aceasta antraciclina. S-a constatat:

- reducerea concentratiei de peroxizi lipidici in plasma, omogenat de ficat, lichid ascitic;
- scaderea concentratiei de proteine carbonilate in omogenatul hepatic;
- cresterea capacitatii de donor de protoni in omogenatul de ficat;
- cresterea concentratiei de grupari SH in lichidul ascitic.

*linii*

*Studiul comparativ al inducerii si combaterii stresului oxidativ pe mai multe celulare (normale, transformate malign si cu inalta capacitate de metastazare), continuate pot aduce lamuriri suplimentare privind probabilitatea de modulare a alterarilor celulare prin acest tip de produs.*

#### **Comunicari Stiintifice** cu privire la tematica proiectului:

1. Suci, D. Daicoviciu, A. Muresan, L. Sabau, D. Petrisor, V. Miclaus, G. Damian: Spectroscopic investigation on Anti oxidant characteristics of a grape seed extract. Conferinta Nationala de Biofizica, iunie 2007.
2. G. Damian, S. Suci, A. Muresan, D. Daicoviciu, L. Sabau, D. Petrisor, V. Miclaus, C. Cimpoiu: EPR investigation of antioxidant characteristics of antioxidant characteristics of a grape seed extract in mice. 12<sup>th</sup> Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, Elba Island, Italy, 23-26 sept, 2007.
3. L.I. Sabau, G. Damian, D. Daicoviciu, S. Suci, A. Muresan, D. Postescu, D. Mihu, C. Mihu: In vivo study regarding antioxidant effects of red grape polyphenol extract. 12<sup>th</sup> Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, Elba Island, Italy, 23-26 sept, 2007.
4. S. Clichici, A. Filip, A. Muresan, S. Suci, D. Daicoviciu, C. Tatomir, C. Login, A. Joanta, R.M. Ion: The dynamics of MMPs and reactive oxygen species in experimental Walker tumor. 12<sup>th</sup> Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, Elba Island, Italy, 23-26 sept, 2007.
5. Suci Soimita, Clichici Simona, Sabau Lavinia, Decea Nicoleta, Daicoviciu Doina, Muresan Adriana: Efectele tocotrienolilor asupra cresterii celulelor carcinomatoase Ehrlich. 6<sup>th</sup> National Conference of Pathophysiological Society, Timisoara, 4-6 oct, 2007.

#### **Etapa V. Experimentare modele in vivo, in vitro, RES - solutii cu cisteina.**

**Perioada de desfasurare**  
**oct. 2007 - ian .2008**

#### **Obiective etapa**

Pentru realizarea etapei V *experimentare modele in vivo -ascita Erlich la soareci- pentru evaluarea efectului antioxidant/antitumoral al solutiilor cu cisteina. Experimentare model in vitro, pe culturi celulare, pentru evaluarea efectului antioxidant al solutiilor cu cisteina. Experimentare metoda RES pe modele de studiu in vivo/in vitro al solutiilor cu cisteina.*

#### **Rezumat etapa V**

In etapa anterioara a fost constituit modelul experimental de studiu in vivo a efectelor antioxidante/antitumorale ale concentratului de proteine din zer cu continut bogat in cisteina. Au fost stabilite loturile experimentale (numar de eloturi, numar de animale/lot, durata studiului), ca si dozele si caile de administrare ale substantelor alese.

In aceasta etapa, o prima activitate a avut drept obiectiv **experimentarea pe model in vivo – carcinomul ascitic Ehrlich la soarece pentru evaluarea efectului antitumoral al solutiilor cu cisteina**

In vederea atingerii obiectivului mai sus precizat, a fost utilizat ca model in vivo carcinomul ascitic Ehrlich. Acesta, obtinut initial de la partenerul IO, a fost mentinut in biobaza Catedrei de Fiziologie a UMF prin inoculări repetate, la 10 zile interval. Animalelor de experienta le-au fost administrate urmatoarele substante: Doxorubicina, medicament antitumoral din clasa antraciclinelor, eficace intr-o varietate larga de carcinoame, in unele sarcoame, in leucemii acute si in limfoame. - N-acetil-cisteina – antioxidant recunoscut, care a servit ca termen de comparatie, intrucat este o forma modificata (acetilata) a cisteinei care serveste ca precursor pentru cisteina datorita usurintei cu care se dezacetileaza, si -Concentrat de proteine din zer, cu

continut bogat de cisteina (CPZ) - cisteina este un precursor al glutationului, concentratia ei fiind factorul limitant al sintezei intracelulare a acestuia.

Substantele mai sus mentionate au fost administrate soarecilor purtatori de carcinom ascitic Ehrlich si impartiti in 6 loturi de lucru, dupa cum urmeaza: -Lotul I martor grefat cu ascita Ehrlich; -Lotul II grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina- *Doza de doxorubicina* administrata a fost 3 x 0,2mg/soarece.; -Lotul III grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu concentrat de proteine din zer bogat in cisteina . Doza de concentrat a fost de 3x200 mg cisteina/kg corp soarece, respectiv 3x5mg/soarece; -Lotul IV grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu N-acetil-cisteina: doza de NAC a fost de 3x200 mg/kg corp; -Lotul V grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina si concentrat de proteine din zer bogat in cisteina. Dozele de concentrat si de doxorubicina au fost cele mentionate mai inainte (loturile II, respectiv III). -Lotul VI grefat cu ascita Ehrlich si tratat cu Doxorubicina si N-acetil-cisteina- dozele administrate au fost acelea de la loturile II si IV. Animalele au fost urmarite timp de sase zile dupa grefa de ascita Ehrlich. In ziua +6 a fost recoltat sange din sinusul retroorbital al soarecilor. Animalele au fost sacrificate prin dislocarea vertebrelor cervicale si s-au prelevat probe de sange, ascita si organe.

**Toxicitatea substantelor administrare** a fost apreciata prin masurarea concentratiei hemoglobinei in sange, ca si prin numararea elementelor figurate sanguine (eritrocite, leucocite). Doxorubicina are efecte toxice medulare, evidentiata prin scaderea numarului de eritrocite si leucocite circulante.

**Evaluarea cresterii tumorale:** a fost facuta prin masurarea volumului tumoral absolut (volumul ascitei) si prin numararea celulelor carcinomatoase Ehrlich. Rezultatele noastre au aratat efectul de incetinire a cresterii tumorale de catre doxorubicina la soarecii purtatori de ascita Ehrlich , confirmand rezultatele anterioare. In schimb, nici concentratul de proteine din zer bogat in cisteina si nici NAC nu au demonstrat efecte antitumorale. Asocierea CPZ la tratamentul cu doxorubicina scade semnificativ dezvoltarea tumorii, evidentiata prin numarul total de celule tumorale.

**Evaluarea timpului mediu de supravietuire** a fost realizata prin urmarirea mortalitatii la loturi de cate 15 animale tratate conform schemei de mai sus si urmarite timp de 45 zile. Folosindu-se formule adecvate, a fost calculat timpul mediu de supravietuire si cresterea duratei medii de supravietuire. Am constata ca doxorubicina creste timpul mediu de supravietuire al soarecilor purtatori de ascita carcinomatoasa Ehrlich. CPZ, inasa, nu imbunatateste timpul mediu de supravietuire si, pe de alta parte, nu influenteaza efectele doxorubicinei asupra duratei medii de viata a animalelor cu carcinom ascitic Ehrlich.

Un al doilea obiectiv a fost acela de **evaluarea a proprietatilor antioxidante ale produsului testat**. In acest scop, la loturile de animale descrise mai sus, au fost dozate concentratiile plasmatic si in omogenate de organ ale unor markeri de peroxidare lipidica (malonaldehida libera) si proteica (proteine carbonilate). Au mai fost determinati parametri ai apararii antioxidante neenzimatic (capacitatea de donator de hidrogen, continutul de grupari sulfhidril totale). Am constatat ca administrarea de CPZ ridica semnificativ nivelul plasmatic al gruparilor sulfhidril totale, ca si capacitatea de donator de hidrogen a plasmei si omogenatului hepatic. Cresterea capacitatii antioxidante neenzimatic a plasmei este secundata de scaderea markerilor de peroxidare lipidica in plasma si omogenatul de ficat al soarecilor tratati cu NAC si CPZ. In ceea ce priveste concentratia de proteine carbonilate, ca marker al peroxidarii proteinelor, nivelul plasmatic al acestora este scazut de catre CPZ si NAC. Efectele CPZ par a fi mai pronuntate decat cele ale NAC. In omogenatul hepatic inasa, concentratia carbonililor proteici la animalele carora li s-a administrat CPZ este mai ridicata decat la lotul martor. Acest efect nu a fost observat pentru NAC.

Tratamentul cu doxorubicina produce stres oxidativ in ficatul soarecilor purtatori de ascita carcinomatoasa Ehrlich, oglindit de cresterea nivelurilor hepatice ale malonaldehidei liber si a proteinelor carbonilate. Modificarile oxidative sesizate in omogenatul hepatic al animalelor tratate cu doxorubicina nu se reflecta in concentratiile plasmatic ale markerilor de peroxidare . Asocierea CPZ la tratamentul cu doxorubicina a reusit sa scada nivelele malonaldehidei libere din omogenatul de ficat pana la valori comparabile cu acelea ale lotului tratat doar cu CPZ. Efectele CPZ sunt comparabile cu acele ale NAC. In ceea ce priveste proteinele carbonilate, asocierea CPZ la citostaticul ales produce o crestere semnificativa a nivelurilor hepatice ale acestui marker.

#### **Concluzii etapa V:**

- CPZ, ca unic tratament, nu are efecte antitumorale. Asociat tratamentului cu doxorubicina, desi nu creste semnificativ timpul mediu de supravietuire, reduce semnificativ volumul tumoral.
- CPZ demonstreaza efecte antioxidante comparabile cu cele ale NAC; in tratament asociat

doxorubicinei, imbunototeste capacitatea antioxidanta neenzimatica si atenuaza stresul oxidativ

## **Rezultate etapa V:**

### **Comunicari Stiintifice**

1. ANIMAL STUDIES ON ANTIOXIDANT EFFECTS OF THE RED GRAPES SEED EXTRACT FROM VITIS VINIFERA c.v. BURGUND MARE, RECAS. A.Muresan, C.Alb, N.Decea, S.Suciu, C.Login, poster la "The 3<sup>rd</sup> International Conference on Polyphenols and Health, Kyoto, 25-28 nov 2007.
2. IN VITRO AND IN VIVO STUDIES ON THE ANTITUMOR EFFECTS OF POLYPHENOLS FROM VITIS VINIFERA c.v. BURGUND MARE, RECAS. S.Suciu, A.Muresan, S.Clichici, I.D.Postescu, D.Daicoviciu, C.Tatomir, O.Brabos, V.Cernea – poster la "The 3<sup>rd</sup> International Conference on Polyphenols and Health, Kyoto, 25-28 nov 2007.
3. ANTIOXIDANT EFFECTS OF A RED GRAPE SEED POLYPHENOL EXTRACT IN EHRLICH ASCITIC CARCINOMA . I.Sabau, S.Suciu, A.Muresan, D.Daicoviciu, I.D.Postescu- poster la "The 3<sup>rd</sup> International Conference on Polyphenols and Health, Kyoto, 25-28 nov 2007.
4. THE EFFECTS OF SOY ISOFLAVONES, VITAMIN e , COENZYM q10 ON OXIDATIVE STRESS MARKERS IN SERUM AND TISSUE OF OVARIECTOMISED RATS. I.Sabau, S.Suciu, A.Muresan, D.Daicoviciu, I.D.Postescu- poster la International Conference for Food Factors for Health Promotion, Kyoto, 28-31 nov 2007.
5. STUDY ON THE EFFECTS OF PALM OIL TOCOTRIENOLS IN EHRLICH ASCITIC CARCINOMA S.Suciu, S.Clichici, L. Sabau, M.Achim, N. Decea , D.Daicoviciu, A.Muresan – comunicare orală la Conferinta Nationala de Fiziopatologie cu participare internationala, Timisoara, oct 2007.
6. STUDII ASUPRA EFECTELOR ANTIOXIDANTE/ANTITUMORALE ALE UOR PRODUSI NATURALI. A.Muresan, S.Suciu, I.D.Postescu, G.Damian, N.Pop, T.Frentiu. Conferinta Nationala organizata de Consiliul National al cercatarii Stiintifice de Excelenta, Sibiu, oct.2007.

**Etapa VI. Prezentare/ demonstrare functionalitate/ utilitate :metode obtinere solutii catechine, tocotrienoli, cisteina, modele in vivo,in vitro ,RES efect antioxidant /antitumoral catechine, tocotrienoli, cisteina. Valorificare rezultate.**

**Perioada de desfasurare ian .2008 - iun. 2008**

### **Obiective etapa**

Pentru realizarea etapei de executie Planul de realizare, conform contract, a prevazut urmatoarele obiective:

*Activitatea VI.1 Evaluarea efectelor radicalilor liberi pe modelele in vitro si in vivo prin RES si spectroscopie FT-IR. Prezentarea si demonstrarea functionalitatii si utilitatii metodelor de laborator de obtinere a solutiilor cu catechine, tocotrienoli, cisteina. Prezentarea si demonstrarea functionalitatii si utilitatii modelelor experimentale in vivo si in vitro si a metodei RES de studiu a efectului antioxidant/antitumoral al unor compusi naturali (catechine, tocotrienoli, cisteina) in scopul promovarii;*

*Activitatea VI.2 Diseminarea pe scara larga prin comunicarea si publicarea nationala si internationala a rezultatelor;*

*Activitatea VI.3 Participarea la manifestari tehnico-stiintifice din domenii specifice proiectului.*

### **Manifestari internationale:**

*The 10<sup>th</sup> Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, Cluj-Napoca 5-7 iunie 2008*