(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Bucureşti

ROMÂNIA

(11) RO 128714 A2
(51) Int.Cl.
A61L 27/20 (2006.01);
A61L 27/54 (2006.01);
A61L 27/60 (2006.01)

(12) # CERERE DE BREVET DE INVENŢIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01357**

(22) Data de depozit: **08.12.2011**

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. **8/2013**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREŞTI**,
BD.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.36-46, SECTOR 5, BUCUREŞTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **STOIAN GHEORGHE**,
CALEA VĂCĂREŞTI NR. 338, BL.15, SC.1, ET.5, AP.17, BUCUREŞTI, B, RO;
• **GĂLĂŢEANU BIANCA**, *STR. HUEDIN NR. 11, BL. 11, SC. 2, ET. 2, AP. 79, SECTORUL 4, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **COSTACHE MARIETA**, *STR. TELIŢA NR. 12, BL. 56, SC. 4, ET. 1, AP. 46, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **DINISCHIOTU ANCA**, *CALEA MOŞILOR NR.124 A, SC.1, ET.1, AP.2, SECTOR 4, BUCUREŞTI, B, RO;*
• **STURZOIU CRISTINA**,
ALEEA ADRIAN CÎRSTEA NR.3, BL.33B, SC.1, AP.22, SECTOR 3, BUCUREŞTI, B, RO;
• **PETRESCU MARIA**,
STR. TÎRGU PEŞTELUI NR. 16, SIBIU, SB, RO

(54) # PROCEDEU DE ACTIVARE A PROLIFERĂRII CELULARE, CU EFECT ASUPRA REGENERĂRII ŢESUTULUI ARS ŞI RĂNIT, ŞI AL METALOPROTEINAZELOR MATRICEALE, PRIN STIMULAREA ADEZIUNII ŞI DIFERENŢIERII CELULARE, SUB ACŢIUNEA LEVANULUI PRODUS DE CĂTRE BACTERIA *ZYMOMONAS MOBILIS*, CRESCUTĂ PE EXTRACTE DE SORG ZAHARAT (*SORGHUM BICOLOR VAR. SACCHARUM*)

(57) **Rezumat:**

Prezenta invenţie se referă la un procedeu de obţinere prin fermentaţie a unui polizaharid crescut pe extracte de sorg zaharat (*Sorggum bicolor var. saccharum*) standardizat la 5% sucroză, fără adaosuri de săruri minerale sau yeast extract, cu aplicaţii în ingineria tisulară şi reparatorie, de regenerare a tegumentului ars sau rănit şi pentru reconstrucţia ţesutului adipos. Procedeul implică tratarea, cu o soluţie de polifructan (levan) produs de bacteria Gram negativă *Zymomonas mobilis*, a celulelor dermale şi, respectiv, a progenitorilor adipogenici, creşterea pe mediu solid şi lichid, în absenţa unor adaosuri de săruri minerale ori factori de creştere, efectul tratamentului fiind monitorizat prin analiza profilului metaloproteinazelor tisulare, analize de adeziune şi proliferare celulară, precum şi cele de diferenţiere adipogenică care se realizează prin tehnici specifice, cum ar fi gelatin zimografia, microscopia în contrast de fază, analize de fluorescenţă şi spectrofotometrie.

Revendicări: 4
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecţia conferită potrivit dispoziţiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepţia cazurilor în care cererea de brevet de invenţie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecţiei conferite de cererea de brevet de invenţie este determinată de revendicările conţinute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).

RO 128714 A2

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de inventie
Nr. a 2011 00757
Data depozit 12 2011

Prezenta invenţie se referă la un procedeu de inginerie tisulară care implică tratamentul tegumentului ars, rănit sau supus reconstrucţiei ţesutului adipos cu o soluţie de levan, un polifructan, produs de către bacteria Gram negativă *Zymmonas mobilis* în condiţiile creşterii ei pe un nou substrat fermentescibil, extractul de sorg zaharat, fără adaosuri de săruri minerale sau extract de drojdie.

Fructanii reprezintă un grup divers de polizaharide care conţin mai multe unităţi de fructoză cuplate prin legătură β-glicozidică. Ei sunt găsiţi in mod natural nu numai în plante ci şi în bacterii ori fungi, servind probabil la funcţii total diferite [Grube şi alţii, 2002]. În cele mai proeminente tipuri structurale de polimeri, inulina şi levanul, scheletul de fructoză provine dintr-o moleculă de sucroză legată prin legături β2→1 şi respectiv β2→6 [Ernst şi alţii, 1998]. Cei mai mulţi fructani bacterieni de tipul levanului sunt polimeri cu masă moleculară mare compuşi din monomeri β-(2,6)-fructozil-fructoză şi care prezintă catene laterale cu legături β-(2,1) glicozidice [Rosell şi Birkhed, 1974].

Din punct de vedere structural, levanii sunt structuri exopolizaharidice care protejează celulele de deshidratare, ajută la ataşarea acestora de suprafeţe, şi în cazul unor specii de plante patogene sunt implicaţi în prevenţia invadării lor de către bacterii, fiind astfel recunoscuţi a participa la sistemul de apărare al gazdei [Hettwer şi alţii, 1995; Kasapis şi alţii, 1994]. În unele cazuri levanul participă la procesul de simbioză, fenomen descris în cazul bacteriei *Bacillus polymixa* [Hernandez şi alţii, 1995]. El este produs extracelular de către bacterii diferite precum *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbicola* [Blake şi alţii, 1982; Hernandez şi alţii, 1995; Moosavi-Nasab şi alţii, 2010] ori *Zymomonas mobilis* [Viikari, 1984]. În medii pe bază de sucroză bacteria Gram negativă *Z. mobilis* producătoare de etanol, biosintetizează diverşi produşi secundari, în special levan cu masă moleculară mare, (75-2000 kDa), sorbitol, acid gluconic, şi fructooligozaharide [Viikari1988; Vina şi alţii, 2001]. Ea este capabilă să tolereze concentraţii mai crescute de sucroză [Swings şi De Ley, 1977]. Un mare dezavantaj al utilizării *Z. mobilis* îl reprezintă mica ei toleranţă faţă de ionii anorganici [Swings şi de Ley, 1977], care sunt în mod frecvent prezente la concentraţii inhibitorii în extracte vegetale ori în substratele industriale care conţin sucroză şi care posedă un nivel semnificativ crescut de săruri precum ar fi melasa din sfecla de zahăr [Bekers şi alţii, 2000; Ranatunga şi alţii, 2000; Tano şi alţii, 2000]. Producţia de levan este afectată profund de concentraţia de nutrienţi din mediul de cultură cât şi de condiţiile mediului de creştere. S-a constatat ca prezenţa NaCl şi KCl reduce randamentul în biosinteza de etanol concomitent cu o creştere a producţiei de sorbitol, fructooligozaharide şi levan în cazul fermentaţiei sucrozei [Kirk şi Doelle 1992; Vigants şi alţii, 1996; Vigants şi alţii, 1998]. Creşterea sintezei de fructooligozaharide şi de sorbitol în prezenţa sărurilor de sodiu şi potasiu poate fi dată de rolul lor osmoprotectiv la bacteria *Z. mobilis* [Bekers şi alţii, 2000]. De asemenea, s-a constatat că dacă producţia de etanol este inhibată la presiuni osmotice crescute, activitatea de biosinteză a levanului este stimulată [Vigants şi alţii, 1996] în timp ce activitatea de biosinteză a levanului nu depinde de sursa de compuşi biologic activi utilizaţi ori de calitatea aditivilor utilizaţi în mediul de cultivare a *Z. mobilis* [Bekers şi alţii, 2002].

În acest context, datorită conţinutului mare de sucroză, a randamentului mare de creştere în biomasă şi al domeniului mare de produse cu valoare adăugată, *Sorghum bicolor var. saccharum* reprezintă o plantă de cultură promiţătoare în producţia de biomasă şi de produşi biologic activi biosintetizaţi în diverse procese fermentative, printre care şi a levanului. În plus, prin marea sa capacitate de retenţie a dioxidului de carbon, mai crescută decât a unei suprafeţe convenţionale de conifere, sorgul reprezintă o plantă tehnică de cultură ideală [Awika şi Rooney, 2004; Awika şi alţii, 2005; Stoian şi alţii, 2005; Stoian, 2008].

Levanul este un compus vâscos [Park şi Choi, 1991;], biologic activ şi netoxic, cu solubilitate mare în apă care poate fi utilizat ca îngroşător ori stabilizator alimentelor ori în industria farmaceuticeă sau cosmetică. El este o bună materie primă în producţia de fructoză.

Levanul acţionează ca un imunomodulator ori este aplicat ca şi substitut al plasmei sanguine [Otterlei şi alţii, 1993; Yamada, 1996; Muro şi alţii, 2000]. De asemenea levanul este un compus biologic activ ce scade concentraţia colesterolului plasmatic [Yamamoto şi alţii, 1999; Grube şi alţii, 2002]. În industria alimentară, este folosit ca sursă de fructoză şi pentru producţia de fructooligozaharide, ca agent de îngroşare, stabilizator, agent de încapsulare, aroma şi transportator de aroma, precum şi ca fixator de culoare (Bekers et al, 2002; Calazans et al, 1997). Alte aplicaţii ale levanului derivă din capacitatea sa de a acţiona ca fibră, aducând bune efecte fiziologice si biochimice. Datele de literatură arată că siropul de fructan obţinut din fermentaţia sucrozei de către *Z. mobilis* are o aromă asemănătoare mierii de albine servind atât ca o sursă de probiotice cu efecte benefice asupra florei intestinale, stimulând creşterea bifidobacteriilor şi descurajând pe cea a microorganismelor potenţial patogene [Yun, 1996; Kang şi alţii, 1999], cât şi ca fibre solubile, devenind astfel un ingredient potenţial în industria alimentară. Ca şi levanul produs de către *Aerobacter* [Stark şi Leibovici, 1986], homobiopolimerul produs de către *Z. mobilis* posedă activităţi antitumorale şi imunostimulatoare, după cum demonstrează studiile efectuate pe culturi de celulele sarcomatoase 180 [Calazans şi alţii, 1997], în timp ce activitatea antitumorală este în relaţie cu masa sa moleculară [Calazans şi alţii, 2000] iar efectul antitumoral este mai pronunţat cu cât structura levanului este mai ramificată [Yoo şi alţii, 2004]. Pe de altă parte, se consideră că activitatea sa antitumorală pare a fi dată de interacţiunea acestuia cu membrana celulară crescând astfel permeabilitatea ei şi facilitând astfel efectul citotoxic al unor medicamente [Leibovici şi Stark,1985; Monte Alegre şi alţii, 2005].

Levanul prezintă un efect de hidratare care s-a dovedit a fi la fel de bun ca cel al acidului hialuronic compus care de asemenea promovează proliferarea fibroblastelor si keratinocitelor umane (Kim et al, 2005). Este dovedit ştiinţific că levanul are o actiune anti-inflamatorie si anti-iritanta la nivelul pielii si ca promovează proliferarea celulară în pielea artificiala, fiind un bun candidat pentru utilizarea lui in produse cosmetice şi dermo-cosmetice (Kim et al, 2005).

Deter şi colab. au demonstrat în 2004 că unele polizaharide precum cele extrase din fructul de kiwi (*Actinidia chinensis L.*) exercită efecte stimulatoare asupra proliferării celulare prin activarea receptorilor pentru factori de creştere si sinteza de colagen de către celulele umane din piele. Experimentele realizate de Isnard şi colab. (2002) care au utilizat un Fucogel, un biopolimer cu masa moleculară de 40kDa produs de o tulpină nepatologică, *Clebsiella pneumoniae* şi format din unităţi trizaharidice: galactoză, 4-O-acetil acid galacturonic şi fucoză în ceea ce priveşte pe proliferarea fibroblastelor umane din piele au arătat că există o o stimulare signifiantă a proliferării celulare. Cu toate acestea este necesară însă elucidarea meacanismului/mecanismelor de acţiune a acestor polizaharide. Astfel, există o serie de studii care au arătat că o serie de polizaharide influenţează expresia şi activarea MMP-2 şi MMP-9 atât in vivo (la nivelul pielii) cât şi in vitro (pe fibroblaste şi keratinocite aflate în cultură). S-a sugerat posibilitatea ca oligo- ori polizaharidele luate în studiu să interacţioneze cu receptori ai membranei celulare cum ar fi receptorii de elastină- laminină [Fülöp, 1998; Labat-Robert, 1980] sau receptorii de fucoză- manoză [Biessen, 1994; Codaminet, 1998] cu toate că penetrarea intensă a nucleului a sugerat posibilitatea interacţiei acestora cu factori ai transcrierii şi/sau cu situsuri de reglare a expresiei genelor [Isnard şi colab. 2002]. Aceste date sugerează importanţa activării metaloproteinazelor matriciale de către polizaharide în tratamentele arsurilor şi rănilor.

În prezent numeroşi producători de produse cosmetice si dermocosmetice au încercat sa identifice compuşi cu acţiune reepitelizantă, cu aplicaţii în regenerarea tegumentului. Ramnoza, un deoxizahar natural, ce se găseşte in mod natural in anumite plante braziliene, cum ar fi Uncaria sau in arbori ca mesteacanul argintiu, fiind extrasa la o puritate mare printr-un proces de hidroliza, în forma sa de L-zaharid, este recunoscuta in farmacopee pentru

proprietăţile sale calmante, insa Vichy a identificat pentru prima data proprietăţile antirid pe care le posedă. Aplicată în concentraţie mare (5%), este considerata a fi cel mai puternic agent de reactivare a dermului papilar. Acest ingredient activ este protejat de 7 brevete de către Laboratoarele Vichy [*http://www.ymed.ro/.*]. Nu sunt însă date care să descrie efectul de stimulare a proliferării celulare pe celule dermale de către levan.

Din categoria altor compuşi cu activitate de stimulare a proliferării celulare se mai pot enumera dexpantenolul, un precursor al acidul pantotenic care are aceleaşi efecte ca şi vitamina B5, întrucât este rapid transformat in această vitamină, in organism. Totuşi, el are avantajul de a fi mai uşor absorbit, atunci când este aplicat local. Acidul pantotenic este o componenta a coenzime A care, sub forma de acetil-coenzima A, joaca un rol central in metabolismul tuturor celulelor. Este, prin urmare, indispensabil pentru dezvoltarea si regenerarea tegumentelor si mucoaselor. Alantoina este un compus de origine organica sau vegetala care rezulta ca urmare a reactiei chimice intre uree si acidul glioxilic. Alantoina vegetală este extrasă din rădăcinile şi frunzele de tătănească (*Symphytum officinale*). Principala funcţie a alantoinei este aceea de stimulare a proliferării celulare şi de favorizare a reconstrucţiei tisulare, astfel alantoina accelerează cicatrizarea pielii şi regenerarea celulelor. Datorita acestor proprietăţi, alantoina este folosita in medicină pentru tratarea ulcerelor varicoase, rănilor, arsurilor si plăgilor. Nu sunt însă date care să descrie efectul de stimulare a proliferării celulare cu aplicaţii în tratamentul rănilor ori arsurilor de către un polifructan, ori, mai precis de către levanul produs de *Z. mobilis*.

Alte posibile utilizări ale levanului sunt cele legate de diferenţierea adipogenică. In majoritatea cazurilor, preadipocitele primare izolate de la animale tinere necesită fie concentraţii scăzute (1-10 nM) de insulină în prezenţa de ser fetal, fie concentraţii mari (1-10 μM) în mediu fără ser [Gregoire şi colab., 1990; Hauner şi colab., 1989; Suryawan şi Swanson, 1997]. In funcţie de specie, vârsta donorului şi/sau sursa depozitelor adipoase, agenţi ca glucocorticoizi sunt necesari fie pentru a induce un program de diferenţiere adipogenică, fie numai pentru a-l accelera [Deslex şi colab., 1987; Gregoire şi colab., 1990; Hauner şi colab., 1989; Suryawean şi colab., 1997; Yu şi colab., 1997]. Pentru linii celulare stabilizate ca şi pentru culturi primare, dezvoltarea unor medii de cultură fără ser a confirmat rolul pozitiv al acestor inductori şi implicarea căilor de semnalizare ale IGF-1 (*insulin-like growth factor I*), glucocorticoizilor şi cAMP. Inductia diferentierii adipogenice *in vitro* a celulelor precursor (hADSC – human Adipose Derived Stem Cells) izolate din tesutul adipos subcutanat prin lipoasuctie se face prin incubarea culutii cu un mediu de cultura ce contine un cocktail de inducţie adipogenică. Acest mix de factori inductori ai procesului de adipogeneza contine compusii: insulina, IBMX (izo-butil-metil-xantina), dex (dexametazonă), biotina, transferina, Indometacin, hidrocortizol, triiodotirozina, troglitazona, etc [Zuk şi colab., 2002; Niemala şi colab., 2008; Bourlier şi colab., 2004; Bouloumie şi colab., 2001]. Toate aceste metode prezentate mai sus sunt realizate cu consum mare de materiale, sau laborioase în ceea ce priveşte bugetul de timp.

Prin aplicarea invenţiei propuse se realizează o metodă ieftină de producere a levanului utilizând extracte de sorg zaharat de o calitate înaltă şi se pune la punct un procedeu de tratament a arsurilor ori a rănilor cu levanul bacterian obţinut prin fermentaţia extractului de sorg zaharat. În plus, procedeul descris de noi conduce la obţinerea unor rezultate promiţătoare în regenerarea tisulară, de stimulare a proliferării celulare a celulelor dermale şi de activare a diferenţierii adipogenice; procedeele aplicate permit evidenţierea activării metaloproteinazelor matriciale prin tehnici electroforetice, a celulelor dermale viabile din punct de vedere al integrităţii membranei ori a multiplicării celulare obţinute prin tehnici histologice sau flow citometrice cu ajutorul cărora se pot evidenţia specific şi în detaliu modificările morfologice ale celulelor dermale sau adipocitare. Tehnicile descrise sunt simple, ieftine şi cu un consum relativ redus de reactivi şi timp cu o aparatură uşor de manipulat.

Rezultatele sunt rapide, implică un procedeu tehnic simplu şi netoxic; necesită resurse financiare minime. Toate aceste caracteristici specifice conferă procedeului inventat de obţinere de levan prin culpivarea bacteriei Gram negative Z. mobilis pe extracte de sorg zaharat şi de utilizare a acestuia la tratamentul rănilor şi arsurilor, de activare a proliferării celulare şi a diferenţierii adipogenice avantajul rezultatelor exacte, specifice şi rapide.

Aplicarea invenţiei presupune următoarele etape de lucru şi anume:

a. de obţinere a levanului şi anume de creştere a bacteriei Z. mobilis pe extracte de sorg zaharat, fără adaos de nutrienţi ori factori de creştere şi urmărirea creşterii prin spectrofotometrie Vis;
b. de tratament a unor leziuni tegumentare (arsuri şi răni) şi anume aplicarea soluţiei de levan peste extracte proteice obţinute din ţesuturi lezionate de şobolan şi vizualizarea activării metaloproteinazelor tisulare prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă în prezenţă de dodecilsulfat de sodiu şi de activare postelectroforetică;
c. tratamentul de stimulare a proliferării celulare, şi anume aplicarea soluţiei de levan peste proba de celule şi vizualizarea unor markeri specifici la microscopul de fluorescenţă.
d. tratamentul de activare a diferenţierii adipogenice prin aplicarea soluţiei de levan peste preadipocitele primare izolate de la animale/om şi urmărirea procesului prin vizualizarea unor markeri specifici.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenţiei prin figurile:

- fig. 1. Cultură solidă de Z. mobilis (2% agar) realizată pe extract de sorg zaharat (5%),cu producţie de levan fără adaosuri de elemente minerale şi factori de creştere.

- fig. 2. Cazein (A) şi Gelatin (B) zimografia unor probe de extracte proteice netratate şi pretratate cu levan. Legendă: 1)- 15•10-7 mol/l concentraţie levan, 2)- 0,3•10-7 mol/l, 3). 0,6•10-7 mol/l, 4) 1,2•10-7 mol/l, 5)- 1,8•10-7 mol/l, 6), 7, 8- probe control fără levan.

- fig. 3. Evidentierea proliferarii fibroblastelor dermale aparţinând liniei celulare CCD-1070Sk în absenţa levanului (A) şi în prezenţa lui (B).

- fig. 4. Evaluarea diferentierii adipogenice prin coloratia cu Oil Red O a celulelor supuse procesului de adipogeneza in sistem 3D în prezenta sau absenta levanului.

1. **Aparatura necesară pentru producerea de levan prin cultivarea bacteriei *Z. mobilis* pe extract de sorg zaharat:**

- laborator de culturi microbiene dotat cu aparatura si consumabile adecvate pentru lucrul cu diverse extracte vegetale de sorg zaharat;

- Spectrofotometru VIS pentru urmărirea creşterii celulare;

Metoda de cultivare a bacteriei *Z. mobilis* pe extracte de sorg zaharat presupune caracterizarea în primă etapă a extractelor de sorg, din punct de vedere al compoziţiei în sucroză. Experimentele constau în extracţia la cald a sucrozei din diverse soiuri de sorg zaharat precum varietăţile 11100, 11061, LC 99, Prut04 ori Iarbă de Sudan.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenţiei prin plansa 1:

Mod de lucru

Extractele se obţin prin fierbere şi concentrare la a 10-a parte care în continuare se sterilizează şi se caracterizează din punct de vedere chimic. De obicei se obţin valori de 20-32g% zaharuri totale. Estimarea concentraţiei de sucroză din extractele de sorg zaharat utilizează metoda cu reactiv antronă care decelează, în condiţii bine stabilite dizaharidul de alte zaharide prezente într-un extract vegetal [Van Handel, 1967]. Cantitatea de sucroză dozată este cuprinsă între 12-29g% în funcţie de varietatea de sorg zaharat utilizată la prepararea levanului. În continuare se realizează diluţia extractului la 5% care se utilizează ca atare la prepararea mediului solid prin adăugare de agar (2%) şi sterilizare ori prin însămânţare cu un inocul bacterian care conţine care conţine 10^7 celule/ml aflate în fază

exponenţială de creştere. Levanul a fost obţinut fie din mediu de cultură lichid, prin fermentaţia bacteriei Gramm negative *Z. mobilis*, la 30°C fără agitare şi fără adaos de nutrienţi [Andersone şi colab., 2004], fie prin raclare cu apă distilată, de pe mediul de cultură solid alcătuit din extract de sorg zaharat, 5% şi agar, 2% [Hernandez şi colab., 1995]. Creşterea în mediu lichid se monitorizează la 600 nm. O densitate optică egală cu 0,9 corespunde la 0,35 mg masă celulară uscată/ml [Douka şi colab., 1999]. După îndepărtarea celulelor bacteriene prin centrifugare (1500 rpm/10 minute/4°C), levanul se separă din mediul de cultură prin precipitare cu un solvent organic (alcool etilic, alcool izopropilic, etc.) şi apoi se colectează şi se analizează. Purificarea biopolimerului se realizează prin reluări în ser fiziologic/precipitări cu solvent organic până ce produsul prezintă un singur peek cromatografic la eluţia sa cromatografică pe Biogel P200, 50-100 mesh (Biorad Labs.) [Reese şi Avigada, 1966; Reese şi colab., 1994]. Concentraţia de levan este determinată spectrofotometric, la 330nm, faţă de un blanc [Andersone, 2004] sau, comparativ cu o curba etalon realizată cu levan pur cu o concentraţie de 0,1mg/ml (Sigma) [Dubois şi colab., 1956]. Deoarece producţia de levan se poate realiza prin fermentaţia sucrozei din mediu, metodologia presupune urmărirea creşterii unor tulpini de *Z. mobilis*, in prezenta extractelor de sorg zaharat (standardizat la 5% sucroză), utilizate ca atare, fara suplimenti in mediul de cultură, sau incorporate in mediul de cultura, atat solid sau lichid. Productia de levan pe mediu solid suplimentat cu extacte de sorg zaharat a fost prezentă la toate tulpinile de bacteriene testate, rezultatele aratând că tulpinile *Z. mobilis* NCIB 11163/70 şi *Z. mobilis* CP_4^{PR} produc o cantitate maximă de levan.

Interpretarea rezultatelor

Apariţia unui maxim de absorbţie caracteristic la 330 nm presupune existenţa polizaharidului în mediu/în extract iar apariţia unui singur peak care se eluează la circa 1/3 volume de coloană conduce la sugestia existenţei unui preparat pur. Structura levanului se confirmă prin hidroliză acidă, urmată apoi de cromatografie pe stat subţire, pe plăcuţe de Silicagel 60 (Merck, Germany).

2. Aparatura necesară pentru activarea metaloproteinazelor tisulare din ţesut ars si rănit de către levan, la modele experimentale de sobolani Wistar.

-Material biologic (piele arsă sau rănită provenind de la un animal experimental ori de la un subiect uman)

- Aparat Potter pentru obţinerea extractului
- Spectrofotometru VIS pentru dozarea de proteină
- Sistem electroforetic constând din tanc, sursă curent continuu, cuve activare probe, sistem de vizualizare postelectroforetică.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenţiei prin plansa 2:

Modul de lucru

Se prelevează ţesut epidermal cu leziuni termice sau răni. Se cântăreşte proba după care se potter-izează în ser fiziologic într-un raport de 1/10. Se determină concentraţia proteică după metoda Lowry şi colab. (1951). Activarea metaloproteinazelor se realizează in vitro prin incubarea timp de o oră la temperatura camerei a probelor proteice (4,5 μgrame proteină) cu levan de diverse concentraţii: $0,15 \cdot 10^{-7}$ mol/l, $0,3 \cdot 10^{-7}$ mol/l, $0,6 \cdot 10^{-7}$ mol/l, $1,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l şi $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol/l.

În paralel se toarnă geluri de poliacrilamidă (T=7,5%) care conţin cazeină ori gelatină într-o concentraţie de 1% şi se realizează SDS PAGE timp de 4-5 ore la 4°C la o tensiune aplicată de 100V. După separarea electroforetică activităţile gelatinazice/cazeinazice se evidenţiază conform protocolului de lucru [Lombard şi colab., 2005]. Prin zimografie se permite vizualizarea activităţii proteolitice a enzimelor. Această tehnică implică migrarea electroforetică a enzimelor pe un gel de poliacrilamidă copolimerizat cu substratul proteolitic. Enzimele sunt denaturate in prezenţa SDS într-o etapă premergătoare a migrării electroforetice şi ulterior sunt renaturate pentru a permite hidroliza substratului. După colorare

zonele digerate sunt evidenţiate şi pot fi cuantificate prin măsurarea densităţii. Sensibilitatea metodei este comparabilă cu cea a tehnicii imunodot bloting cu metode de detecţie prin marcare chemiluminescentă, cu menţiunea ca această metodă nu discriminează între formele pro- şi active ale enzimelor [Gogly şi alţii, 1998].

Interpretarea rezultatelor

Metaloproteinazele tisulare extracelulare joaca un rol important in fiziologia dezvoltării normale a ţesutului conjunctiv, a morfogenezei sau a vindecării arsurilor fiind de altfel implicate în procese pato-fiziologice. La analiza probelor biologice, profilul metaloproteinazelor contribuie la caracterizarea unor procese implicate in remodelarea tisulara, proces implicat in vindecarea rănilor şi arsurilor, posibil şi în dezvoltarea de noi terapii. In acest context, metoda elaborată implică tratamentul unor extracte proteice totale obţinute din ţesuturi arse şi/sau rănite de şobolan/uman cu un preparat de levan produs de bacteria Z. mobilis crescută pe un extract de sorg zaharat. Din nefericire la momentul actual nu a fost elucidat mecanismul prin care aceasta se realizează activarea proteinazelor.

Aceste rezultate sunt importante in particular în preventia infectiilor sau afectiunilor precum şi a leziunilor termale ori mecanice de la nivelul ţesutului epidermal, cat si in proliferarea celulara, dar si un effect deosebit in grăbirea, vindecarea şi o mai buna cicatrizare a arsurilor si ranilor. Se constată că terapia cu levan poate reprezenta o nou opţiune validă, cu rezultate semnificative, benefice asupra leziunilor cutanate atât in vitro cat si in vivo.

3. Aparatura necesară activării proliferării celulare.

- laborator de culturi celulare dotat cu aparatura si consumabile adecvate pentru lucrul cu celule umane
- microscop inversat de fluorescenta;

Inducţia diferenţierii adipogenice *in vitro* a celulelor precursor (hADSC – human Adipose Derived Stem Cells) izolate din tesutul adipos subcutanat prin lipoasuctie se face prin incubarea culutii cu un mediu de cultura ce contine un cocktail de inductie adipogenica. Acest mix de factori inductori ai procesului de adipogeneza contine compusii: insulina, IBMX (izo-butil-metil-xantina), dex (dexametazona), biotina, transferina, Indometacin, hidrocortizol, triiodotirozina, troglitazona, etc (Zuk et al, 2002; Niemala et al, 2008; Bourlier et al, 2004; Bouloumie et al, 2001). Aplicarea invenţiei pentru regenerarea tegumentului presupune tratatrea fibroblastelor dermale cu o solutie de levan si evaluarea proliferarii prin microscopie in fluorescenta dupa marcare cu faloidina conjugata cu fluorocrom (FITC sau TRITC).

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenţiei prin planşa 3:

Mod de lucru

Preparatul pentru microscopie se obtine prin fixarea celulelor cu metanol rece timp de 10 minute, permeabilizare cu o solutie 2% BSA si 0.1% Triton, timp de 20 min, spalare cu PBS de 2 ori cate 5 minute si incubare cu o solutie phalloidina conjugata cu TRITC 2h la 37°C. Vizualizarea se face la microscopul de fluorescenta.

Interpretarea rezultatelor

Phalloidina se leaga de filamentele de actina ale citoscheletului permitand astfel evidentierea celulelor din cultura precum si a modificarilor morfologice pe care ele le sufera.

4. Aparatura necesară activării regenerării ţesutului adipos.

Aplicarea invenţiei pentru regenerarea tesutului adipos presupune realizarea unei culturi tridimensionale: inglobarea de hADSC (human Adipose Derived Stem Cells) intr-un hidrogel consacra pe baza de alginat, cu sau fara levan, si incubarea constructului intr-un mediu de inductie adipogenica. Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenţiei prin planşa 4:

Aparatura necesară pentru efectuarea determinărilor:

- laborator de culturi celulare dotat cu aparatura si consumabile adecvate pentru lucrul cu celule umane

- microscop inversat pentru vizualizare in contrast defaza;

Mod de lucru

Cultura 3D se obtine prin inglobarea a $7x10^5$ cel/ml intr-o solutie 1.5% de alginat in ser fiziologic, cu $(0.7•10^{-7}$ mol/l sau fara levan. Aceasta suspensie celulara este mentinuta in contact cu un agent in inretelare timp de 1h, in conditii standard de incubare.

Constructul astfel obtinute este spalat in ser fiziologic si incubat 48h in mediu de cultura. Dupa acest interval, mediul de cultura este schimbat cu un mediu de inductie adipogenica, care contine 1 μM Insulina (Sigma-Aldrich, cod I5500-500MG) şi 1 μg/ml Triglitazonă (Sigma-Aldrich, cod T2573-5MG) pentru primele 3 zile de inductie şi 1 μM Insulina (Sigma-Aldrich, cod I5500-500MG) şi 0.2 mM 3,3',5 - Tri-iodo-tirozină (Sigma-Aldrich, cod T2877-100MG), pentru următoarele 12 zile de diferenţiere.

La 3,7,10,15 si 21 zile de inductie adipogenica au fost efectuate teste histologice (coloratia cu Oil Red O) pentru evidentierea acumularii intracelulare de lipide. Evidentierea s-a facut cu ajutorul unui microscop inversat, prin vizualizare in contrast de faza.

Interpretarea rezultatelor

Se observa ca in primele 48h de la insamantare, densitatea celulara in constructul fara levan este mai mica decat in cel cu levan, ceea ce confirma datele de proliferare obtinute. Acest lucru reprezinta un avantaj deoarece in momentul adaugarii mediului de inductie, in construct exista un numar mai mare de celule disponibile pentru diferentiere adipogenica decat in control.

Mai mult, in cazul sistemului in care exista si levan, se observa ca acumularile lipidice apar mult mai devreme, la 7 zile, fata de 15 zile in control, pentru ca la sfarsitul perioadei de testare in construct sa existe mai multe celule diferentiate.

Bibliografie

Andersone, I., Auzina, L., Mutere, O., Zikmanis, P. Engineering in Life Sciences. 2004, 4, 56-59.
Awika J.M., L.W. Rooney, R.D. Waniska, (2004) *J Agric Food Chem.* 52, 4388-4394
Awika JM, McDonough CM, Rooney LW. (2005) J Agric Food Chem. 53:6230-6234.
Bekers M., A. Vigants, J. Laukevics, M. Toma, A. Rapoports, P. Zikmanis (2000) *Intl. J. Food Microbiol.* 55, 147-150
Bekers M., M. Grube, L. Vulfa, D. Upite, E. Kaminska, R. Scherbaka, A. Vigants, A. Danilevich (2002) *Food Technol. Biotechnol.* 40, 305-310
Blake J.D., M.L. Clarke, P.E. Jansson, K.E. McNeil (1982) *J. Bacteriol.* 151, 1595-1597
Calazans G.M.T., C.E. Lopes, R.M.O.C. Lima, F.P. de Franca (1997) *Biotechnol Lett* 19, 19-24
Calazans, G. M. T., R. C. Lima, F. P. de Franca, C.E. Lopes (2000) *Int J Biol Macromol* 27, 245-250
Costache M. PCCE 248/2010 Noi concepte si strategii pentru dezvoltarea cunoasterii unor noi structuri biocompatibile in bioinginerie. www.pcce248.weebly.com
Douka, E, A.I. Koukkou, G. Vartholomatos, S. Frillingos, E. M. Papamichael, C. Drainas (1999) *J Bacteriol.* 181, 4598-4604
Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. G., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Anal. Chem. 28:350-356.
Ernst M., N.J. Chatterton, P.A. Harrison, G. Matitschka (1998) *J. Plant. Physiol.* 153, 53-60
Galani I., Drainas, C., Tipas, M. A., Biotechnology Letters, 1985, 7, 9, 673-678.
Gogly, B., Groult, N., Hornebeck, W., Godeau, G., Pellat, B. (1998) Anal. Biochem. 255:211–216.
Grube M. , M. Bekers, D. Upite, E. Kaminska (2002) *Spectroscopy* 16, 289-296.
Hernandez L., J. Arrieta, C. Menendez, R. Vazquez, A. Coego, V. Suarez, G. Selman, M.F. Petit-Glatron, R. C. Chambert (1995) *Biochem. J.* 309, 113-118
Hettwer U., M. Gross, K. Rudolph (1995) *J. Bacteriol.* 177, 2834-2839
Kang E.J., S.O. Lee, J.D. Lee, T.H. Lee (1999) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, 263-268
Kasapis S., E.R. Morris, M. Gross, K. Rudolph (1994) *Carbohydr. Polymers* 23, 55-64
Kim K.H., C.B. Chung, Y.H. Kim, K.S. Kim, C.S. Han, C.H. Kim (2005) *J. Cosmet Sci.* 56(6), 395-406
Kim M. G., Kim H. C., Lee S. J., Song B. K., Rhee K. S., 2000. Enzyme Microbial Technol. 27 646-651.
Kirk L.A., H.W. Doelle (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 88-93
Leibovici J., Y. Stark (1985) *Cell. Mol.Biol.* 31, 337-341
Lombard, C., Saulnier, J., Wallach, J. (2005) Biochimie 87:265–272.
Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall. R.J. (1951) J Biol Chem. 193:265-275.
Monte A., R. Wendt, M. Rigo, (2005) *Rev. Cienc. Exat. Natur.* 7, 103-112
Monte Alegre, R., Wendt, R. Rigo, M. (2005) Levan production by isolated mutants of Zymomonas mobilis. Rev. Cienc. Exat. Natur. 7:103-112,
Muro, A. C., E. Rodriguez, C. M. Abate, F. Sineriz (2000) Biotechnol. Lett. 22, 1639-1642.
Otterlei, M., A., Sundan, G., Skjak-Braek, L., Ryan, O., Smidsrod, T. Espevik (1993) *Infect Immun* 61, 1917-1921.
Park S., G.Y.J. Choi (1991) *Kor J Appl Microb Biotechnol.* 19, 52-55
Park S.C., J. Baratti (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 542-549.
Ranatunga T.D., J. Jervis, R.F. Helm, J.D. McMillan, R.J. Wooley (2000) *Enzyme Microbial Technol.* 27, 240-247.
Reese, E.T., Avigada, G. Biochim. Biophys. Acta 1966, 113, 1, 79-83.
Reese, R. S., Smith, D. T., Li, D., Cashmer, B., Garner, W., Punch, J., Smith, Jr. D. J., J. Surg. Res. 1994, 56,162–167.
Rosell KG, D. Birkhed (1974) *ACTA Chem Scand* 28, 589-592.
Sreekumar O., B.S. Basappa (1992) *Biotechnol. Lett.* 14, 511-514.
Stark Y., J. Leibovici (1986) *Br J Exp Pathol* 67, 141-145.
Stoian G., G. Leurzeanu, V. Zaharescu, I. Iorgulescu, A. Dinischiotu, I. Tripsa, M. Costache, A. Perisinakis, C. Drainas. Proceedings of Balkan Scientific Conference of Biology, 19-21 May, Plovdiv, Bulgaria pag. 126-168, 2005.
Stoian, G. Proiect PN2 62068/2008-Zysoprod „Obţinerea unor fitopreparate, prebiotice şi biocombustibili prin prelucrarea complexă a sorgului zaharat". http://www.cnmp.ro:8083/pncdi2/program4/documente/2010/sedinta/rez/D6/62068.pdf
Stoian, G., G. Leurzeanu, V. Zaharescu, I. Iorgulescu, A. Dinischiotu, I. Tripsa, M. Costache, A. Perisinakis, C. Drainas. Proceedings of Balkan Scientific Conference of Biology, 19-21 May, Plovdiv, Bulgaria pag. 126-168, 2005.
Swings J, J. De Ley (1977) *Bacteriol Rev.* 41, 1-46
Tano M.S., J.B. Buzato, M.A.P.C. Celligoi (2000) *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43, 425-430
Van Handel, E. (1967) *Anal Biochem.* 19, 193-194

A-2011-01357--
08-12-2011

Vandera E., Rendesi G., Varsaki, A., Stoian G., Drainas, C., Perisynakis, A. 31st FEBS Congress „Molecules in Health and Disease", June, 24-29, Istanbul, Turkey PP-852, published in FEBS Lett. 580, 306; 2006;
Vigants A., P. Zikmanis, M. Bekers (1996) *Acta Biotechnol.* 16, 321-327
Vigants A., R. Kruce, M. Bekers, P. Zikmanis (1998) *Biotechnol. Lett.* 20, 1017-1019
Viikari L. (1984) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 252-255
Viikari L. (1988) *Crit. Rew. Biotechnol.* 7, 237-261
Vina I., A. Karsakevich, M. Bekers (2001) *J. Mol. Catalysis B: Enzym.* 11, 551-558
Visser J, A.G.J. Voragen (1996) *Elsevier Science* 173
Yamada H. In: Pectin and Pectinoses. Visser J, Voragen AGJ, editors. New York: Elsevier Science pag. 173, 1996.
Yamamoto Y., Y. Takashi, M. Kawano, M. Jizuka, T. Matsumoti, S. Seiki, H. Yamaguchi. (1999) *J.Nutr. Biochem.* 10, 13-18
Yoo S.H., E.J. Yoon, J. Cha, H.G. Lee (2004) *Int J Biol Macromol.* 34, 37-41
Yun J. (1996) *Enzyme Microbiol. Technol.* 19, 107-117.

a-2011-01357--
08-12-2011

Revendicări

1. Utilizarea extractului de sorg zaharat (*Sorghum bicolor var. Saccharum*) la obținerea de levan prin fermentație produsă de către bacteria Gram negativă *Zymomonas mobilis.* Aceasta cuprinde tehnologia de creștere pe mediu solid și lichid, în absența unor adaosuri de săruri minerale ori factori de creștere.
2. Metoda de activare a metaloproteinazelor matriciale din țesuturi arse sau rănite de către levan, aceasta fiind caracterizată prin aceea că este realizată ăn două etape:
    a. Incubarea extractului proteic cu o soluție de levan
    b. Separarea electroforetică a metaloproteinazelor matriciale din țesuturi arse sau rănite și analiza lor.
3. Metoda pentru promovarea proliferarii celulare in cazul fibroblastelor dermale, cu aplicatii cosmetice si in chirurgia plastica si reparatorie **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde următoarele etape:
    a. inglobarea unei solutii de levan pentru a ajunge la o conc finala de $0.7 \cdot 10^{-7}$ mol/l intr-un produs cosmetic
    b. aplicarea produsului pe piele in vederea grabirii procesului de vindecare a ranilor prin promovarea proliferarii celulare.
4. Metoda pentru reconstructia tesutului adipos prin aplicatii in chirurgia plastica si reparatorie **caracterizat prin aceea că** acesta cuprinde următoarele etape:
    a. prelevarea de tesut adipos subcutanat de la pacient prin liposuctie (metoda putin invaziva)
    b. izolarea de hADSC din lipoaspirat
    c. realizarea unei culturi 3D prin inglobarea celulelor stem izolate de la pacient intr-un polimer natural, biocompatibil si biodegradabil in prezenta unei solutii de levan de conc $0.7 \cdot 10^{-7}$ mol/l
    d. incubarea constructului timp de 48h in conditii standard de cultivare pentru permiterea proliferarii celulare
    e. inductia adipogenezei prin incubarea constructului cu un cocktail de inductie
    f. implantarea constructului in locul leziunii, urmata de continuarea procesului de diferentiere adipogenica si degradarea naturala a suportului in organism.

0-2011-01357--
08-12-2011

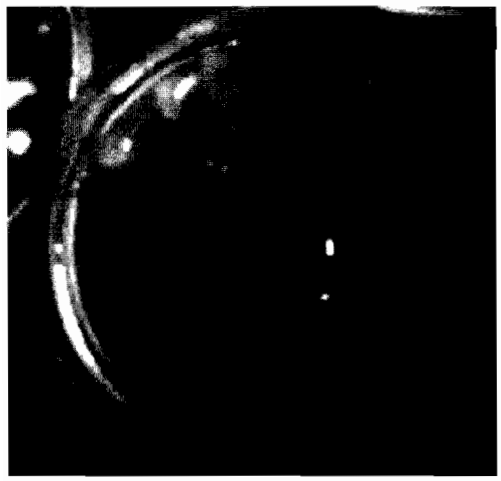

Fig. 1.

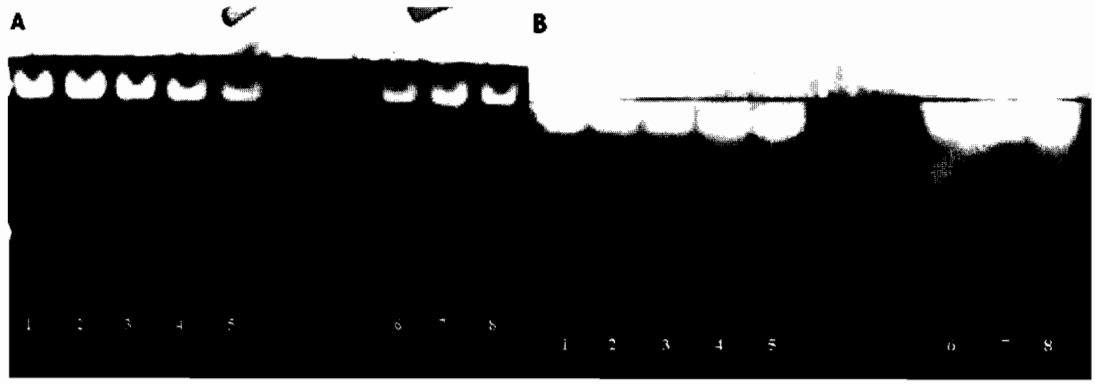

Fig. 2.

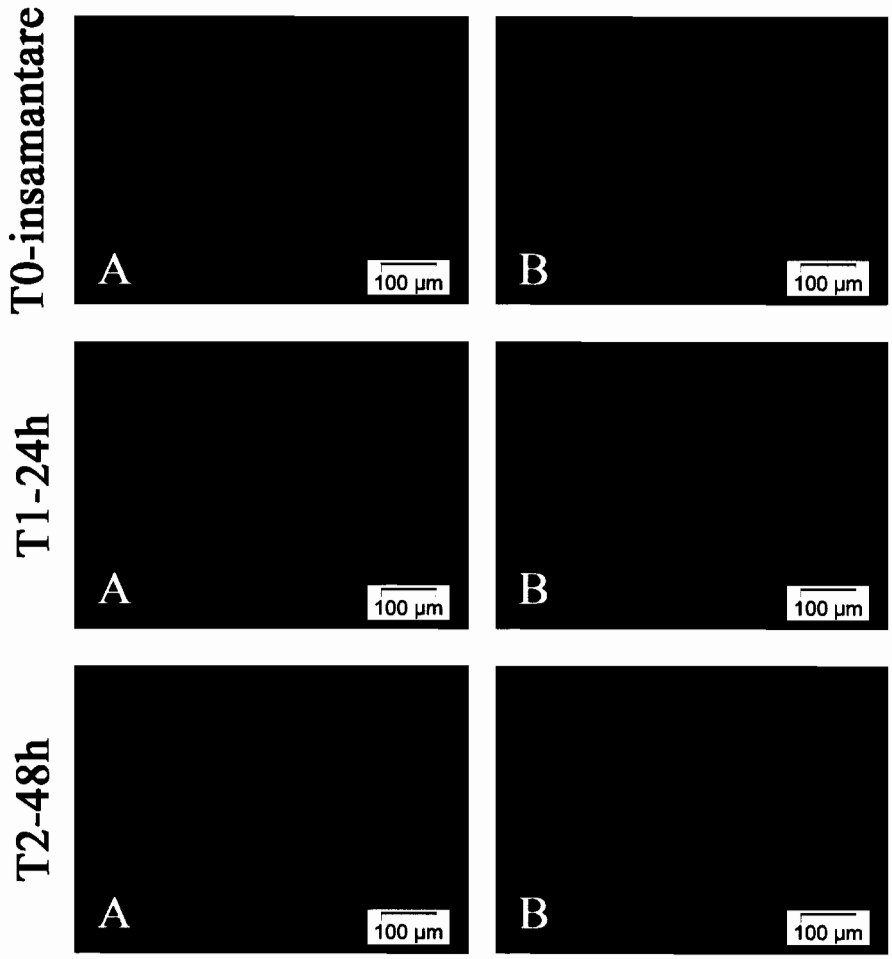

Fig. 3.

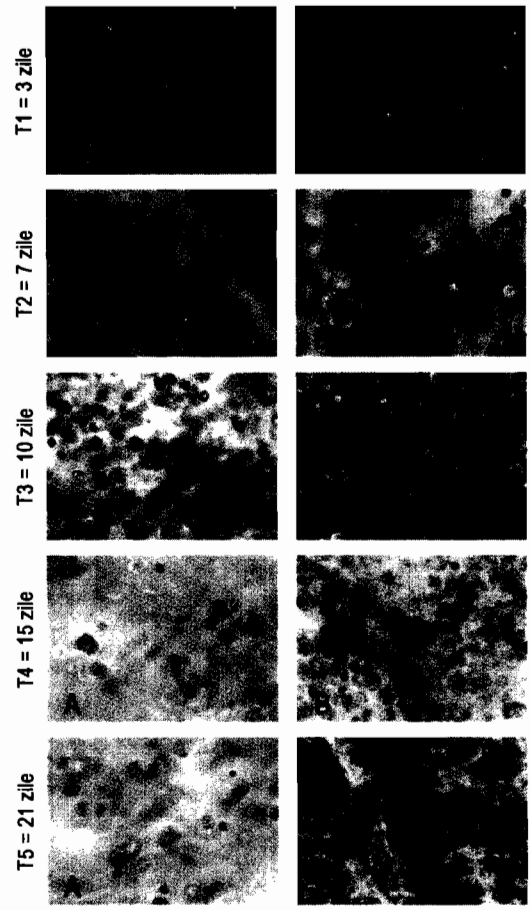

Fig. 4.