



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2022 00525**

(22) Data de depozit: **29/08/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2023 BOPI nr. **1/2023**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **POP SEVINCI, STR. POIANA, NR. 4, AP. 12,
SIBIU, SB, RO;**
• **TĂNASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR. 126, BL. P 34,
SC. 1, AP. 30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **CODRICI ELENA,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 4,
BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ENCIU ANA-MARIA, STR. PLUGARILOR,
NR. 1, BL. 94, SC. A, AP. 15, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ALBULESCU LUCIAN,
STR. ROȘIA MONTANĂ NR. 6, BL. 07,
SC. C, ET. 2, AP. 125, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POPESCU IONELA DANIELA,
BD. THEODOR PALLADY, NR. 4, BL. M2,
SC. A, AP. 28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **PRISTAVU MIRCEA COSMIN,
BD. LIBERTĂȚII, NR. 2, BL. 11, SC. C, AP. 12,
PITEȘTI, AG, RO;**
• **MORARU ANGELA, STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MORARU IONUȚ, STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **METODE DE STABILIRE A UNUI SET DE PARAMETRI
PRIVIND EVALUAREA PE MODELE *IN VITRO* A
BIOSIGURANȚEI ȘI A CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE
ȘI ANTIINFLAMATORII A UNUI BIOPRODUS DE POLEN
POLIFLOR FERMENTAT**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de evaluare a biosiguranței și a capacității antioxidante și anti-inflamatorii a unui bioprodus de polen poliflor fermentat. Metoda, conform invenției, constă în etapele: evaluarea pe modele *in vitro* de linii celulare umane (monocite, celule hepatice normale și tumorale) a viabilității și proliferării celulare cu kit-ul MTS, măsurarea citotoxicității indusă de bioprodus cu kit-ul LDH, stabilirea capacității anti-

oxidante celulare, respectiv, a capacității de modulare a expresiei citokinelor în modele *in vitro*, rezultând un set de parametri ai bioprodusului analizat adecvat pentru utilizare ca produs terapeutic sau ca substanță activă în suplimente alimentare.

Revendicări: 4
Figuri: 10

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



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2022 525
Data depozit 29-08-2022	

44

METODE DE STABILIRE A UNUI SET DE PARAMETRI PRIVIND EVALUAREA PE MODELE IN VITRO A BIOSIGURANȚEI ȘI A CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE ȘI ANTIINFLAMATORII A UNUI BIOPRODUS DE POLEN POLIFLOR FERMENTAT

DESCRIERE

Prezenta invenție realizează o analiză complexă, combinând tehnologii moderne de evaluare a biosigurantei și eficacității antioxidante și antiinflamatorii a unui bioprodus de polen poliflor fermentat.

Preocupările cercetării biomedicale pe plan internațional se axează pe găsirea unor soluții preventive și terapeutice și de identificare și evaluare a noi mijloace de protecție, în vederea selectării de produși cu valențe terapeutice pentru clinică.

Polenul apicol este un amestec natural conținând nectar, polen floral, enzime și secreții salivare de la albine. Polenul apicol conține o gamă largă de metaboliți secundari, incluzând proteine, carbohidrați, acizi grași polinesaturați, vitamine, polifenoli, fitosteroli, enzime și coenzime [1]. Metaboliții secundari din polenul apicol au efect antibacterian, antioxidant, antitumoral, antifungic, antialergic, hepatoprotector și imunomodulator [2]. Polenul apicol a fost studiat pentru capacitatea sa de a combate anumite boli metabolice, precum diabet, obezitate, hiper-dislipidemie, precum și complicațiile cardiovasculare asociate [1]. Capacitatea antioxidantă a polenului apicol îmbunătățește procesul de conservare a alimentelor, prevenind oxidarea lipidelor [3]. Polifenolii din polenul albinelor au efect antioxidant și antiproliferativ, precum și capacitatea de a regla proliferarea celulară și de a induce apoptoza celulară [4].

Granulele de polen sunt greu digestibile, absorbția lor în corpul uman fiind redusă datorită învelișului extern format din exină, astfel compușii biologic activi nu sunt eliberați în cantitate mare după consum [5].

Procesul de fermentație al granulelor de polen crește biodisponibilitatea și concentrația componentelor bioactive, în special flavone și polifenoli, dar conduce și la îmbunătățirea calitativă a produsului final prin prezența de compuși noi: peptide, enzime, vitamine și bacterii benefice pentru organismul uman [6].

Eliberarea citokinelor este un proces crucial în dezvoltarea răspunsului imun. Sunt studii ce demonstrează că produsele naturale modulează citokinele, inclusiv IL-1p, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-18, IL-23 și IL-12 și interferon gamma [7].

Literatura de brevete evidențiază testari pe produse obținute pe baza de polen fermentat în moduri diferite, prezentând anumite proprietăți terapeutice, după cum urmează:

În brevetul RO 122619 B1, este prezentat un preparat pe bază de polen și fermentat cu bacterii *Lactobacillus* sp., care este asemănător cu păsturi având și proprietățile terapeutice ale unui produs probiotic prin aportul de aminoacizi, enzime și vitamine.

În cererea de brevet WO2020/016770 A1, *Microbiological process for the production of bee bread*, este descris un proces biotehnologic pentru obținerea de polen fermentat prin inocularea polenului cu cel puțin o bacterie lactică din specia *Lactobacillus kunkeei* și fermentarea polenului cu aceasta bacterie. Polenul fermentat obținut are proprietăți nutriționale și organoleptice similare cu păstura obținută în mod natural în fagurii de miere din stupi și are aplicații în alimentație și domeniul nutraceuticelor. În cererea de brevet sunt prezentate și două metode de evaluare a proprietăților biologice. Sunt descrise și metode de evaluare in vitro, pe culturi de keratinocite a proprietăților biologice ale polenului fermentat obținut, capacitatea antioxidantă celulară la inducerea stresului oxidativ cu H₂O₂ și potențialul anti-inflamator prin creșterea expresiei gene TNFα evaluată prin metoda qRT-PCR.

În cererea de brevet US2016/0193263A1, *Reaction platform and method for making pollen based materials and uses thereof*, este descrisă o platformă de reacție în 2 pași pentru a produce un extract pe bază de polen. În primul pas se deschid/germinează granulele de polen, tratând aceste granule cu unul sau mai componente selectate din ceara de albine, miere sau materiale conținând enzime, pentru a obține o masă gelatinoasă, iar în al doilea pas se încălzește acest jeleu într-un recipient închis pentru a obține un extract, ce poate fi fermentat. Acest extract poate fi folosit în formulări cosmetice sau nutraceutice și sunt descrise metode prin care acestea pot fi administrate.

Cererea de brevet CN103006709A, *Bee-pollen buccal tablet for preventing and treating alcoholic fatty liver*, este descrisă o tabletă orală pe baza unui extract apos din polen apicol folosită pentru a preveni steatoza hepatică. Tableta orală este preparată din liofilizatul extractului apos de polen apicol, din propolis, din praful rezultat în urma liofilizării lăptișorului de matcă, sortitol, stearat de magneziu și mentol, liofilizatul extractului apos de polen având molecule cu masa moleculară sub 5000 D.

De asemenea, sunt studii clinice cât și brevete în care este prezentat și rolul polenului de albine ca aliment suplimentar și ca produs potențial în aplicații cosmetice [8].

În brevetul CN 112245538 (*Traditional Chinese medicine composition, traditional Chinese medicine fermentation product containing traditional Chinese medicine composition, and preparation method and application of traditional Chinese medicine fermentation product*) este descris un produs fermentat folosit în medicina tradițională chineză și anume metoda de preparare, cât și aplicațiile acestuia. Compoziția cuprinde flori de cais, mazăre, orez negru și polen fermentat, toate ingredientele sunt în sinergie, produsul având efecte de albire și rezistență la oxidare, are iritabilitate scăzută și are o perspectivă largă de dezvoltare în domeniul cosmeticelor.

În brevetul CN 111773113 (*Freeze-dried essence facial mask and making technology thereof*), invenția constă în fabricarea unei măști faciale cu esență liofilizată și se referă la domeniul tehnic al produselor de îngrijire a pielii. Mască facială cu esență liofilizată constă din următoarele materii prime: drojdie, polen de albine fermentat, elastina, proteaza, extracte de membrană de coajă de ou, extracte de albuș de ou, extracte de propolis, gumă xantan, proteină din lapte, astaxantină, mătase naturală, ulei de portocale dulci, extracte de perle, extracte de ierburi și apă deionizată. Aceasta este potrivită pentru orice tip de piele, are efecte de albire, luminare a pistriilor, îndepărtare a melaninei, rezistență la îmbătrânire.

Invenția va fi în continuare ilustrată prin exemple, care au un caracter ilustrativ și nicidecum limitativ.

FIGURI

Figura 1. Citotoxicitatea și viabilitatea celulară la nivelul liniei celulare CRL-2706, de celule hepatice normale, după 48 și 72 de ore de tratament cu polen poliflor fermentat

Figura 2. Citotoxicitatea și viabilitatea celulară la nivelul liniei celulare HB-8065, de celule hepatocarcinom, după 48 și 72 de ore de tratament cu polen poliflor fermentat

Figura 3. Evaluarea viabilității celulare și a citotoxicității, la nivelul liniei celulare de monocite, după 48 de ore de tratament cu polen poliflor fermentat, D30.

Figura 4. Evaluarea viabilității celulare și a citotoxicității, la nivelul liniei celulare de monocite, după 48 de ore de tratament cu polen poliflor fermentat, D100.

Figura 5. Evaluarea viabilității celulare și a citotoxicității, la nivelul liniei celulare de monocite, după 72 de ore de tratament cu polen poliflor fermentat, D30.

Figura 6. Evaluarea viabilității celulare și a citotoxicității, la nivelul liniei celulare de monocite, după 72 de ore de tratament cu polen poliflor fermentat, D100.

Figura 7. Efectul antiproliferativ al polenului fermentat pe linia celulară de hepatocarcinom monitorizat în timp real

Figura 8. Capacitatea antioxidantă celulară a probelor evaluată pe celule de hepatocarcinom, exprimată în unități relative de fluorescență (URF)

Figura 9. Capacitatea antioxidantă celulară a polenului poliflor fermentat la concentrația de 5 mg/ml, exprimată în unități de Activitatea Celulară Antioxidantă (ACA)

Figura 10. Modularea expresiei citokinelor secretate la 4 (a), respectiv 18 ore (b) de tratament a celulelor cu bioprodusul PPF, furnizat de agentul economic, pe linia celulară de monocite.

Se dau în continuare exemple de aplicare a invenției

Exemplul 1. Metodologia de obținere a preparatului de polen poliflor fermentat

Preparatul de polen poliflor fermentat s-a obținut conform metodologiei prezentate în cererea de brevet de invenție depusă la OSIM (Moraru Ionuț, Moraru Angela, Oancea Florin, Procedeu de creștere a biodisponibilității ingredientelor active din materialul vegetal cu un conținut ridicat de Siliciu, RO 132524 A2). Polenul poliflor fermentat este un preparat original al companiei Laboratoarele Medica și se comercializează ca supliment alimentar sub denumirea Amrita 3xBiotics, fiind prezent și în compoziția produselor din gama 3xBiotics.

Metodologia de obținere a polenului poliflor fermentat cuprinde următoarele etape:

- trecerea unei soluției de apă și granulelor de polen poliflor prin 3 cicluri de încălzire la temperatura de 70-75°C, urmată de răcirea la temperatura camerei sub amestecare constantă;
- etapa următoare este de fermentare a soluției de apă și granule de polen în prezența unei infuzii de Ceai verde (*Camellia sinensis*), soluție de glucoză 25% și a unei culturi simbiotice de drojdii și bacterii (*Kombucha*) pentru distrugerea învelișului de exină al granulelor de polen și eliberarea substanțelor bioactive;
- fermentarea are loc la temperatura camerei în condiții de microaerofilie, timp de 10 zile;
- după procesul de fermentare, produsul obținut se omogenizează și se amestecă cu maltodextrină, iar suspensia fluidă, omogenă rezultată este uscată prin pulverizare (atomizare) la o temperatură de intrare a probei de 120-140°C și la o temperatură de ieșire de 70-75°C, folosind un atomizor de tip INTELPAK LGP 5;
- pulberea obținută în urma procesului de atomizare, se analizează pentru determinarea proprietăților fizico-chimice: pH, proprietățile organoleptice, determinarea umidității & procentul de cenușă
- 5 g de polen poliflor fermentat atomizat au fost dizolvate în 10 ml de tampon fosfat salin PBS, pH=7.4, și apoi soluția a fost filtrată steril prin membrane de 0,2 microni.

Exemplul 2. Metodă de evaluare a biosiguranței polenului poliflor fermentat atomizat pe modele *in vitro*

Pentru stabilirea biosiguranței produsului s-au evaluat următorii parametri: viabilitatea/proliferarea celulelor normale și tumorale în prezența produsului și potențialul citotoxic al produsului pe modele *in vitro*.

S-au ales **trei modele *in vitro* de linii celulare umane: monocite, celule hepatice normale și celule hepatice tumorale**. Evaluarea viabilității/proliferării celulelor în prezența produsului de polen poliflor fermentat (PPF) s-a realizat conform ISO 10993-12:2012 „Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials”.

Model *in vitro* de celule hepatice normale, imortalizate, umane: linia de celule epiteliale de ficat, CRL-2706, culturile de celule au fost crescute și propagate în mediul de cultură de tip LHC-8, la care s-a adăugat 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic-antimicotic, 5 ng/mL proteină umană factor de creștere epidermal (EGF) și 70 ng/mL fosfoetanolamină.

Model in vitro de celule hepatice umane, tumorale: linia de celule de carcinom hepatic uman, HB-8065, crescute în mediu de tip Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), suplimentat cu 2 mM glutamină, 1% aminoacizi non-esențiali (NEAA) și 1mM piruvat de sodiu, la care se adaugă cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotic-antimicotic.

Culturile celulare au fost incubate la 37°C și în atmosferă de 5% CO₂, iar experimentele s-au realizat pornind de la o densitate celulară de 10000 celule, timp de 48 ore și 72 ore de tratament cu soluții de PPF la diferite diluții de D10, D30, D100 și D300 din soluția stock de 0,5g/ml. Toate probele/controalele au fost lucrate în triplicat. Propagarea și întreținerea culturilor celulare s-a realizat în flask-uri de 25 cm², experimentele s-au derulat în plăci cu 96 godeuri.

Model in vitro de celule pe linia celulară de monocite/macrofage (ATCC CTR-9855TM) pentru realizarea studiilor de viabilitate/proliferație și toxicitate celulară au fost realizate.

Propagarea și întreținerea culturilor celulare de monocite/macrofage a fost realizată în flask-uri cu suprafața de 25 cm², în mediu complet de cultură Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic-antimicotic, 1% supliment 0,1 mM hipoxantina și 0,016 mM timidină (HT) și 0,1% β-mercaptoetanol.

Pentru realizarea testelor proliferație (MTS) și citotoxicitate (LDH) culturile celulare de monocite au fost însămânțate la densitatea de 10000 celule/godeu, în plăci de 96 de godeuri, incubate la 37°C și atmosfera cu 5% CO₂, cu substanțele de testat, la diferite diluții (D10, D30, D100), timp de 48 și 72 de ore. Toate probele/controalele au fost lucrate în triplicat. Proba testată a fost reprezentată de polen poliflor fermentat (PPF).

Proliferația a fost evaluată cu kitul **CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (MTS)**, Promega, prin adăugarea a 20 μL reactiv/godeu, apoi, după o perioadă de incubare de 3 ore a fost citită densitatea optică (DO) la 490 nm. Numărul de celule viabile a fost proporțional cu DO citită.

Citotoxicitatea indusă de preparatul de polen poliflor fermentat a fost măsurată cu kitul **CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (LDH)**, Promega, prin măsurarea LDH-ului eliberat în mediul de cultură al celulelor tratate, și al controlului negativ, celule netratate. Controlul pozitiv este reprezentat de celule netratate care se lizează pentru a obține cantitatea maximă de LDH eliberată de celule. Se adaugă peste 50 μL de mediu de cultură din godeurile cu celule tratate, 50 μL substrat LDH, se lasă 30 de minute la întuneric pentru realizarea reacției, apoi reacția este oprită prin adăugarea a 50 μL de soluție stop. Se citește densitatea optică la lungimea de undă de 490 nm a soluțiilor de probe, controlul negativ și a controlului pozitiv. Citotoxicitatea exprimată în procente (citotoxicitate %) se calculează prin următoarea ecuație:

Citotoxicitate % = 100 × Eliberarea LDH experimentală/Eliberarea maximă a LDH

Valorile experimentale obținute pentru eliberarea LDH la soluțiile de probă reprezintă citotoxicitate ireversibilă indusă de tratamentul aplicat celulelor.

Prepararea probelor și controalelor s-a efectuat conform și ISO 10993-5:2009 „Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity”.

Menționăm că **pentru toate tipurile de celule, polenul poliflor fermentat la D10 a prezentat citotoxicitate mare**, fiind afectată viabilitatea celulelor în proporție foarte mare.

În urma realizării testului MTS, pentru **celulele normale de ficat**, tratate cu polen poliflor fermentat timp de 48, respectiv 72 de ore și la diluțiile D30, D100 și D300 s-au obținut rezultatele prezentate în figura 1. Pentru diluția D30 la 48 de ore de tratament avem o scădere cu 50% a celulelor viabile, iar pentru 72 de ore de tratament scăderea este de aproximativ 26 % a celulelor viabile comparativ cu celulele netratate. Pentru celelalte două diluții D100 și D300, viabilitatea celulelor normale de ficat a fost mai puțin afectată fiind în parametrii de aproximativ 83-85% pentru 72 de ore de tratament și 75-79% pentru 48 de ore de tratament.

Citotoxicitatea indusă de tratamentul cu polen poliflor fermentat pe celulele normale de ficat este prezentată în **Figura 1**. Se poate observa că pentru diluția de D30 avem o citotoxicitate mai mare decât la celulele control netratate la ambii timpi de tratament aplicați (48 și 72 de ore). Pentru celelalte diluții valorile LDH-ului eliberat la tratament sunt asemănătoare cu cele prezentate de celulele control, netratate.

În concluzie, pentru tratamentul cu polen poliflor fermentat la diluțiile de D100 și D300, celulele normale de ficat nu sunt afectate, obținându-se valori 85-88% pentru viabilitate celulară la 72 de ore de tratament și valori pentru citotoxicitate apropiate de cele pentru controlul negativ, celule netratate.

În urma realizării testului MTS pe **celulele de hepatocarcinom** incubate 48 și 72 de ore cu soluție de polen poliflor fermentat la D30 au fost obținute valori mai mici decât cele obținute la tratamentul pe celule normale de ficat. La celelalte două diluții valorile obținute la 48 de ore au fost de asemenea mai mici decât cele obținute la tratarea celulelor normale de ficat. Pentru tratamentul de 72 de ore tratamentul la D100 și D300 nu a redus viabilitatea celulară comparativ cu celulele control, netratate. Rezultatele de citotoxicitate și viabilitate celulară obținute la tratamentul cu polen poliflor fermentat pe celule de hepatocarcinom uman sunt prezentate în **Figura 2**. La diluția D30 se observă o valoare de 2 ori mai mare a LDH eliberat la tratamentul comparativ cu celulele netratate, controlul negativ. Pentru D100, valoarea LDH eliberat la 48 de ore este de 1.75 ori mai mare decât la celulele netratate. Pentru 72 de ore de tratament, valorile de citotoxicitate nu sunt semnificativ mai mari. Pentru celulele normale de ficat, cantitatea de LDH eliberat comparată cu celulele control, netratate fiind aproape egală.

Datele obținute până în prezent indică existența unor efecte citotoxice relativ scăzute la concentrațiile cele mai mici ale polenului poliflor fermentat pe celule normale de ficat, iar pentru celulele de hepatocarcinom la aceleași concentrații se observă o citotoxicitate mai ridicată.

Rezultatele conduc la concluzia ca polenul poliflor fermentat poate fi considerat un terapeutic produs conform invenției, și are o toxicitate redusă pe celule normale putând fi utilizat fără riscuri ca substanță activă pentru suplimente alimentare.

Viabilitate celulară a **monocitelor**, cuantificată după 48 de ore de incubare cu produsul diluat de 30 ori (D30) a fost mai scăzută, astfel, în această situație experimentală fiind înregistrate viabilități sub 85 % pentru produsul analizat. Eliberarea de LDH nu a depășit valoarea controlului, cel mai probabil din cauza numărului mic de celule, existente la această concentrație (**Figura 3**). În urma realizării testelor de viabilitate celulară la 48 de ore, pentru diluția 100 (D100) au fost înregistrate valori de peste 90% pentru proba analizată, iar în urma realizării testelor de citotoxicitate valorile obținute au fost de până în 6% (**Figura 4**), fiind sub valorile înregistrate în cazul controlului. În concluzie, la 48 de ore, viabilitatea celulară de peste 85%, respectiv citotoxicitatea sub 15% a

polenului poliflor fermentat, în diluție 10x a fost conformă pentru a considera acest produs ca fiind lipsit de toxicitate.

Viabilitate celulară, cuantificată după 72 de ore de incubare a **monocitelor**, cu produsul diluat de 30 ori (D30) a fost mult mai scăzută, în comparație cu rezultatele obținute la 48 de ore, în acest caz fiind înregistrată o viabilitate sub 50% pentru produsul analizat. La fel ca la 48 de ore, și în această situație, eliberarea de LDH nu a depășit valoarea controlului din cauza numărului mic de celule existente (**Figura 5**). Atunci când a fost realizat testul de viabilitate celulară la 72 de ore, pentru diluția 100 (D100) au fost înregistrate valori de peste 85% pentru proba analizată, iar în urma realizării testelor de citotoxicitate valorile obținute au fost de până în 10% (**Figura 6**), LDH fiind sub valorile înregistrate în cazul controlului. În concluzie, prin testul de viabilitate celulară realizat după 72 de ore de incubare a monocitelor cu produsele diluate de 100 ori (D100) au fost obținute valori de peste 85% pentru proba analizată, iar în urma realizării testelor de citotoxicitate valorile obținute au fost de până în 15%, ceea ce indică lipsa de toxicitate a acestui produs, la această diluție. Prin urmare, datele obținute până în prezent nu indică existența unor efecte citotoxice la diluție 100 pentru produsul analizat, astfel decidându-se realizarea experimentelor de evaluare a efectelor anti-inflamatoare începând cu această diluție.

Exemplul 3. Metodă de evaluare a activității antiproliferative a polenului poliflor fermentat pe culturi de celule de hepatocarcinom uman

Efectul antiproliferativ al produsului a fost testat pe platforma xCELLigence care monitorizează în timp real impedanța celulară exprimată în indice celular. Acest indice celular se modifică atunci când celulele sunt afectate de tratament, valoarea indicelui celular fiind direct proporțională cu numărul de celule aderate pe godeu-ul plăcii de măsurare. Un număr de 10000 de celule de hepatocarcinom au fost însămânțate pe godeurile plăcilor de tip E-16 și lăsate să adere timp de 24 de ore. Apoi a fost aplicat tratamentul cu diluții diferite de soluție de polen poliflor fermentat (D30, D100 și D300), iar celulele au fost monitorizate timp de 6 zile, indicele celular fiind înregistrat la fiecare 30 de minute. Celulele netratate au reprezentat controlul negativ.

Se pot observa în **figura 7** curbele de proliferare ale celulelor de hepatocarcinom aflate sub tratament. Efectul antiproliferativ cel mai pronunțat se observă la celulele tratate cu D30, unde indicele celular normalizat are valori mult mai mici decât cele înregistrate la celulele control netratate pe toată perioada de timp de monitorizare. Pentru D100 și D300 curbele de proliferare indică tot un efect antiproliferativ al soluțiilor de polen fermentat, comparativ cu celulele netratate. Rezultatele evidențiază activitatea antiproliferativă a polenului fermentat pe celulele tumorale de carcinom hepatic la toate diluțiile testate.

Exemplul 4. Metodă de evaluare a activității antioxidante pe culturi de celule de hepatocarcinom uman

Pentru testarea activității celulare antioxidante a polenului poliflor fermentat s-a lucrat pe linia celulară de carcinom hepatic HepG2, folosindu-se testarea OxiSelect™ Celular Antioxidant Kit - CAA (Green Fluorescence) de la CellBiolabs. Metoda de evaluare a fost descrisă de Wolfe KL, Liu RH [9] și se bazează pe evaluarea activității antioxidante prin măsurarea fluorescenței emise de un colorant care poate penetra membrana celulară: 2', 7'-Dichlorodihidrofluorescin diacetat (DCFH-DA). Acest colorant, pătrunde în citoplasma celulară și este deacetilat de esterazele celulare la 2', 7'-diclorodihidrofluorescină neinfluentă (DCFH), care este apoi rapid oxidată de

radicalii liberi din celulă la 2', 7'-diclorodihidrofluorescein (DCF), un produs cu un semnal de fluorescență foarte ridicat. Intensitatea fluorescenței acestui produs este proporțională cu nivelurile de specii reactive de oxigen (SRO) din celule. Efectul diferiților compuși antioxidanți asupra formării DCF poate fi măsurat și comparat cu un compus standard cu acțiune antioxidantă Quercetina. Celulele de hepatocarcinom, 600000 celule/godeu sunt lăsate să adere peste noapte, după care se adaugă 50 μl de soluție de DCFH-DA și 50 μl de soluție de polen poliflor fermentat, D100. Placa cu 96 de godeuri de fluorescență este lăsată la incubator timp de 1 oră, după care se îndepărtează cei 100 μl de tratament și se adaugă 100 μl de soluție de inițiator de radicali de oxigen. Godeurile considerate blankuri sunt cu celule tratate cu DCFH-DA și probe, dar fără soluție de inițiator de radicali liberi, se vor adauga 100 μl de tampon fosfat salin, pH=7.4. Soluția de inițiator de radicali de oxigen produce radicali liberi în celule, care transformă compusul DCFH-DA în DCF, compus ce emite un semnal de fluorescență foarte puternic. Quercetina, controlul pozitiv inhibă formarea radicalilor liberi și deci formarea DCF, într-o manieră dependentă de concentrație. Activitatea antioxidantă a polenului poliflor fermentat se va compara cu activitatea soluției de Quercetină. Citirile s-au realizat pe un fluorimetrul prevăzut cu filtre pentru citiri la lungime de undă de 480 nm (excitare) și 530 nm (emisie), iar citirile s-au efectuat timp de 1 oră, la fiecare 5 minute conform metodei [9]. Probele s-au lucrat în triplicați. Valorile citirilor obținute pentru probe au fost normalizate cu valorile blank-urile, citirile realizate pe celulele tratate cu polen poliflor fermentat dar fără inițiatorul de radicali de oxigen, care vor fi scăzute din citirile realizate pentru godeurile cu celulele tratate cu polen poliflor fermentat, în prezența inițiatorului de radicali de oxigen.

În **figurile 8 și 9** sunt reprezentate valorile obținute la citirile realizate pe celule HepG2 tratate cu probele care au prezentat activitate antioxidantă celulară. Se poate observa că în cazul celulelor controlul, fără adaos de compus antioxidant, valorile la citirile de fluorescență (URF) sunt cele mai mari, speciile reactive de oxigen neputând fi reduse, compusul de tip DCF se formează și emite fluorescență. Pentru celulele tratate cu compuși cu diferite grade de activitate anti-oxidantă valorile încep să scadă, iar pentru Quercetina 250 μM s-au obținut cele mai mici valori la citirile de fluorescență, fiind un antioxidant puternic. Odată cu creșterea concentrației de antioxidant, scade și semnalul de fluorescență a soluției. Pentru soluția de polen poliflor fermentat, D100 se poate observa ca are capacitate antioxidantă celulară valorile relative de fluorescență fiind mai mici decât cele înregistrate la celulele netratate. Dacă se compară valorile obținute la polenul poliflor fermentat cu valorile obținute la proba control de Quercetină 250 μM (**figura 9**), se observă că aceasta prezintă o capacitate antioxidantă celulară cu aproximativ 60% mai redusă decât soluția de Quercetină.

Se poate afirma că polenul poliflor fermentat are activitate antioxidantă celulară, și deci se poate folosi ca supliment alimentar antioxidant.

Exemplul 5. Evaluarea efectelor anti-inflamatoare

Modelul experimental de inflamație a fost derulat pe linia celulară ATCC CRL-9855, linie de monocite/macrofage umane. Realizarea culturile celulare a avut loc în mediu complet de cultură Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) ajustat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic-antimicotic, 1% supliment 0,1 mM hipoxantina și 0,016 mM timidina (HT), precum și 0,1% β-mercaptoetanol. Culturile celulare au fost incubate la 37°C și în atmosferă de 5% CO₂. Propagarea și întreținerea culturilor celulare s-a realizat în flask-uri de 25 cm², experimentele s-au derulat în plăci cu 24 godeuri, cu o densitate de 100.000 celule (la inițiere). În urma realizării testelor de

viabilitate și citotoxicitate celulară s-a decis ca diluțiile 100 (D100) și 300 (D300) să fie analizate pentru polenul poliflor fermentat (PPF), în vederea evaluării răspunsului anti-inflamator.

Modelul anti-inflamator a fost realizat prin adăugarea peste celule a substanței de testat, respectiv a substanțelor control. Supernatantul a fost recoltat la 4 și respectiv 18 ore de la adăugarea substanțelor. Controalele testului de evaluare a răspunsului anti-inflamator au fost reprezentate de:

- celule netratate,
- celule tratate cu LPS – 50 ng/mL (control pozitiv al procesului inflamator),
- celule tratate cu dexametazonă – 40 ng/mL (control negativ al procesului inflamator). Toate probele/controalele au fost lucrate în duplicat. Probele au fost recoltate, păstrate la -80°C până la analiza xMAP.

Din probele prelevate au fost analizate sub-probe (alicate) prin metoda xMAP – platforma Luminex200 (Luminex Corp, Austin, TX 78727, USA). În vederea analizei, s-a utilizat kitul multiplex Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, HCYTOMAG-60K (Merck-Millipore, Billerica, MA 01821, USA) cu următorii analiți: GMCSF, GRO, IL1a, IL4, IL6, IL8, IP10, MCP1, TNF a, VEGF A, conform instrucțiunilor producătorului. Cuantificarea analiților a fost realizată pe platforma de multiplexare Luminex200, cu softul xPONENT 4.2. Au fost analizate intensitățile fluorescențe medii (MFI) utilizând curba 5-Parameter Logistics pe platforma multiplex Luminex200. Nivelul de expresie a moleculelor analizate simultan a fost obținut prin interpolarea valorilor MFI rezultate în urma achiziției probelor pe curbe generate de software-ul xPONENT 4.2. Pentru toate curbele 5-PL, coeficientul de regresie (R^2) a prezentat valori apropiate de 1.

Supernatantul a fost recoltat după tratarea monocitelor timp de 4 ore, respectiv 18 ore cu PPF, produs de agentul economic, în diluție 100, respectiv 300, precum și controale.

Atunci când a fost realizat raportul între expresia citokinelor din probele analizate și expresia citokinelor din controlul netratat, s-au constatat următoarele:

- la 4 ore de tratament, raportul obținut în cazul moleculelor GRO, IL6, IL-8, MCP1 a fost sub nivelul raportului obținut între proba tratată cu LPS+Dexa/control, acesta fiind de 3,8 (GRO), 1,1 (IL-6), 5,8 (IL-8) și 1,3 (MCP1). Astfel, la D100 a PPF raportul pentru GRO, IL-6, MCP1 a fost de 1, în timp ce pentru IL-8 acest raport a fost de 1,7. La D300 a PPF raportul pentru GRO a fost de 0,9, pentru IL-6 a fost de 1, pentru MCP1 a fost de 1,2, iar pentru IL8 acest raport a fost de 1,5. Toate aceste date indica un moderat efect anti-inflamator pentru bioprodusul analizat (Figura 10a)
- la 18 ore de tratament, pentru majoritatea moleculelor enumerate mai sus s-a menținut un raport sub nivelul celui obținut între proba tratată cu LPS+Dexa/control, acesta fiind de 4,5 pentru GRO, 4,4 pentru IL-6, 8 pentru IL-8 și 3,4 pentru MCP1. În această situație experimentală, la D100 a bioprodusului raportul obținut a fost de 3,6 pentru GRO, respectiv 4,1 pentru IL-6. La D300 a PPF raportul pentru GRO a fost de 1,2, pentru IL-6 a fost de 3,1, pentru MCP1 a fost de 2,2, iar pentru IL-8 acest raport a fost de 3,9. Aceste rezultate indică de asemenea un moderat efect anti-inflamator pentru bioprodusul analizat (Figura 10b).

În concluzie, în urma analizei xMAP s-a identificat o semnătură moleculară caracterizată prin modularea eliberării de citokine, respectiv scăderea moderată a eliberării unor citokine pro-inflamatoare de către substanța de testat.

Bibliografie:

1. Khalifa SAM, Elashal MH, Yosri N, *et al.* Bee Pollen: Current Status and Therapeutic Potential. *Nutrients*. 2021;13(6). Epub 2021/06/03.
2. Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the science of food and agriculture*. 2016;96(13):4303-9. Epub 2016/03/26.
3. Almeida JdF, Reis ASd, Heldt LFS, *et al.* Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT - Food Science and Technology*. 2017;76:299-305.
4. Wan Omar WA, Azhar NA, Harif Fadzilah N, *et al.* Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6(3):265-9.
5. Aylanc V, Falcão SI, Ertosun S, *et al.* From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;109:464-81.
6. Barta DG, Cornea-Cipcigan M, Margaoan R, *et al.* Biotechnological Processes Simulating the Natural Fermentation Process of Bee Bread and Therapeutic Properties—An Overview. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9.
7. Gandhi GR, Antony PJ, Lana MJMdp, *et al.* Natural products modulating interleukins and other inflammatory mediators in tumor-bearing animals: A systematic review. *Phytomedicine*. 2022;100:154038.
8. Algethami JS, El-Wahed AAA, Elashal MH, *et al.* Bee Pollen: Clinical Trials and Patent Applications. *Nutrients*. 2022;14(14):2858.
9. Wolfe KL, Liu RH. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(22):8896-907.

Revendicări

1. Procedeu/metoda de evaluare a biosiguranței produsului de polen poliflor fermentat, care stabilește gradul de citotoxicitate și efectul acestuia asupra viabilității celulelor umane normale, *in vitro*, **caracterizat prin aceea că**:
 - bioprodusul nu prezintă citotoxicitate semnificativă și nu afectează viabilitatea celulelor normale de ficat la concentrațiile de 5mg/mL...0,5 mg/mL;
 - bioprodusul nu prezintă citotoxicitate și nu afectează viabilitatea celulelor de monocite umane normale la concentrații sub 1,66 mg/mL;
2. Procedeu/metodă de stabilire a activității antiproliferative a bioprodusului, **caracterizat prin aceea că** stabilește efectul antiproliferativ al bioprodusului prin monitorizarea în timp real, pe celulele de hepatocarcinom uman, în intervalul 50 mg/mL ... 0,5 mg/mL.
3. Procedeu/metoda de stabilire a capacității antioxidante celulare a produsului de polen poliflor fermentat, **caracterizat prin aceea că** stabilește capacitatea antioxidantă celulară a bioprodusului pe celule de hepatocarcinom uman sub 5 mg/mL.
4. Procedeu/metodă de stabilire a capacității de modulare a expresiei citokinelor a produsului de polen poliflor fermentat, **caracterizat prin aceea că** moleculele GRO, IL6, IL-8 și MCP1, la 4, respectiv 18 ore au prezentat o expresie comparabilă cu cea a controlului negativ, aceste rezultate indicând un moderat efect anti-inflamator pentru bioprodusul analizat.

Figura 1

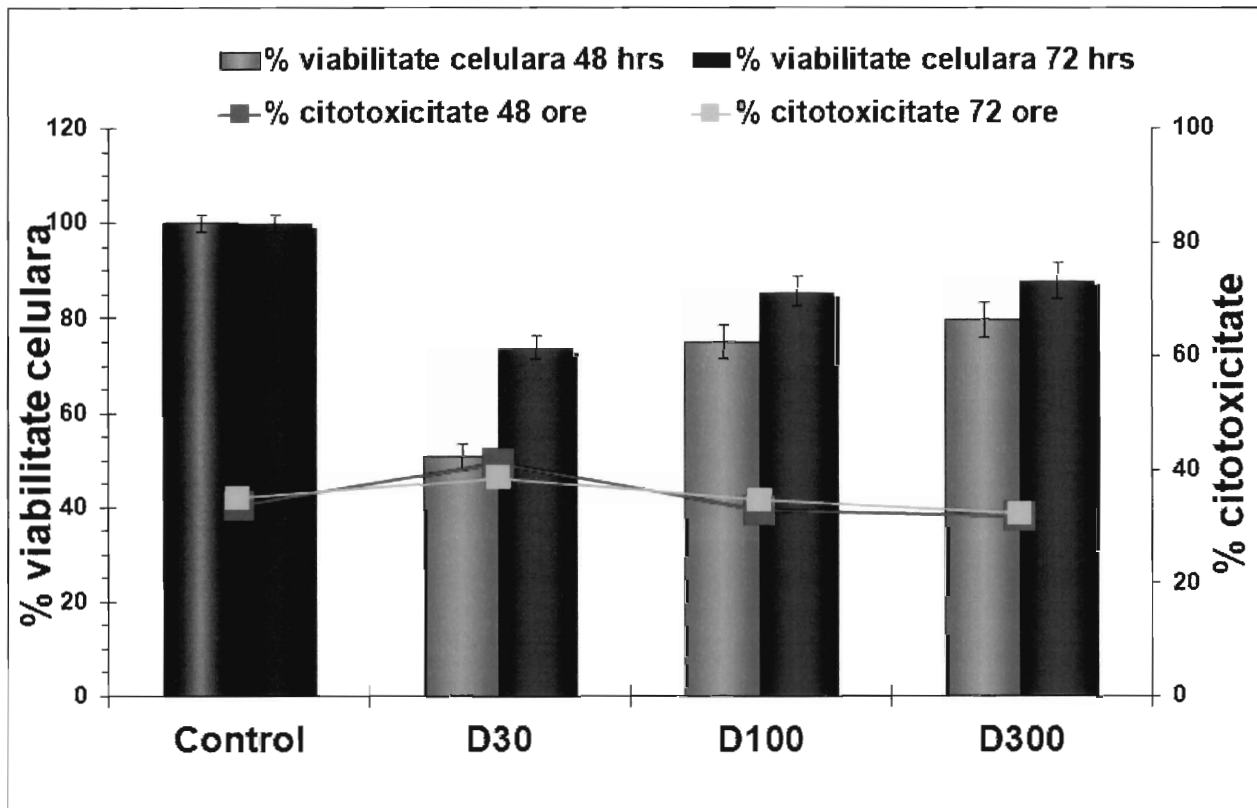


Figura 2

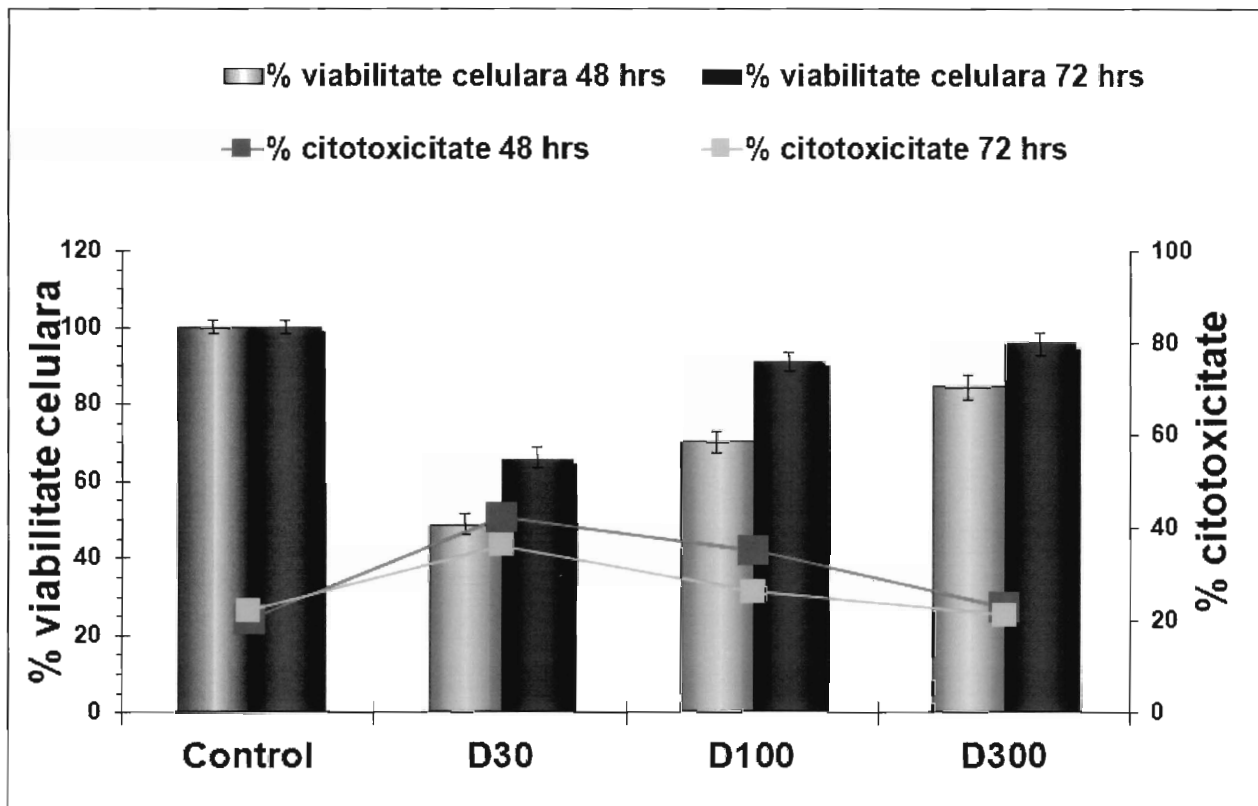


Figura 3

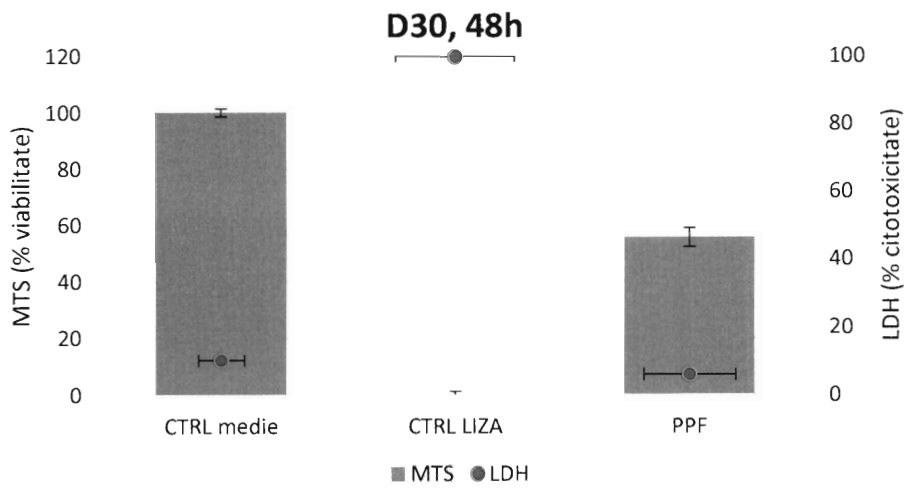


Figura 4

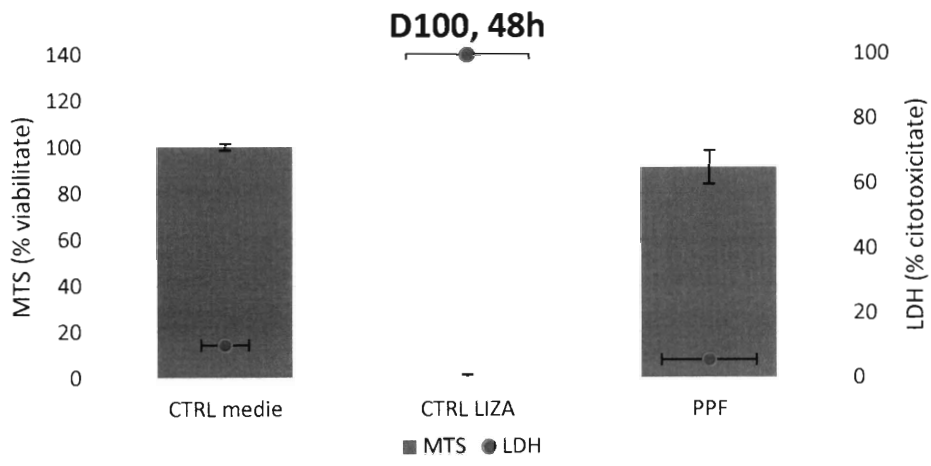


Figura 5

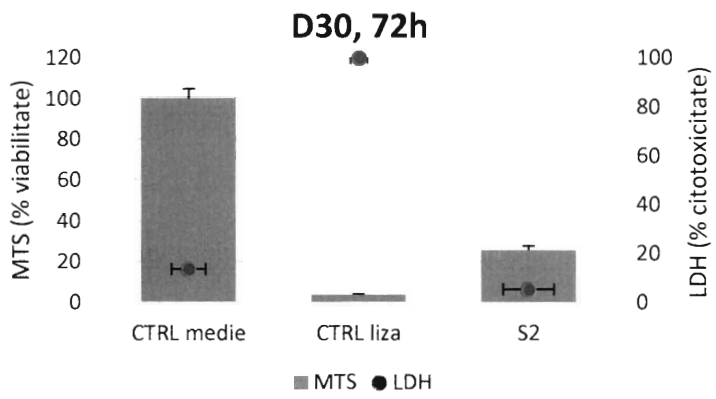


Figura 6

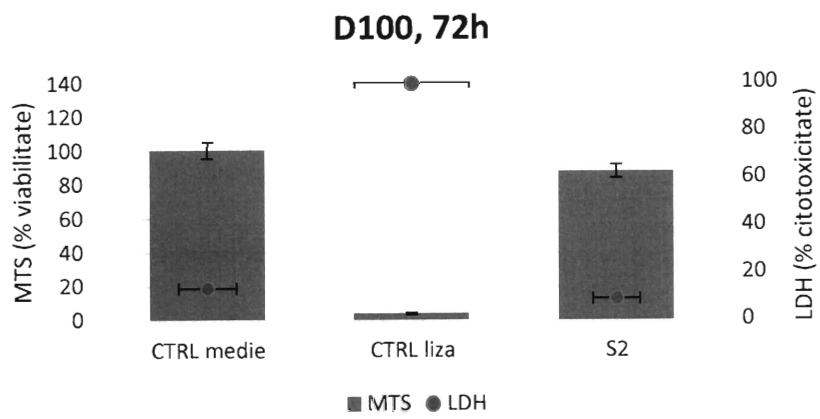


Figura 7

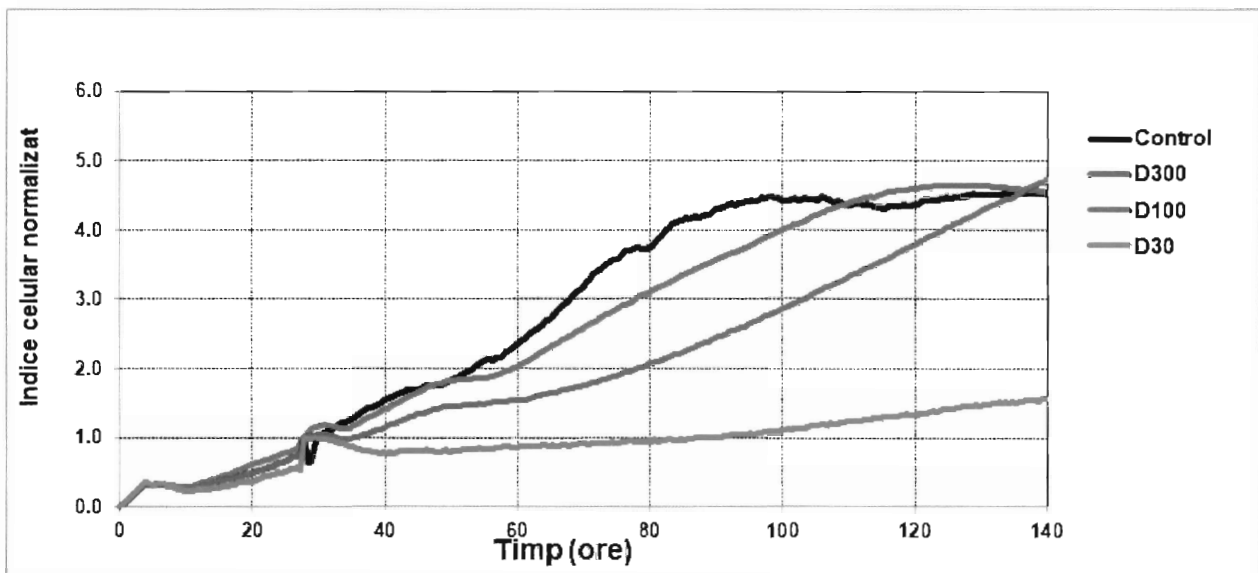


Figura 8

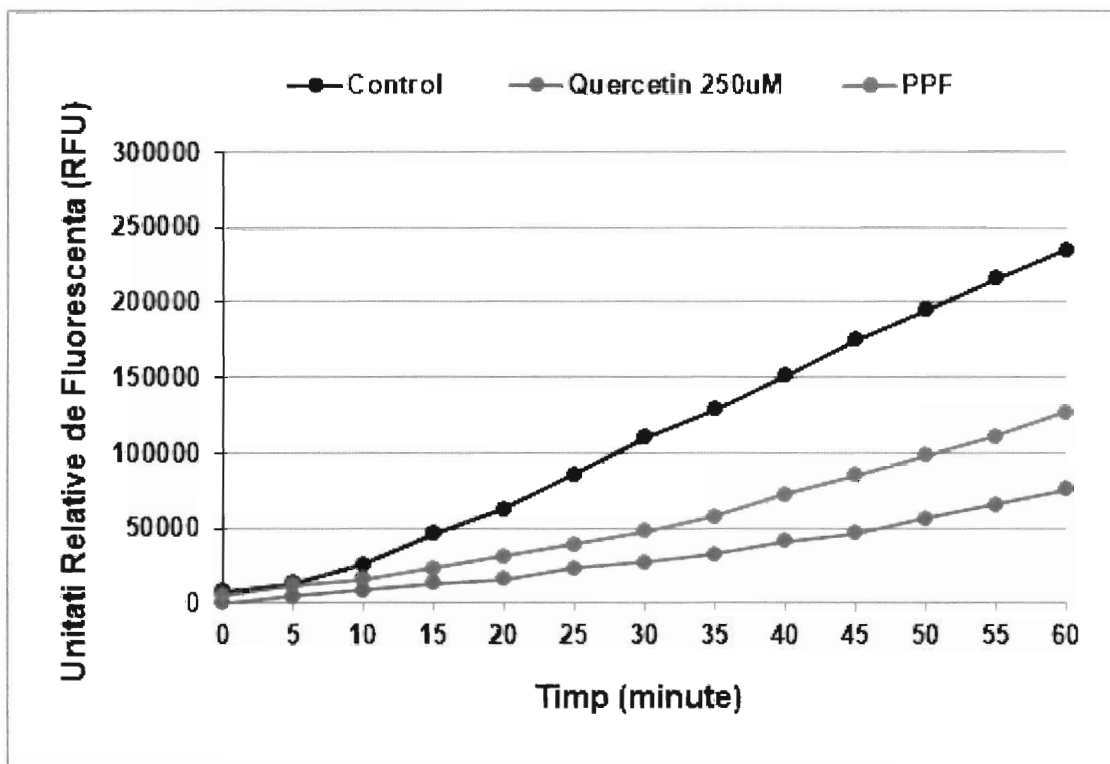


Figura 9

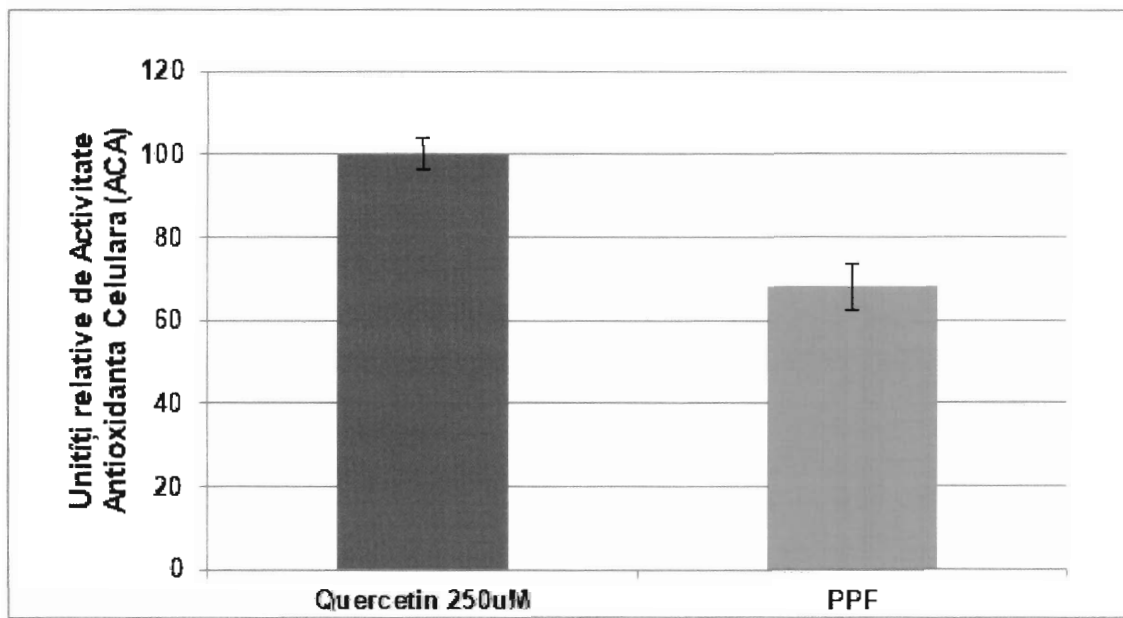


Figura 10

