Cercetari marine	INCDM	Nr. 34	269 - 278	2002

PRODUIT NATUREL D'ORIGINE MARINE À ACTION ÉPITHÉLISANTE, ANTI-INFLAMMATOIRE

Florica BUSURICU, Felicia BURUIANA
Faculté de Médecine, Université "Ovidius" Constanta

ABSTRACT

The aim of our study was to mark out the epithelization and antiinflammatory effect of *Trygon pastinaca* livery fish oil. The biological actions were tested on the experimental open scars induced at Guinea pigs. The treatment consisted in a twice a day lubrication, which had 3 procedures: 1 - oil; 2 - oil prepared as ointment; 3 - oil with healing powder. From the skin there were made histological pieces, and the fractions of seric proteins were biochemically analysed. The healing process was 90.90% (10 of 11 Guinea pigs were cured), in 8 days for the procedure 3, compared to the procedures 1 and 2, where the Guinea pigs were cured with 72.73% efficiency (8 of 11 Guinea pigs) in 10 days; the witness was 50% healed in 14 days. Thus, we believe that the bioactive substance has an epithelization and antiinflammatory activity so that it canbe used alone or with a healing powder.

KEY WORDS : *Trygon pastinaca*, bioactive principle, epithelization, antiinflammatory activity

INTRODUCTION

La peau est un organe qui se trouve dans un état perpétuel de régénération, par lequel on reconstitue ses composantes cellulaires et tissulaires "usées" lors de leur activité physiologique, ou lésées par l'action qu'exerce sur celles-ci divers facteurs nuisibles. Les processus inflammatoires caractérisent les affections de nature immunologique, ainsi que celles dues à diverses agressions physiques ou chimiques. La physiologie de l'inflammation est complexe, grâce à la multitude des agents étiologiques, chacun avec ses caractéristiques morpho-fonctionnelles et biochimiques propres. A côté des études *in vivo*, on a fait quelque-fois appel aux études *in vitro*, mais souvent celles-ci compliquent le problème. C'est la raison pour laquelle la pharmacopée ne dispose pas encore d'un médicament anti-inflammatoire spécifique à une certaine inflammation. En dépit du développement explosif des nouveaux produits biologiques actifs, leur chance de devenir médicaments diminue, grâce aux exigences accrues, ces dernières décennies, de la pharmacologie pré-clinique et clinique (BREZINA, 1999).

La complexité du phénomène d'inflammation consiste en réactions cytologiques, hématologiques et biochimiques. Le but final de ce processus est la destruction de la cause de l'agression et de ses conséquences, en mobilisant pour cela des systèmes multiples, de nature, spécialité et manière d'action très variées. Dans l'éventualité où l'on arrive à neutraliser l'agression et à réparer la partie endommagée, le résultat final sera un granulome inflammatoire (une cicatrice) qui va évoluer vers son absorption ou vers l'inflammation chronique.

La plupart des spécialistes ont systématisé le processus inflammatoire en trois phases, chacune avec ses particularités cytologiques et histochimiques distinctes (MEHEDINTI *et al.*,1999; OLINESCU, 1982).

1. La phase d'inflammation, qui a, à son tour, deux étapes:

   - la première étape: lésions tissulaires locales, dénaturation de certaines protéines et membranes, ralentissement de la circulation veineuse, invadation locale avec macrophages, acidose, catabolisme accru du glycogène;
   - la seconde étape, catabolique, caractérisée par une protéolyse et la libération de médiateurs (histamine) qui augmentent la perméabilité capillaire; de même, la libération des quinines grâce à la lyse des lysosomes et à la stimulation de la tripsine et de la kalicréine; la biosynthèse accrue des prostaglandines; l'accumulation des macrophages, lymphocytes et fibroblastes; l'accumulation des thrombocytes.

2. La phase de prolifération, qui a aussi deux étapes:

   - la première, de réaction, caractérisée par hyperthermie et augmentation de la perméabilité des membranes, vasodilatation; le fibrinogène, les globulines et les glycoprotéines sont en croissance, tandis que les albumines et la sidérémie diminuent;
   - la seconde est caractérisée par la croissance des biosynthèses de protéines, nucléotides et ATP; on assiste à une néoformation de tisu conjonctif, vaisseaux

sanguins et collagène, et à une accumulation de fibroblastes. Les fibroblastes produisent une protéine nomée procolagène ou tropocolagène qui, en présence de la vitamine C, se transforme en colagène, qui est essentiel et indispensable pour le processus de cicatrisation. Concomitamment avec la croissance de la production de colagène, le nombre de fibroblastes diminue jusqu'à leur disparition, marquant ainsi le processus d'organisation ou de différenciation de la plaie.

3. La phase d'organisation, de maturité ou de différenciation de la plaie, qui est un processus naturel, pouvant durer longtemps; c'est maintenant que le granulome (la cicatrice) se forme.

Les organismes marins constituent une importante source d'obtention de produits naturels avec diverses actions pharmacologiques. On en a obtenu divers produits marins à actions pharmacologiques multiples (y compris anti-inflammatoires), en utilisant comme matière première diverses espèces de petits poissons de mer (LINDBLOM, 1994), ou cartilages de requin (DUPONT & JUNEAU, 1995), ou bien des algues bleues du genre *Plectonema* (PEPIN, 1993).

Compte tenu de ces données, nous nous sommes proposé de mettre en évidence l'action épithélisante et anti-inflammatoire d'un produit bioactif sur les plaies ouvertes provoquées aux cobayes par scarification. Le produit bioactif est une huile extraite du foie de l'espèce de poisson *Trygon pastinaca* (BUSURICU & ZAMFIRESCU, 1999), poisson qui vit dans les eaux littorales de la mer Noire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le produit bioactif est l'huile obtenue du foie du poisson *Trygon pastinaca*. L'efficacité de l'huile a été testée sur 41 mâles de cobayes, qui ont été soumis à une scarification expérimentale pour leur produire des lésions. Les plaies ont été traitées deux fois par jour par onction, pendant 14 jours, avec le produit original. Les animaux ont été groupés en 3 lots expérimentaux et un lot-témoin, étant soumis au traitement comme suit:

- variante 1 - cobayes traités avec l'huile extraite du foie (n = 11);
- variante 2 - cobayes traités avec l'onguent[1] (n = 11);
- variante 3 - cobayes traités avec de l'huile mélangée avec de la poudre cicatrisante (n = 11);
- variante 4 - cobayes non-traités (n = 8).

On a effectué des analyses histologiques de la peau, du foie et des reins, avant et après le traitement. Les produits ont été fixés en formaline et ensuite soumis aux travaux de technique histologiques de routine avec inclusion en paraffine. Les sections sériées épaisses de 7-9 µm ont été

[1] L'onguent a été préparé en incorporant l'huile dans la base d'onguent 352 photoprotectrice. La recette de préparation de la base d'onguent a respecté celle donnée dans la littérature spécialisée (POPOVICI, 1980).

colorées avec HEA (hématoxyline-éosine, bleu) et Goldner-Szekelly. Les microhotopgraphies ont été obtenues au microscope ***Jenval*** pourvu d'un dispositif de photographie automatique.

Les dosages biochimiques ont été faits pour les composantes caractéristiques à l'état d'inflammation (électrophorèse des protéines sériques, des protéines totales). Toutes les analyses biochimiques ont été effectuées à l'aide de l'analyseur ***Johnson & Johnson***, et l'électrophorèse a été faite sur gel de polyacrylamide.

Les statistiques des composantes biochimiques ont été établies par le teste Student.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les plaies produites chez les cobayes pendant notre expérimentation ont été guéries de fa□on efficace avec le produit bioactif que nous avons testé. Ainsi, la dynamique de la guérison (en jours) est présentés dans le tableau 1 et les figures 1 et 2. En analysant les résultats, on peut constater que l'huile a accéléré la cicatrisation dans le cas où il a été associé avec la poudre cicatrisante (oxymanirom).

Les plaies des animaux des variantes 1 et 2 ont guéri en 10 jours, tandis que celles du lot témoin et de la variante 3 ont guéri en 14, respectivement 8 jours.

Tableau 1

Dynamique de la guérison des plaies produites chez les cobayes traités avec le produit bioactif isole du foie de *Trygon pastinaca*

Varinte de traitement	**Animaux traités (n)**	**Animaux guéris**[2]	**Temps de guérison (jours)**	**Efficacité de la guérison %**
1 - huile de foie	11	8	10	72,73
2 - huile sous forme d'onguent	11	8	10	72,73
3 - huile avec poudre cicatrisante	11	10	8	90,90
4 - témoin, sans traitement	8	4	14	50,00

Les cobayes traités dans la variante 3 ont une guérison plus efficace, 90,90% (10 sur un total de 11), et dans un intervalle de temps plus court (8 jours) que ceux des variantes 1 et 2, qui ont une efficacité de 72,73% (8 sur un total de 11) et un intervalle pour la guérison de 10 jours. Les

[2] Le reste des animaux traités dans les lots expérimentaux ont guéri après 14 jours de traitement, tandis que les cobayes-témoin non-guéris sont korts à la suite des complications survenues.

exemplaires du lot témoin, non traités, guérissent seulement en proportion de 50% (4 sur un total de 8), dans un intervalle de 14 jours. On constate ainsi que l'huile testée a des propriétés cicatrisante, étant plus efficace dans la variante de l'association avec la poudre cicatrisante (efficacité 90,90%) que dans la variante simple ou sous forme d'onguent (efficacité 72,73%).

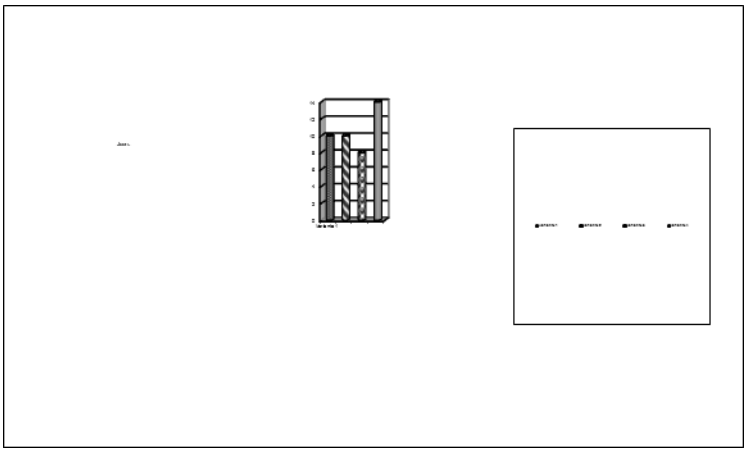

Fig.1 - Dynamique de la guérison des plaies des cobayes traités avec le produit bioactif isolé du foie de *Trygon pastinaca*

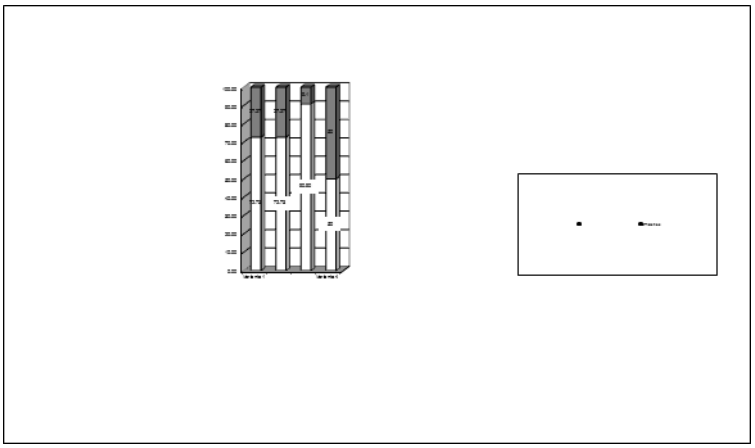

Fig.2 - Efficacité de la guérison des cobayes traités avec le produit bioactif isolé de *Trygon pastinaca*

La guérison des plaies expérimentales a été due à la formation du tissu de granulation (processus final), résultat du processus inflammatoire prolifératif d'un tissu conjonctif très jeune, bien

vascularisé. Le tissu de granulation est le résultat de certaines formations cellulaires (fibroblastes, macrophages, plasmocytes, mastocytes) capillaires de néoformation (leucocytes, mastocytes) et matrices qui contiennent fibronectine, acide hyaluronique et collagène. A travers ce tissu a lieu la migration de l'épiderme régénérée, étant remplacée par le tissu cicatriciel. Pendant la régénération de la derme a lieu le processus d'angiogenèse, qui consiste dans la migration des cellules épithéliales capillaires dans les espaces périvasculaires, où elles forment des bourgeons vasculaires qui se développent, se ramifient et s'unissent, formant des noeuds fonctionnels. Les nouveaux bourgeons apparus de ces noeuds forment rapidement des plexus capillaires superficiels (Fig.3, 4).

Les résultats histologiques sont soutenus également par les résultats biochimiques correspondant au processus d'inflammation. C'est ainsi que l'on a observé la variation des protéines sériques, identifiées et dosées par électrophorèse, en utilisant le gel de polyacrylamide. Dans les états inflammatoires, la variation des protéines sériques a lieu comme suit: les albumines et les γ globulines diminuent, tandis que les α_1, α_2 globulines augmentent (CUCUIANU *et al.*, 1998). Une telle variation est observée chez le témoin non-traité, comparativement aux cobayes traités chez lesquels la valorisation est inverse. Les dosages ont été faits deux ou trois jours après avoir produit la plaie et commencé le traitement, coïncidant avec la phase de prolifération. Les protéines sériques totales ont été dosées à la fin du traitement, et l'on a constaté une croissance (biosynthèse) chez les cobayes traités (variante 1 - 6,83 g/dL; variante 2 - 6,80 g/dL; variante 3 - 8,21 g/dL) et guéris par rapport au témoin (4,47 g/dL), qui a enregistré des valeurs inférieures - ce qui justifie le retard du processus de régénération du tissu cutané. Chez le témoin, dont la plaie n'a pas été traitée, le temps de guérison est plus grand (14 jours) que chez les animaux traités (8, respectivement 10 jours) (Tableau 2, Fig.5).

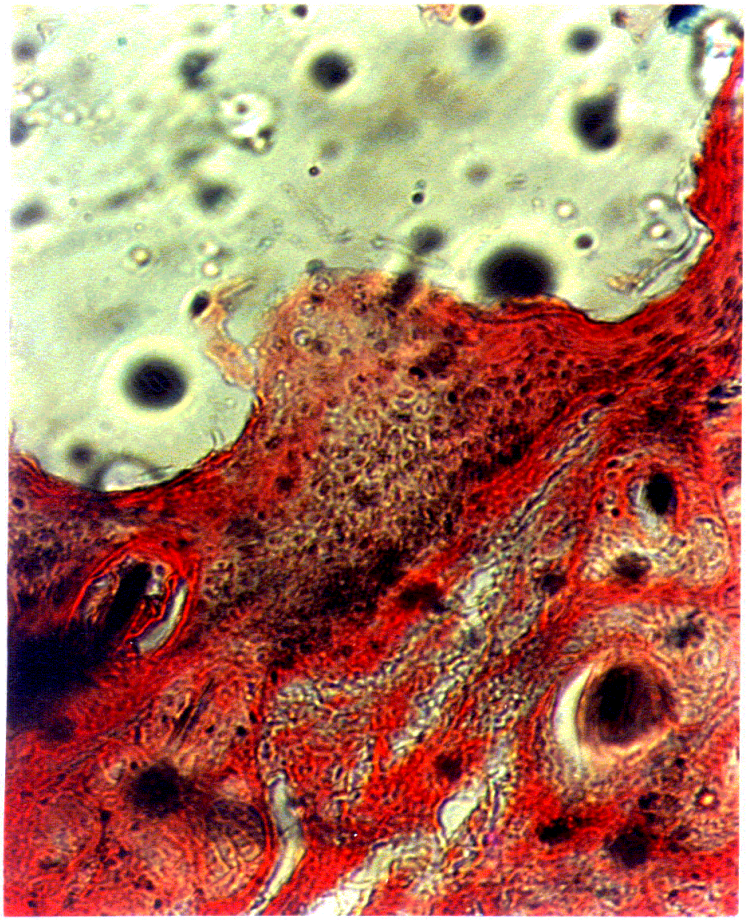

Fig.3 - Épithélium inflammatoire. Plaie non-guérie.
Col. HEA X150

Tableau 2

Variation des protéines sériques chez les cobayes traités avec le produit bioactif obtenu du foie de *Trygon pastinaca*

Variante de traitement	**Protéines totales g/dL**	**Albumines %**	**γ globulines %**	**$\alpha_1$globulines %**	**α_2 globulines %**
1	6,83 □ 0,51	45,64 □ 0,53	15,28 □ 0,82	20,25 □ 0,27	8,71 □ 0,47
2	6,80 □ 0,69	39,05 □ 0,27	15,47 □ 0,16	20,18 □ 0,24	9,43 □ 0,02
3	8,21 □ 0,95	40,42 □ 0,13	17,22 □ 0,16	17,57 □ 0,24	7,90 □ 0,14
4	4,47 □ 0,74	34,13 □ 0,08	14,55 □ 0,19	22,50 □ 0,36	9,22 □ 0,12

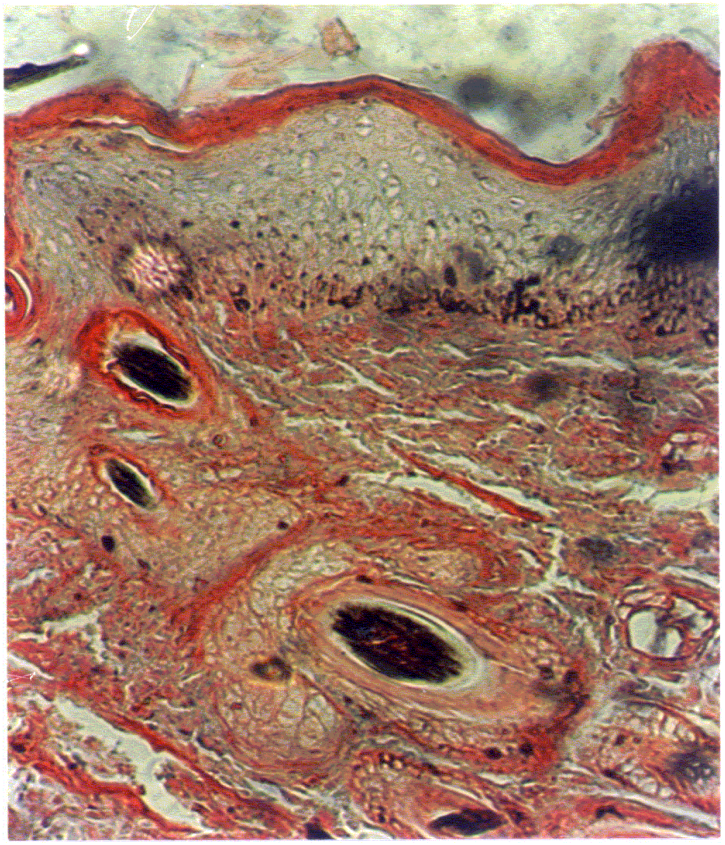

Fig.4 - Épithélium cicatrisant. Plaie guérie.
Col. HEA X150

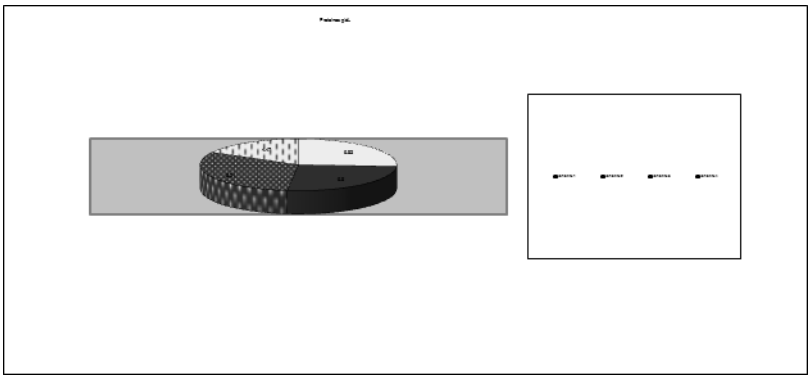

Fig. 5 - Variation des protéines sériques chez les cobayes traités avec le produit bioactif obtenu du foie de *Trygon pastinaca*

CONCLUSIONS

L'expérimentation que nous avons effectuée nous a permis de conclure que le principe bioactif isolé de l'espèce *Trygon pastinaca* a un rôle cicatrisant et anti-inflammatoire, aidant à la guérison des plaies des cobayes produites par scarification. Le produit est plus efficace en mélange avec certaines poudres cicatrisantes (guérison en 8 jours) qu'en l'utilisant simple ou sous forme d'onguent (guérison en 10 jours).

Les résultats obtenus recommandent l'utilisation de cet extrait naturel en dermatologie, pour l'emploi externe.

BIBLIOGRAPHIE :

BREZINA A., 1999 - Thermodynamically active proline derivates. *Terapeutica si toxicologie clinica*, **3**, 1: 61-69.

BUSURICU F., ZAMFIRESCU S., 1999 - Principles isolated from *Trygon pastinaca* sea fish, composition and skin tolerance *J.Med.Biochem.*, **3**, 3: 275-282.

CUCUIANU M., CRASNIC I., PLESA L., 1998 - *Biochimie clinica. Fundamentarea fiziopatologica*, Ed. Dacia, Cluj Napoca: 169, 204-211.

DUPONT E., JUNEAU C., 1995 - Extracts of shark cartilage having an antiangiogenic activity and on effect on tumor regression. *PCT/CA 00233*.

LINDBLOM R., 1994 - Composition comprising corespounds for use as therapeutical agent. *PCT/SE, 01112*.

MEHEDINTI R., GHEORGHE E., VAMES F., 1999 - Modificari ultrastructurale la nivelul tegumentului în plagile cutanate. *Analele Universitatii "Ovidius"*, Constanta, **4**: 178-187.

OLINESCU R., 1982 - *Peroxidarea în chimie, biologie si medicina*. Editura Stiintifica si enciclopedica, Bucuresti: 199-200.

PEPIN D., 1993 - Extraits bruts d'algues bleues, leurs procédés de préparation et leurs applications en cosmétologie et en dermatologie. *PCT/FR 00735*.

POPOVICI A., 1980 - *Unguente farmaceutice*. Ed.Med., Bucuresti: 191.