

EPECTELE CĂTINEI ȘI TOMATINEI ASUPRA PLĂGILOR EPITELIATE

THE EFFECTS OF SEA BUCKTHORN AND TOMATINEE EXTRACTS ON SKIN LESIONS

ANDREEA NICOLETA BOCA*, ROXANA FLAVIA ILIES*, LOVE NIELSEN*, RALUCA POP*,
ȘTEFAN VESA*, ANCA DANA BUZOIANU*, ALEXANDRU TĂTARU**

Rezumat

Plăgile epiteliale reprezintă o problemă frecvent întâlnită în practica medicală curentă. În ciuda acestui fapt, opțiunile terapeutice disponibile sunt limitate. Studiul de față evaluează efectele extractului de cătină și a tomatinei în reepitelizarea leziunilor pe un model experimental murin. S-au obținut rezultate promițătoare, justificând evaluarea ulterioară a acestor principii active printr-un studiu amplu.

Cuvinte cheie: plăgi epiteliale, reepitelizare, cătină, tomatină, model murin.

Intrat în redacție: 20.04.2016

Acceptat: 7.06.2016

Summary

Skin lesions are a frequent occurrence in medical practice, however there are limited therapeutic means to aid in healing. In our study, we assessed the effect sea buckthorn extract and tomatinein the reepithelisation of lesions in a murine model. Promising results have been obtained, thus justifying a larger scale study of these compounds.

Keywords: skin lesion, reepithelisation, sea buckthorn, tomatine, murine model.

Received: 20.04.2016

Accepted: 7.06.2016

Introducere

Managementul plăgilor cutanate reprezintă o provocare în practica dermatologică, severitatea lor variind de la leziuni minore la leziuni care pot amenința viața pacientului. În ciuda eforturilor de a dezvolta farmaceutice reepitelizante eficiente, în momentul actual există puține soluții eficiente și accesibile pentru a îndeplini acest deziderat.

În timp ce medicina convențională nu oferă soluții suficiente, un număr din ce în ce mai mare

Introduction

The management of skin lesions represents a challenge in the dermatologic practice, their severity ranging from merely bothersome to life-threatening. In spite of the energy invested in the development of pharmaceuticals aimed at improving healing of these lesions, there are few effective and accessible means to achieve this.

While conventional medicine offers limited solutions for this issue, an increasing number of

* Departamentul de Farmacologie, Toxicologie și Farmacologie Clinică, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy.

** Departamentul de Dermatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.
Department of Dermatology, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy.

de pacienți recurg la opțiuni terapeutice alternative, una din acestea fiind medicina complementară și alternativă (CAM). Un studiu condus de Fuhrmann et al (1) a evidențiat că 84,5% din pacienții care se prezintă cu acuze dermatologice au recurs la terapii alternative cel puțin o dată. În ciuda lipsei testării riguroase, aceste produse sunt atractive pentru populația generală, fiind percepute ca având mai puține efecte adverse (2). CAM sunt în general considerate ca o alternativă sigură la medicina convențională.

Medicina complementară și alternativă (CAM) este bazată pe beneficiile aduse de către anumite extracte botanice. Utilizarea și eficiența acestor produse se bazează majoritar pe dovezi de tip anecdotal. În ciuda acestor limitări, CAM ne poate oferi extracte care în urma testărilor se pot dovedi a fi eficiente, justificând studiul lor aprofundat și izolarea compușilor eficienți.

În această direcție, studiul nostru își propune să analizeze potențialul extractului de cătină și tomatină asupra plăgilor epiteliale.

Cătina este o plantă din familia *Eleagnaceae*, cel mai comun reprezentant fiind *Hippophae rhamnoides*. A fost documentată ca având un efect pozitiv pe o varietate de leziuni topice (tăieturi, arsuri) precum și în cazul leziunilor gastro-intestinale și cervicitei. (3-5)

Tomatina, un compus extras din frunzele plantei *Solanum lycopersicum* (planta de tomate) este o substanță cu proprietăți antimicrobiene, antiproliferative, antiinflamatoare, antivirale și antifungice. (6-9)

Studiul de față evaluează acești doi compuși prin a observa efectele lor în reepitelizarea unei leziuni pe un model experimental murin.

Materiale și metode

Studiul a fost condus pe 20 de șobolani masculi Wistar Bratislava cu greutatea între 130 și 165 grame la cântărirea inițială. Am folosit o unealtă de punch-biopsie de 8 mm, extract de tomatină, extract de cătină, preparat placebo și bandaje.

Extractul de tomatină a fost preparat din frunze de tomate congelate (5g) folosind 50 ml apă: etanol (30:70). Frunzele au fost omogenizate via Ultra-Turrax la 10000rpm și apoi sonicate pentru 30 de minute la 70 °C și centrifugate 10

patients resort to alternative therapeutic options, such as complementary and alternative medicine (CAM). In a study conducted by Fuhrmann et al (1) it was brought to light that 84.5% of patients presenting with skin conditions or complaints have used alternative therapies at least once. In spite of their mostly untested nature, these therapeutic options have a significant appeal to the general population. Often being touted as 'natural', 'organic' or 'plant based', patients perceive that these substances carry few negative side effects (2) and are generally considered to be a safer alternative to Western medicine.

CAM is a system of healing based on the therapeutic benefits of certain botanical extracts. Its use and efficacy is reliant mostly on anecdotal evidence. Still, CAM may provide us with extracts that prove their efficacy in various cases, justifying further testing and identification of the exact beneficial compound.

In this direction, the present research aims to assess the benefits of sea buckthorn and tomatine on skin lesions.

Sea Buckthorn is a plant from the *Eleagnaceae* family. The most common representative is *Hippophae rhamnoides*. It has been documented as having a positive effect in a variety of topical lesions (lacerations, burns) as well as in gastrointestinal lesions and cervicitis. (3-5)

Tomatine, a compound extracted from the leafy green part of *Solanum lycopersicum* (the tomato plant), is a substance which has been shown to be antimicrobial, antiproliferative, anti-inflammatory, antiviral and antifungal. (6-9)

In our study, we evaluated these two compounds by observing the way in which they influence the epithelisation of a lesion in a murine model versus placebo.

Materials and methods

Our study was conducted on 20 male Wistar Bratislava rats ranging from 130 to 165 g at the initial weigh-in. We used an 8 mm punch biopsy tool, tomatine extract, sea buckthorn extract, placebo preparations and bandages.

The tomatine extract was prepared from frozen tomato leaves (5g) using 50 ml water:ethanol (30:70 v/v). The tomato leaves were homogenized via Ultra-Turrax at 10000rpm and then sonicated for 30 minutes at 70 °C and

minute la 2500 rpm și 4 °C. Supernatantul a fost colectat, concentrat la vacuum, liofilizat și stocat la -20°C. Înaintea utilizării extractul a fost solubilizat în 4ml apă și apoi încorporat în 20 ml gel pe bază de apă.

Extractul de cătină a fost obținut din fructe întregi de cătină albă culese din Cluj în luna septembrie. Procesul obținerii acestui extract a fost dezvoltat în colaborare cu o firmă de specialitate. Fructele întregi au fost spălate, uscate lent la 45°C, apoi fragmentate în granule mari, din care extractul uleios a fost obținut prin presare. Ca substanță placebo s-a folosit un gel standard pe bază de apă, același ca și cel utilizat la obținerea extractelor.

Protocolul experimental utilizat a fost elaborat respectând Declarația din Helsinki nr 86/609 din 24 noiembrie 1986 referitoare la studiile pe modele animale precum și legislația României cu privire la acest aspect.

Șobolanii au fost ținuți în condiții standard de mediu, temperatură, hrană, cu cicluri de lumină naturale. Au fost păstrați în cuști separate pentru a nu afecta rezultatul experimentului.

Cei 20 de șobolani Wistar Bratislava de sex masculin au fost divizați în patru grupuri: tomatină vs placebo, respectiv cătină vs placebo. Fiecare din aceste grupe a fost compusă din cinci șobolani.

Șobolanii au fost cântăriți inițial și examinați sumar. După observarea stării lor de sănătate, o zonă de piele de pe spate, în regiunea gâtului, a fost rasă folosind o lamă de ras. Zona a fost anesteziată cu o soluție de lidocaină 2%, apoi o leziune a fost creată folosind un bisturiu pentru punch-biopsie de 8mm. Leziunile au fost măsurate folosind un liniar înainte de aplicarea terapiei, în ziua 7, respectiv în ziua 14. După aplicarea agentului topic, substanță activă sau placebo, leziunea a fost bandajată pentru a preveni interferențele. Soluțiile și bandajele au fost rePLICATE zilnic. Toți acești pași au fost înregistrați fotografic pentru a documenta evoluția.

Rezultatele au fost consemnate într-o bază de date creată în Microsoft Office Excel, apoi analizate folosind SPSS varianta 2.0. Valorile lui p sub 0.05 au fost considerate semnificative statistic.

further centrifuged for 10 minutes at 2500 rpm and 4°C. The supernatant was collected, vacuum-concentrated, lyophilized and stored at -20°C. Prior to usage the extract was solubilised in 4 ml water and then incorporated in 20 ml water-based gel.

The sea buckthorn extract was obtained from whole White Sea buckthorn fruits collected from the Cluj District in the month of September. The process of obtaining this extract was developed in collaboration with a company with expertise on this matter. The whole fruits were washed, dried slowly at 45°C, then fragmented in large granulations, from which the oily extract was obtained by the high-pressure method.

The placebo was a standard water based gel, as the one used for the extract.

The present experimental protocol was elaborated in consent with the Helsinki Declaration no 86/609 of the 24th November 1986 regarding studies using animal models as well as the current Romanian legislation pertaining to this matter.

The rats were kept in standard conditions of temperature, food, enclosures, with normal daylight cycles. They were kept in separate cages as to not affect the results of the experiment.

The 20 male Wistar Bratislava rats were divided in four groups: the tomatine vs placebo group, respectively the sea buckthorn extract vs placebo group. Each of these groups was composed by five rats.

The rats were weighed initially and given a summary examination. Upon observing their general good state of health, a patch on their back near the neck was shaved using a razor. The area was numbed with 2% lidocaine solution. Then a lesion was created using an 8mm punch biopsy tool. The lesion was measured using a ruler prior to therapy, and then on the 7th and 14th day respectively. After applying the topical agent, active substance or placebo, the lesion was bandaged to prevent interference. The solutions and bandages were reapplied daily.

At all steps photos were taken to record and document the evolution.

The results were recorded in a Microsoft Office Excel worksheet, then analysed using SPSS version 2.0. Statistical significance was considered for P values lower than 0.05.

Tabelul I. Leziunile șobolanilor tratați cu tomatină vs placebo

Șobolan	Leziunea în mm D0	Leziunea în mm D7	Vindecare % D7	Leziunea în mm D14	Vindecare % D7
1	9	5	44.44	2	77.78
2	8	5	37.50	1.5	81.25
3	9	5	44.44	1	88.89
4	8	6	25.00	1	87.50
5	8	5	37.50	1	87.50
6	8	4	50.00	2	75.00
7	9	4	55.56	2	77.78
8	10	5	50.00	2.5	75.00
9	8	4	50.00	1.5	81.25
10	8	5	37.50	3	62.50
	tomatină		placebo		

Table I. Lesion of the rats treated with tomatinee versus placebo

Rat	Lesion size D0	Lesion size D7	Healing % D7	Lesion size D14	Healing % D7
1	9	5	44.44	2	77.78
2	8	5	37.50	1.5	81.25
3	9	5	44.44	1	88.89
4	8	6	25.00	1	87.50
5	8	5	37.50	1	87.50
6	8	4	50.00	2	75.00
7	9	4	55.56	2	77.78
8	10	5	50.00	2.5	75.00
9	8	4	50.00	1.5	81.25
10	8	5	37.50	3	62.50
	tomatinee		placebo		

Rezultate

Tomatina

Tabelul I conține măsurătorile de leziune pentru grupurile tomatină vs placebo.

În cursul celor 14 zile, am observat o diferență semnificativă în dimensiunea leziunilor în ambele grupe (tomatină și placebo). În urma analizei statistice, diferența dintre evoluția leziunilor celor două grupuri nu a atins semnificație statistică ($p = 0.471$, Fig 1). Rezultate similare au fost observate și comparând procentele de reepitelizare a leziunilor ($p = 1$, Fig 2). Dovezile fotografice a acestui rezultat se regăsesc în Fig 3 și 4.

Cătina

Tabelul II conține măsurătorile leziunilor din grupele cătină vs placebo.

Results

The Tomatine Extract

Table I contains the lesion measurements for the tomatine versus placebo groups.

Along the 14 days, we have noticed a significant difference in the lesion size in both placebo and experiment groups, however pending statistical analysis, the difference between these groups was not enough to reach statistical significance for the lesions' size ($p = 0.471$, Fig 1). Similar results were observed when comparing the overall percentages in lesion reepithelisation ($p = 1$, Fig 2). The photographic evidence of this result is found in Fig 3 and 4.

The Sea Buckthorn Extract

Table II contains the lesion measurements for the sea buckthorn extract versus placebo groups.

Tabelul II. Leziunile șobolanilor tratați cu cătină vs placebo

Șobolan	Leziunea în mm D0	Leziunea în mm D7	Vindecare % D7	Leziunea în mm D14	Vindecare % D7
1	9	3.5	61.11	1	88.89
2	9	4	55.56	1.5	83.33
3	9	3	66.67	0.5	94.44
4	8	5	37.50	1	87.50
5	10	3.5	65.00	1.5	85.00
6	9	5	44.44	2	77.78
7	9	3	66.67	1	88.89
8	10	6	40.00	3	70.00
9	9	3.5	61.11	1	88.89
10	8	5	37.50	2.5	68.75
	cătină			placebo	

Table II. Lesion of the rats treated with sea buckthorn versus placebo

Rat	Lesion size D0	Lesion size D7	Healing % D7	Lesion size D14	Healing % D7
1	9	3.5	61.11	1	88.89
2	9	4	55.56	1.5	83.33
3	9	3	66.67	0.5	94.44
4	8	5	37.50	1	87.50
5	10	3.5	65.00	1.5	85.00
6	9	5	44.44	2	77.78
7	9	3	66.67	1	88.89
8	10	6	40.00	3	70.00
9	9	3.5	61.11	1	88.89
10	8	5	37.50	2.5	68.75
	tomatinee		placebo		

Raportăm o diferență statistic semnificativă în sensul scăderii dimensiunii leziunilor după 14 zile de urmărire în ambele grupe. Comparând dimensiunile inițiale ale leziunilor, nu au existat diferențe între placebo și grupul experimental ($p = 0.373$). După 7 zile, dimensiunile leziunilor tratate cu extractul de cătină au fost semnificativ mai mici față de cele din grupul placebo ($p = 0.01$). Rezultate similare raportăm și după 14 zile de tratament ($p = 0.033$) (Fig 5). Analizând procentajul îmbunătățirilor în cele 14 zile de urmărire, am obținut rezultate statistic semnificativ superioare în grupul tratat cu extractul de cătină ($p = 0.05$, Fig 6). Fotografiiile documentând acest proces se regăsesc în Fig 7 și 8.

Discuții

Studiul nostru raportează rezultate promițătoare ale extractului de cătină în reepitelizarea plăgilor cutanate. Rezultate

Similarly, we noticed a statistically relevant decrease in lesion size in the 14 days of follow-up in both groups. Comparing the initial lesion size, there was no difference between the placebo and experimental group ($p=0.373$). However, the lesion size at day 7 already reached statistical significance ($p=0.01$), while at day 14 the lesions treated with sea buckthorn were significantly smaller than the lesions treated with placebo ($p = 0.033$) (Fig 5). While analysing the percentage of improvement in the lesions in the 14-day span, we obtained similar results ($p = 0.05$, Fig 6). The photographic evidence of these results are found in Fig 7 and 8.

Discussion

Our study shows promising results in the case of the sea buckthorn extract in reepithelisation of lesions in rats. Similar results

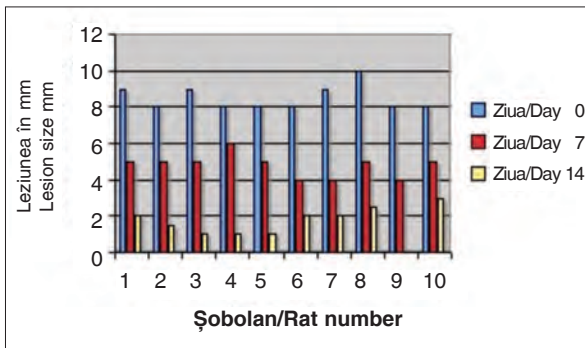


Fig. 1. Evoluția leziunilor măsurate în mm în decursul a 14 zile (tomatină vs placebo)

Fig. 1. Evolution of lesion size in mm over 14 days (tomatinee vs placebo)

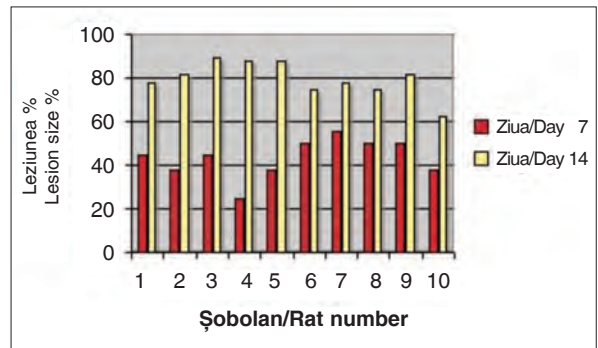


Fig. 2. Evoluția dimensiunii leziunilor în % în decursul a 14 zile (tomatină vs placebo)

Fig. 2. Evolution of lesion size in % over 14 days (tomatine vs placebo)



Fig. 3. Cușca și leziunile pe șobolanul nr 1 tratat cu tomatină în zilele 0 și 14

Fig. 3. The cage and the lesion on rat 1 treated with tomato leaf extract on day 0 and day 14



Fig. 4. Cușca și leziunile pe șobolanul nr 2 tratat cu placebo-zilele 0 și 14

Fig. 4. The cage and the lesion on rat 2 treated with placebo on day 0 and day 14

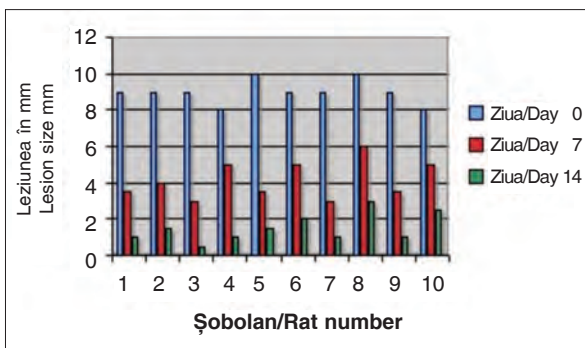


Fig. 5. Evoluția dimensiunii leziunilor în mm în decursul a 14 zile (cătină vs placebo)

Fig. 5. Evolution of lesion size in mm over 14 days (Sea buckthorn extract vs placebo)

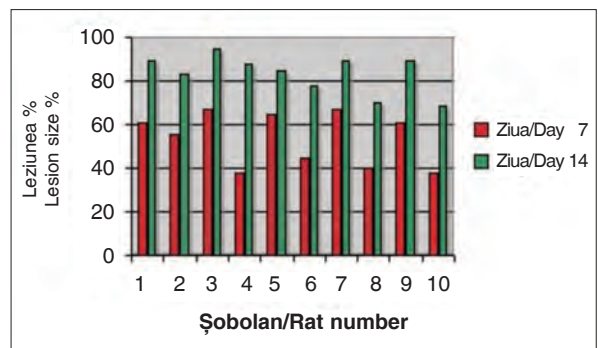


Fig. 6. Evoluția dimensiunii leziunilor în % în decursul a 14 zile (cătină vs placebo)

Fig. 6. Evolution of lesion size in % over 14 days (Sea buckthorn extract vs placebo)

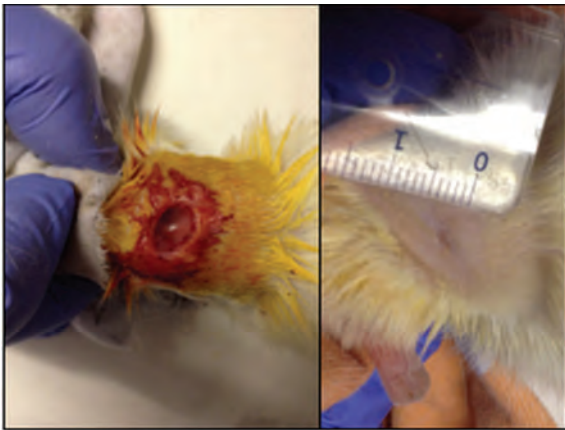


Fig. 7. Leziunea pe șobolanul 1 tratat cu cătină-zilele 0 și 14

Fig. 7. Lesion on rat 1 treated with sea buckthorn at day 0 and day 14

similare au fost obținute de Zhao (4) în leziuni de tip arsură, precum și în cazul leziunilor ulceroase gastrointestinale (3) și în inflamația cervixului (10).

Studiul nostru este unul preliminar, în vederea justificării unui studiu ulterior mai amplu. Ca atare, prezintă o serie de limitări: dimensiunea mică a lotului experimental, fapt ce a îngreunat obținerea relevanței statistice, precum și folosirea unui model experimental murin, care prezintă anumite variații în mecanismul reepitelizării comparat cu subiecții umani, anume lipsa stratului de keratină și modelul de vindecare prin contracție.

În ciuda acestor aspecte, rezultatele noastre justifică desfășurarea unui experiment pe scară mai largă pentru a evalua efectul extractului asupra plăgilor cutanate.

Concluzii

Extractul de cătină reprezintă o alternativă eficientă în reepitelizarea plăgilor epiteliale. Extractul de tomatină nu a demonstrat un efect semnificativ versus placebo.

Investigarea ulterioară a acestor compuși este un demers justificat în vederea obținerii unor resurse accesibile pentru reepitelizarea plăgilor cutanate.

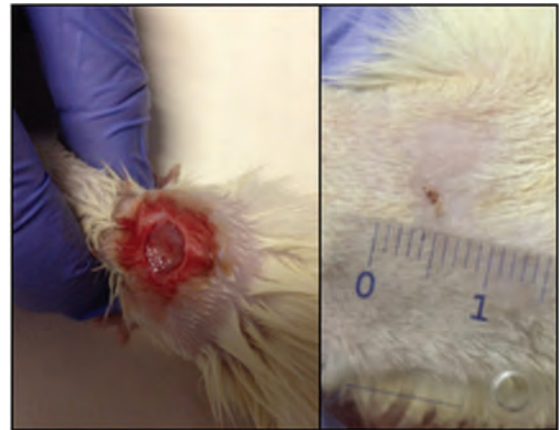


Fig. 8. Leziunea de pe șobolanul 2 tratată cu placebo-zilele 0 și 14

Fig. 8. Lesion on rat 2 treated with placebo at day 0 and day 14

have been obtained by Zhao (4) in burn lesions as well as in gastrointestinal ulcers (3) and cervix inflammation (10).

Our study is a preliminary experiment with the purpose of justifying a larger scale, more relevant endeavour. As such, it presents a number of weaknesses such as: a small sample, which made obtaining statistical significance difficult, the use of a murine model which presents certain wound healing mechanism differences compared to human patients, namely the lack of a keratin layer and a different pattern of wound healing-by contraction of the lesion.

Nonetheless, our results justify a larger scale experiment assessing the effects of our extract on this type of wounds.

Conclusions

Sea buckthorn extract has been proven to be effective in minimising lesions in our murine model. In spite of promising prior research, the tomatine extract vs placebo did not show a statistically significant difference.

It is imperative that we look further into such compounds as a potentially accessible resource for effective, easily obtainable aid for the healing of minor lesions.

Bibliografie/ Bibliography

1. Fuhrmann T, Smith N, Tausk F. Use of complementary and alternative medicine among adults with skin disease: updated results from a national survey. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2016 Jun 18];63(6):1000-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933300>
2. Magin PJ, Adams J, Heading GS, Pond DC, Smith W. Complementary and alternative medicine therapies in acne, psoriasis, and atopic eczema: results of a qualitative study of patients' experiences and perceptions. *J Altern Complement Med* [Internet]. 2006 Jun [cited 2016 Jun 18];12(5):451-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16813509>
3. Xing J, Yang B, Dong Y, Wang B, Wang J, Kallio HP. Effects of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seed and pulp oils on experimental models of gastric ulcer in rats. *Fitoterapia* [Internet]. 2002 Dec [cited 2016 Jun 18];73(7-8):644-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490224>
4. Y Z. Clinical effects of Hippophae seed oil in the treatment of 32 burn cases. *Hippophae*.
5. Padmavathi B, Upreti M, Singh V, Rao AR, Singh RP, Rath PC. Chemoprevention by Hippophae rhamnoides: effects on tumorigenesis, phase II and antioxidant enzymes, and IRF-1 transcription factor. *Nutr Cancer* [Internet]. 2005 [cited 2016 Jun 18];51(1):59-67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749631>
6. Irving GW, Fontaine TD, Doolittle SP. Partial Antibiotic Spectrum Of Tomatin, an Antibiotic Agent from the Tomato Plant. *J Bacteriol* [Internet]. 1946 Nov [cited 2016 Jun 18];52(5):601-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16561219>
7. Lee K-R, Kozukue N, Han J-S, Park J-H, Chang E-Y, Baek E-J, et al. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2004 May 19 [cited 2016 Jun 18];52(10):2832-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15137822>
8. Zhao B, Zhou B, Bao L, Yang Y, Guo K. Alpha-Tomatine Exhibits Anti-inflammatory Activity in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. *Inflammation* [Internet]. 2015 Oct [cited 2016 Jun 18];38(5):1769-76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772114>
9. Friedman M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2002 Oct 9 [cited 2016 Jun 18];50(21):5751-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358437>
10. Erkkola R, Yang B. Sea buckthorn oils: towards healthy mucous membranes. *AgroFood Industry Hi-Tech*. 2003;(3):53-57.

Conflict de interese
NEDECLARATE

Conflict of interest
NONE DECLARED

Adresa de corespondență: dr.tataru@yahoo.com

Correspondance address: dr.tataru@yahoo.com