

Raport științific PD 94/2022

Etapa III 2024

Validarea efectelor antifibrotice ale produsului gemoterapic pe bază de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine într-un model experimental de fibroză hepatică la șoareci

I. Rezumatul etapei:

Activitățile efectuate în cadrul acestei etape au vizat evaluarea potențialului antifibrotic al extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine. **Activitatea 3.1.** a fost reprezentată de evaluarea activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin analiza matricei extracelulare. În acest sens am analizat expresia genică a MMP-1, -2, -3, -9 și TIMP-1 și expresia proteică a MMP-1, -9, -13 și TIMP-1. Loturile tratate cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură au prezentat o creștere semnificativ statistică a expresiei genice a MMP-1 și o diminuare semnificativ statistică a expresiei genice a MMP-2, -3, -9 și TIMP-1 comparativ cu lotul fibrotic și cu lotul de reversie a fibrozei, cele mai bune rezultate fiind obținute în cazul lotutului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD. În urma analizei expresiei proteice a MMP-1, -9, -13 și TIMP-1 la loturile cărora li s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură s-a remarcat o creștere a expresiei MMP-1 și -13 și o reducere a expresiei MMP-9 și TIMP-1, cel mai pronunțat efect fiind observat în cazul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD. În cadrul **activității 3.2.** a fost realizată evaluarea activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin microscopie electronică. Tratamentul cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD s-a dovedit a îmbunătăți aspectul ultrastructural al ficatului. **Activitatea 3.3** a vizat diseminarea rezultatelor sub forma unei prezentări orale la o conferință națională/internațională și publicarea a două articole în reviste indexate ISI.

II. Descrierea științifică

A.2.5. Evaluarea activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin analiza matricei extracelulare (expresia imunohistochimică a proteinelor; expresia genică)

În vederea evaluării activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin analiza matricei extracelulare am investigat expresia imunohistochimică a MMP-1, -2, -9, -13, TIMP-1 și expresia genică a MMP-1, -2, -3, -9 și a TIMP-1.

MMP-1, cunoscută și sub denumirea de collagenaza 1 sau collagenază interstițială, este principala protează care degradează collagenul de tip I, principalul tip de collagen prezent în ficatul afectat de fibroza hepatică.

Expresia ARm a MMP-1 în cazul lotului care a fost tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (SC-CHR/HPBCD) s-a remarcat a fi semnificativ crescută comparativ cu lotul martor, cu lotul fibrotic și cu lotul de reversie a fibrozei ($p < 0,001$). Lotul cărui i s-a administrat crisină complexată cu HPBCD a prezentat o creștere semnificativ statistică în raport cu lotul martor ($p < 0,001$) (Figura 1).

Biopsiile de ficat ale loturilor experimentale pentru analiza imunohistochimică au fost fixate în 4% formalină în tampon fosfat, incluse în parafină, secționare la o grosime de 5 μm. Ulterior, a fost analizată expresia imunohistochimică a MMP-1, -9, -13 și a TIMP-1. Pentru analiza secțiunilor s-a utilizat un microscop optic Olympus BX43. Secțiunile au fost documentate imagistic cu o cameră digitală Olympus XC30 și software Olympus Cell Dimension.

Tratamentul timp de patru săptămâni cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură a indus o creștere semnificativă a expresiei proteice a MMP-1, comparativ cu lotul fibrotic și cu cel de reversie a fibrozei. Această creștere a expresiei proteice a acestei collagenaze s-a dovedit a fi mai accentuată în cazul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD comparativ loturile cărora li s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură. Creșterea expresiei proteice a MMP-1 se asociază cu o creștere a scindării collagenului fibrilar de tip I, ceea ce sugerează implicarea acestei collagenaze în reversia fibrozei hepatice (Figura 2).

În cazul lotului fibrotic căruia i s-a administrat CCl₄, expresia ARNm a MMP-2, -3 și -9 a prezentat o creștere semnificativ statistică comparativ cu lotul martor ($p < 0,001$). Expresia genică a MMP-2, -3 și -9 s-a menținut crescută semnificativ statistic și în cazul lotului de reversie *de novo* al fibrozei în raport cu lotul martor ($p < 0,001$). Loturile care au fost tratate cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură au prezentat o reducere semnificativă statistic comparativ cu lotul fibrotic ($p < 0,001$), cea mai pronunțată reducere fiind înregistrată pentru lotul care a fost tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figuri 3, 4 și 5).

Analiza imunohistochimică hepatică a evidențiat în cazul lotului martor un aspect histologic normal, fără imunopozitivitate pentru MMP-9 (Fig. 6-V1). După opt săptămâni de administrare a CCl₄, se remarcă o creștere a imunopozitivității pentru MMP-9 a fost vizibilă la nivelul întregului lobul hepatic (Fig. 6-V2). Creșterea numărului de celule marcate pozitiv pentru MMP-9 a fost observată și în cazul lotului de reversie a fibrozei la două săptămâni de la întreruperea administrării CCl₄ (Fig. 6-V3). Administrarea extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, a extractului gemoterapic de *Secale cereale*, a crisinei complexate cu HPBCD și a crisinei pure a indus o diminuare a imunopozitivității MMP-9. Această scădere a fost mai pronunțată în cazul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Fig. 6-V4), în raport cu loturile cărora li s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură (Figura 6).

Din punct de vedere imunohistochimic, în cazul lotului martor se remarcă expresia MMP-13 la nivel bazal (Fig. 7-V1). În cazul lotului fibrotic (Fig. 7-V2) și al lotului de reversie spontană a fibrozei (Fig. 7-V3), expresia proteică a MMP-13 a fost apropiată de cea a lotului martor. Administrarea pe cale orală timp de patru săptămâni a extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, a extractului gemoterapic de *Secale cereale*, a crisinei complexate cu HPBCD și a crisinei pure a indus o creștere considerabilă a numărului de celule marcate pozitiv pentru MMP-13 cu rol în recuperarea arhitecturii fiziologice a țesutului hepatic. Această creștere a expresiei proteice a MMP-13 a fost mai pronunțată la lotul căruia i s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Fig. 7-V4) comparativ loturile cărora li s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 7-V5), crisină complexată cu HPBCD (Fig. 7-V6) și crisină pură (Fig. 7-V7) (Figura 7).

Analiza expresiei genice a TIMP-1 în cazul lotului fibrotic și a lotului de reversie a fibrozei a relevat supraexpresia semnificativă a acestei proteine, comparativ cu lotul martor

($p < 0,001$). Atât în cazul lotului de reversie a fibrozei, cât și la loturile cărora li s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură s-a observat o diminuare semnificativă a expresiei genice a TIMP-1 în raport cu lotul fibrotic ($p < 0,001$). La loturile tratate cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD și crisină complexată cu HPBCD se remarcă o reducere semnificativă a expresiei genice a acestei proteine comparativ cu lotul de reversie a fibrozei ($p < 0,001$) (Figura 8).

Analiza imunohistochimică hepatică a relevat în cazul lotului de control un aspect histologic normal, fără imunopozitivitate pentru TIMP-1 (Fig. 9-V1). În cazul lotului fibrotic se remarcă supraexpresia TIMP-1 la nivelul spațiului port, al venei centro-lobulare și a cordoanelor de hepatocite (Fig. 9-V2) care este vizibilă și în cazul lotului de reversie a fibrozei (Fig. 9-V3). Loturile cărora li s-au administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Fig. 9-V4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 9-V5), crisină complexată cu HPBCD (Fig. 6-V6) și crisină pură (Fig. 6-V7) au prezentat o reducere a expresiei proteice a TIMP-1. Efectul inhibitor asupra expresiei TIMP-1 a extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD a fost semnificativ mai mare decât al extractului gemoterapic de *Secale cereale*, al crisinei complexate cu HPBCD și al crisinei pure. Șoarecii din lotul cărora li s-a administrat crisină pură au prezentat o diminuare a expresiei proteice a TIMP-1 comparativ cu lotul fibrotic, dar nu la nivelul lotului de control și nici la nivelul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figura 9).

Analiza statistică

Datele au fost analizate din punct de vedere statistic cu programul GraphPad Prism 10.1.1. utilizând metoda ANOVA *one-way*. Rezultatele au fost considerate semnificative statistic la o valoare a lui $p < 0,05$. Toate probele au fost comparate între ele, iar semnificația statistică a fost reprezentată cu (*) comparativ cu lotul martor; (#) comparativ cu lotul reversie a fibrozei; (+) comparativ cu lotul de reversie a fibrozei (lotul 3); (^) comparativ cu lotul căruia i s-a administrat crisină pură.

A.2.6. Evaluarea activității antifibroze a SC-CHR/Cyclo prin microscopică electronică

Probele de ficat pentru microscopie electronică au fost prefixate cu soluție de glutaraldehidă 2,7% în tampon fosfat 0,1M la 4°C, spălate cu tampon fosfat 0,15M (pH 7,2) și postfixate în soluție de acid osmic 2% în tampon fosfat 0,15M. Deshidratarea a fost realizată cu acetonă, iar pentru includere s-a utilizat rășină de includere epoxidică Epon 812. Pentru obținerea secțiunilor s-a utilizat cu un ultramicrotom Leica EM UC7, iar analizarea imaginilor s-a efectuat cu un microscop electronic TEM Tecnai 12 Biotwin.

În cazul lotului martor se observă ultrastructura nealterată a țesutului hepatic (Figura 10a). În schimb, în cazul lotului fibrotic se remarcă alterarea ultrastructurii celulelor hepatice, cu nuclei picnotici cu aspect neregulat, alterarea cromatinei nucleare, prezența în citoplasmă a vacuolelor cu încărcare lipidică și lipsa depozitelor de glicogen (Figura 10b). La lotul de reversie spontană a fibrozei este evidentă îmbunătățirea aspectului nuclear și reducerea vacuolelor cu încărcare lipidică (Figura 10c). Administrarea pe cale orală a extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD a ameliorat semnificativ ultrastructura hepatică, observându-se celule care își recapătă forma fiziologică, aspectul nuclear fiind aproape normal, vacuolele încărcate lipidic aproape inexistente, se refac depozitele de glicogen (Figura 10d). Celelalte formulări ajută la recuperarea ultrastructurii hepatice, fiecare lot prezentând un aspect apropiat de cel fiziologic comparativ cu lotul fibrotic și lotul de reversie spontană a fibrozei, dar în acest caz recuperarea ultrastructurii hepatice este semnificativ mai redusă decât în cazul lotului tratat cu extractul gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figura 10 e, f, g).

Activitatea 2.7. Diseminare

Raportul științific a fost încărcat pe site-ul web al proiectului (<https://proiecte.uvvg.ro/SCCHRCYCLO/>), iar rezultatele au fost diseminate prin participarea la o conferință națională/internațională și publicarea a două articole în reviste indexate ISI:

Conferințe:

1. Ciceu A, Herman H, Baltă C, Roșu M, Mladin B, Olah N-K, Hermenean A, *Improving the anti-fibrotic effects of Secale cereale rootles extract via chrysin/cyclodextrin nanocomplexes*, Modern Phytotherapy Days, Arad, April 22-23, 2024 – **Prezentare orală**

Articole ISI:

1. Ciceu, A.; Fenyvesi, F.; Hermenean, A.; Ardelean, S.; Dumitra, S.; Puticiu, M. Advancements in Plant-Based Therapeutics for Hepatic Fibrosis: Molecular Mechanisms and Nanoparticulate Drug Delivery Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 9346. <https://doi.org/10.3390/ijms25179346>
2. Ciceu, A.; Olah, N.; Herman H.; Mladin, B.; Rosu, M.; Puticiu, M., Fenyvesi, F.; Hermenean, A.; Balta, C. Enhanced anti-fibrotic effects of Secale cereale rootles extract via chrysin/cyclodextrin nanocomplexes through the inhibition of the TGF- β 1/Smad signaling. *Frontiers in Pharmacology*, **2024** (în evaluare; Manuscript ID 1457986).

Gradul de realizare a obiectivelor

Obiectiv 1. Dezvoltarea unui nou produs gemoterapic pe bază de Secale cereale, îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (SC-CHR/Cyclo). – Activitățile: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 – Etapa I (2022) – grad de realizare 100%

Obiectiv 2. Validarea efectelor antifibrotice ale produsului gemoterapic pe bază de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine într-un model experimental de fibroză hepatică la șoareci. – Activitățile: 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 (Etapa II, 2023), 3.1, 3.2, 3.3 (Etapa III, 2024) – grad de realizare 100%

Livrabilele realizate în această primă etapă sunt reprezentate de:

- obținerea de imagini de microscopie optică a ficatului pentru markerii imunohistochimici (Activitatea 2.5.);
- obținerea de imagini de microscopie electronică a ficatului (Activitatea 2.6.);
- diseminarea rezultatelor obținute sub forma unei prezentări orale și o prezentare de poster la conferințe naționale/internaționale (Activitatea 2.7.);
- publicarea a două articole în reviste indexate ISI (Activitatea 2.7.).

Indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor:

Participarea la o conferință națională/internațională.

Publicarea a 2 articole în reviste indexate ISI.

Director de proiect

Dr. Alina Ciceu

Data:26.09.2024