

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

Competiția:	Proiecte postdoctorale - PD 2022
Nr. contract:	PD 94
Cod proiect:	PN-III-P1-1.1-PD-2021-0327
Titlul :	Un nou produs pe bază de extract gemoterapic de <i>Secale cereale</i> îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine destinat să inducă reversia fibrozei
Acronim:	SCCHRCYCLO
Data începere proiect:	01/04/2022
Data finalizare proiect:	30/09/2024
Durata (luni):	30
Buget total:	250.000,00
Sursa 1 Bugetul de stat	250.000,00
Sursa 2 Alte surse atrase (cofinanțare):	-
Pagina web proiect:	https://proiecte.uvvg.ro/SCCHRCYCLO/
Instituția coordonatoare:	Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" din Arad
Director de proiect:	Dr. Alina Ciceu

Obiectivele prevăzute/realizate

Scopul general al acestui proiect a fost de a dezvolta un nou produs pe bază de complexe crisină/ciclodextrine și extract gemoterapic din rădăcina de *Secale cereale*, destinat să inducă reversia fibrozei hepatice

Obiectiv 1. Dezvoltarea unui nou produs gemoterapic pe bază de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (SC-CHR/Cyclo)

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

Gradul de îndeplinire al obiectivelor: 100%

Rezumat rezultate:

În etapa I a proiectului s-a realizat dezvoltarea, caracterizarea și evaluarea capacității antioxidante a noului produs bazat pe extract gemoterapic de seară (*Secale cereale* MG) îmbogățit cu nanocomplexe de crisină și ciclodextrine (SC-CHR/RAMEB și SC-CHR/HPBCD). Într-o primă etapă a fost obținut și caracterizat extractul gemoterapic din radicele de seară, remarcându-se o creștere semnificativă a cantității de flavonoide în cazul extractelor gemoterapice îmbogățite cu nanocomplexe de crisină și ciclodextrine comparativ cu extractul necomplexat. Ulterior, au fost obținute și caracterizate nanocomplexele de crisină cu β -ciclodextrine: RAMEB și HPBCD, formând complexe de incluziune. În cele din urmă a fost obținut și caracterizat produsul gemoterapic pe bază de seară

îmbogățit cu nanocomplexe de crisină și ciclodextrine (SC-CHR/Cyclo). Analiza LC/MS a arătat prezența unei varietăți de polifenoli, incluzând acizi fenolici și flavonoide. În extractul îmbogățit, acizii fenolici nu au fost detectați, dar flavonoidele, inclusiv cricina, au fost prezente, indicând o biodisponibilitate crescută datorită complexării cu ciclodextrine. A fost evaluată activitatea antioxidantă a extractelor folosind metodele DPPH (IC50), FRAP și CUPRAC, extractele îmbogățite cu nanocomplexe de crisină și ciclodextrine prezentând un potențial antioxidant mai ridicat. Pe baza rezultatelor obținute *in vitro*, a fost selectat pentru experimentul *in vivo* extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și ciclodextrina HPBCD (SC-CHR/HPBCD).

În etapa II a fost evaluat potențialul anti-fibrotic al extractului gemoterapic de *Secale cereale* complexat cu crisină și ciclodextrina HPBCD într-un model de fibroză hepatică indusă cu tetraclorură de carbon la șoareci. După confirmarea fibrozei, șoarecii au primit diferite tratamente pe cale orală: extractul de *Secale cereale* cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Sc-CHR-HPBCD), extract simplu de *Secale cereale* (Sc), crisină complexată cu HPBCD (CHR-HPBCD) și crisină pură (CHR). Tratamentul cu Sc-CHR-HPBCD a normalizat nivelul parametrilor serici AST, ALT și LDH. De asemenea, a fost demonstrată eficiența efectului anti-fibrotic hepatic al extractului gemoterapic de *Secale cereale* complexat cu crisină și ciclodextrina HPBCD prin analize histopatologice. Administrarea timp de patru săptămâni a Sc-CHR-HPBCD a redus prezența colagenului, ceea ce indică eficiența tratamentului. A fost evaluată activitatea anti-fibrotică hepatică prin analiza căii de semnalizare TGF β /Smad. Loturile tratate au prezentat o reducere semnificativă a expresiei genice a TGF- β 1, Smad 2 și 3 și α -SMA, precum și o creștere a expresiei Smad 7 comparativ cu lotul fibrotic și cu lotul de reversie a fibrozei. Rezultatele cele mai bune au fost obținute în urma tratamentului cu Sc-CHR-HPBCD. Expresia imunohistochimică pentru TGF- β 1 și Smad 2/3 și α -SMA a confirmat aceste rezultate.

În etapa III a fost investigat potențialul antifibrotic a SC-CHR/Cyclo prin analiza expresiei genice a MMP-1, -2, -3, -9 și TIMP-1 și analiza expresiei proteice a MMP-1, -9, -13 și TIMP-1. Loturile tratate cu Sc-CHR-HPBCD, Sc, CHR-HPBCD și CHR 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 s-au observat la lotul tratat cu Sc-CHR-HPBCD. Analiza expresiei proteice a MMP-1, -9, -13 și TIMP-1 la loturile cărora li s-a administrat Sc-CHR-HPBCD, Sc, CHR-HPBCD și CHR pură au prezentat o creștere a expresiei MMP-1 și -13 și o reducere a expresiei MMP-9 și TIMP-1, efectul cel mai pronunțat fiind observat la tratamentul cu extractul gemoterapic îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD. Prin microscopie electronică s-a observat că tratamentul cu SC-CHR/HPBCD a îmbunătățit semnificativ aspectul ultrastructural al ficatului. Aceste rezultate au demonstrat că tratamentul cu SC-CHR/HPBCD are un potențial antifibrotic semnificativ.

Activitatea 1.1. Obținerea și caracterizarea extractului gemoterapic pe bază de *Secale cereale*

S-a folosit extract gemoterapic din radicele de seară (*Secale cereale* MG), obținut din radicele proaspete recoltate în iulie 2021 din culturile organice ale firmei SC PlantExtrakt SRL (certificare EcoInspect Ro008) prin metodologia descrisă în Farmacopeea Europeană ed. 10. Pentru extracție s-a folosit un amestec glicerină 100% - alcool etilic 96% vol. în raport 1:1, iar raportul de extracție material vegetal uscat – solvent a fost de 1:20. Materialul vegetal s-a prelucrat în stare proaspătă. Extracția s-a realizat la rece, prin macerare cu agitări zilnice de 2 x 20 min, timp de 20 de zile, urmat de decantare și presarea materialului vegetal îmbibat cu solvent la maxim 400 atm. Soluția extractivă astfel obținută este maceratul glicerinic, denumit și extract gemoterapic.

Activitatea 1.2. Obținerea și caracterizarea nanocomplexelor de crisină/ciclodextrine

Crisina a fost formulată cu două β -ciclodextrine, respectiv *randomly metilat* β -ciclodextrina (RAMEB) și *hidroxipropil* β -ciclodextrina (HPBCD) în vederea formării de complexe de incluziune.

Activitatea 1.3. Obținerea și caracterizarea noului produs gemoterapic pe bază de *Secale cereale*, îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (SC-CHR/Cyclo)

Extractul gemoterapic din radicele de seară a fost amestecat cu complexe crisină-RAMEB (CHR-RAMEB) și crisină-HPBCD (CHR-HPBCD). S-au realizat complexe lichide fără a folosi vreun stabilizator.

SC = extract gemoterapic din radicele de seară – *Secale cereale* MG

SC-CHR/RAMEB = extract din radicele de seară + CHR-RAMEB complex

SC-CHR/HPBCD = extract din radicele de seară + CHR-HPBCD complex

1.3.1. Evaluarea profilului fitochimic al extractului

Dozarea spectrofotometrică a flavonoidelor totale și a polifenolilor totali

Dozarea spectrofotometrică a flavonoidelor se bazează pe reacția de complexare a ionului aluminiu de către grupările cu oxigen din molecula flavonoidelor, complex care se colorează în galben. Metoda este adaptată din Farmacopeea Română ed. X.

Condițiile experimentale sunt:

Aparat: spectrofotometru Cintra 101, GBC Australia.

Probele: câte 1 ml din cele 3 probe se amestecă cu 5 ml acetat de sodiu 10% și 3 ml clorură de aluminiu 2,5%, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Etaloane: câte 1 ml din soluții metanolice de cvercetină având concentrațiile de 2,24; 6,72; 11,20; 15,68 respectiv 22,40 $\mu\text{g/ml}$ se amestecă cu 5 ml acetat de sodiu 10 % și 3 ml clorură de aluminiu 2,5%, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Blank probe: câte 1 ml din cele 3 probe se amestecă cu 8 ml apă purificată, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Blank etaloane: 8 ml apă purificată adusă la 25 ml cu metanol.

Lungimea de undă: 430 nm, citire după 30 minute de repaus.

Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor se bazează pe realizarea unui complex albastru între grupările fenolice și reactivul fosfowolframic în mediu alcalin. Metoda este adaptată din Farmacopeea Română ed. IX.

Condițiile experimentale sunt:

Aparat: spectrofotometru Cintra 101, GBC Australia.

Probele: câte 1 ml din cele 3 probe se amestecă cu 0,5 ml reactiv fosfowolframic, apoi se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15%.

Etaloane: câte 0,1 ml din soluții metanolice de acid cafeic având concentrațiile de 12, 20, 28 respectiv 40 $\mu\text{g/ml}$ se amestecă cu 0,5 ml reactiv fosfowolframic, apoi se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15%.

Blank probe: câte 1 ml din cele 3 probe se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15%.

Blank etaloane: apă purificată.

Lungimea de undă: 715 nm, citire după 2 minute de repaus.

Fiecare probă s-a prelucrat de 3 ori și s-au realizat pe fiecare probă câte 3 citiri. Rezultatele sunt media aritmetică a determinărilor individuale.

Cantitatea de flavonoide a prezentat o creștere semnificativă în cazul extractelor gemoterapice de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine în raport cu extractul gemoterapic de seară necomplexat cu crisină și ciclodextrine. Extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și ciclodextrina RAMEB (SC-CHR/RAMEB) s-a dovedit a avea o concentrație mai mare atât de polifenoli, cât și de flavonoide totale în raport cu extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și HPBCD. În ceea ce privește polifenolii totali, aceștia au fost prezenți în cantitate ușor mai ridicată în cazul extractului gemoterapic de seară necomplexat cu crisină și ciclodextrine.

1.3.2. Analiza cromatografică pe coloană

Analiza LC/MS s-a realizat cu un sistem cromatografic Shimadzu Nexera I LC/MS - 8045 (Kyoto, Japan), care este un sistem UHPLC echipat cu pompă cuaternară și un spectrometru de masă cu cvadrupoli și ionizare prin pulverizare electronică (ESI).

Separarea s-a realizat pe o coloană Luna C18 cu fază inversă (150 mm x 4.6 mm x 3 mm, 100 Å), de la Phenomenex (Torrance, CA, USA). Temperatura de operare a coloanei a fost de 40°C.

Pentru separarea a cât mai mulți polifenoli s-a folosit un gradient de fază mobilă (tabel 2), folosind metanol (Merck, Darmstadt, Germania), apă ultrapurificată preparată cu un sistem Simplicity Ultra Pure Water Purification System (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) și acid formic, ca și modifier organic (Merck, Darmstadt, Germania). Solvenții folosiți au fost de puritate LC/MS. Faza mobilă a fost trecută prin coloana cromatografică cu o viteză de 0,5 ml/min, iar timpul total de analiză a fost de 35 minute.

Detecția componentelor s-a realizat cu un spectrometru de masă cu cvadrupoli având sursa de ioni cu electrospray (ESI). Pentru monitorizarea reacțiilor multiple (MRM), pentru detectarea cu sensibilitate maximă, s-a folosit atât modul negativ, cât și modul pozitiv de detectare. Temperatura interfeței a fost de 300°C, gazul de uscarea a fost azotul la 35 psi, 10 l/min, iar potențialul de capilar a fost setat la +3000 V.

În cazul fiecărui standard, la fiecare concentrație s-au injectat câte 1 μl. Identificarea s-a realizat prin compararea timpilor de retenție, a spectrelor de masă respectiv a tranzițiilor principale din aceste spectre a substanțelor standard cu cele ale compușilor separați din probele analizate. Determinările cantitative s-au realizat pe baza curbilor de calibrare a fiecărei substanțe standard, la nivelul tranziției principale. În acest sens pentru fiecare standard s-a determinat limita de detecție respectiv limita de cuantificare. În tabelul 3 sunt date detaliile din spectrele de masă.

Extractul de *Secale cereale* MG și cele îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine s-au diluat cu metanol, identic cu cel folosit la analiza LC/MS, în raport 1 la 10. Soluțiile diluate s-au trecut prin microfilter de 0,45 μm (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Din fiecare probă de extract simplu s-au injectat câte 1 μl, iar din extractele îmbogățite câte 10 μl.

Rezultatele datelor determinărilor cantitative sunt prezentate în tabelul 4.

Analiza LC/MS a relevat faptul că extractul gemoterapic de seară are în compoziție o gamă variată de polifenoli, atât acizi fenolici, cât și flavonoide. În ceea ce privește acizii fenolici, concentrațiile cele mai ridicate au fost de acid cafeic și acid *trans-p*-cumaric. Flavonoidele care au fost identificate în cantitate mai mare au fost reprezentate de hiperozidă, rutozidă, naringenină și crisină. În cazul extractului gemoterapic de seară îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, acizii fenolici nu au putut fi detectați. În schimb, flavonoidele sunt regăsite, ceea ce evidențiază creșterea biodisponibilității în cazul complexării acestora cu ciclodextrinele. Dintre flavonoidele identificate, crisina a fost găsită a fi în cea mai mare concentrație în cazul ambelor preparate fitoterapeutice pe bază de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine.

Activitatea 1.4. Analiza *in vitro* a activității antioxidante

Efectul antioxidant al extractelor gemoterapice de seară este probabil datorat conținutului în polifenoli de tipul flavonoidelor și acizilor fenolici. Efectul antioxidant al extractului gemoterapic de seară și al extractului gemoterapic de seară îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine s-a evidențiat prin mai multe metode spectrale: DPPH calculând IC₅₀, FRAP și CUPRAC, folosind metodele standard.

În tabelul 5 sunt prezentate rezultatele obținute.

Se observă un potențial antioxidant mai mare în cazul extractelor gemoterapice de seară îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, potențial care a fost confirmat prin toate cele trei metode utilizate.

Activitatea 1.5. Selectarea celui mai eficient extract gemoterapic pe bază de *Secale cereale*, îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrină în vederea testării *in vivo*

Pe baza rezultatelor obținute *in vitro*, a fost selectat pentru realizarea experimentului *in vivo* cel mai bun produs gemoterapic pe bază de *Secale cereale* îmbogățite cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine, respectiv extractul gemoterapic de seară complexat cu crisină și ciclodextrina HPBCD (SC-CHR/HPBCD).

Activitatea 2.1. Inducerea experimentală a fibrozei hepatice cu CCl₄

Pentru inducerea experimentală a fibrozei hepatice s-au utilizat șoareci CD1 masculi, albi, în vârstă de 8 săptămâni. Aceștia au fost crescuți în condiții standard de crescătorie în Biobaza de Animale de Laborator din cadrul Institutului de Științe ale Vieții „Aurel Ardelean” al Universității de Vest „Vasile Goldiș” din Arad. Șoarecii au fost împărțiți în șapte loturi experimentale a câte 15 indivizi. Toate procedurile experimentale au fost aprobate de Comisia de Etică a Universității de Vest „Vasile Goldiș” din Arad (Aviz nr. 16/6.07.2021). Primul lot a fost reprezentat de lotul martor. Șoarecilor din loturile 2, 3, 4, 5, 6 și 7 li s-a administrat intraperitoneal de două ori pe săptămână timp de opt săptămâni 2 ml/kg corp CCl₄ dizolvată în ulei de măsline 20%, v/v. Șoarecii din lotul 2 (lotul fibrotic) au fost eutanasiați la 72 de ore de la ultima administrare intraperitoneală în vederea confirmării fibrozei hepatice. Lotul 3 (lotul de control fibrotic) a fost utilizat în vederea evidențierii reversiei spontane a fibrozei hepatice. În vederea evaluării efectului antifibrotic al extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, tratamentul a început la finalul celor opt săptămâni de administrare a CCl₄. Tratamentul a fost administrat zilnic, prin gavaj, timp de patru săptămâni cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Sc-CHR-HPBCD) (lotul 4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Sc) (lotul 5), crisină complexată cu HPBCD (CHR-HPBCD) (lotul 6), crisină pură (CHR) (lotul 7). După douăsprezece săptămâni, șoarecii din loturile 1, 3, 4, 5, 6, 7 au fost sacrificați la 24 de ore de la ultima administrare sub anestezie cu ketamină:xilazină (100 mg/kg:10 mg/kg). Crisina (5,7-dihidroxi-flavonă) pură a fost achiziționată de la Alfa Aesar (ThermoFisher Scientific, Kandel, Germania) și a fost solubilizată în prealabil administrării în 0,7% carboximetil celuloză (CMC). Doza de crisină a fost de 25 mg/kg corp/zi, indiferent de formulare.

Activitatea 2.2. Evaluarea activității antifibroze a SC-CHR/Cyclo prin analize biochimice

Evaluarea concentrației serice a markerilor hepatici (AST, ALT) și LDH a fost efectuată pe un analizor automat de biochimie (Mindray BS-120).

Evaluarea AST pune în evidență diminuarea marcantă a acestei valori în cazul lotului fibrotic. Administrarea produsului extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD a condus la normalizarea acestui parametru ajungând la o valoare apropiată de cea a lotului de control (Figura 1).

În cazul ALT se constată valori crescute în cazul tuturor loturilor experimentale comparativ cu lotul de control. Valori semnificativ mai crescute comparativ cu lotul martor se remarcă în cazul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, al lotului de reversie spontană a fibrozei și a lotului cărui i s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* (Figura 2).

Evaluarea LDH pune în evidență o scădere semnificativă statistic a activității acestei enzime comparativ cu lotul martor în cazul lotului fibrotic și a loturilor cărora li s-a administrat *Secale cereale*, CHR-HPBCD și CHR. De asemenea, se remarcă valori pozitive a activității acestei enzime în cazul lotului cărui i s-a administrat Sc-CHR-HPBCD. În cazul tuturor loturilor cărora li s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD se observă valori superioare semnificative statistic ale activității LDH comparativ cu lotul fibrotic (Figura 3).

În cazul tuturor parametrilor analizați mai sus se constată normalizarea acestora în urma administrării extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, în cazul acestui lot constatându-se valori asemănătoare cu cele regăsite la lotul martor.

Activitatea 2.3. Evaluarea activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin analiză histopatologică

Efectele antifibrotice *in vivo* ale SC-CHR/Cyclo au fost evaluate prin analiza histopatologică și imunohistochimică a depunerilor de collagen de la nivel hepatic. Biopsiile de ficat ale loturilor experimentale au fost fixate în 4% formalină în tampon fosfat, incluse în parafină și secționate la o grosime de 5 μm. Secțiunile histologice au fost apoi colorate cu hematoxilină și eozină (H&E) și colorație Tricromică Van Gieson în vederea evidențierii modificărilor histopatologice și a acumulărilor de collagen. 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.

În cazul șoarecilor din lotul martor analiza histologică a ficatului a evidențiat prezența unei arhitecturi hepatice normale. Hepatocitele au un aspect normal. Cordoanele de hepatocite converg radial spre vena centrolobulară fără proliferare de țesut conjunctiv intralobular (Figura 4-V1). Ficatul șoarecilor din lotul fibrotic a prezentat modificări majore în ceea ce privește morfologia hepatică: evidente depuneri de collagen, formarea de pseudolobuli și infiltrarea de celule inflamatorii în zonele interstițiale hepatice. De asemenea, se remarcă prezența hepatocitelor cu steatoză micro- și macroveziculară, „hepatocitelor spumoase” (*foamy*) perivenulare hipertrofiate cu acumulare masivă de grăsime microveziculară și congestia capilarelor sinusoidale (Figura 4-V2). În cazul șoarecilor din lotul de control fibrotic modificările histopatologice sunt reprezentate de prezența țesutului fibros și a pseudo-lobulilor, precum și a infiltratelor de celule inflamatorii. De asemenea, s-au evidențiat hepatocite hipertrofiate cu citoplasmă spumoasă (Figura 4-V3). Loturile cărora li s-a administrat timp de patru săptămâni tratament cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figura 4-V4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Figura 4-V5), crisină complexată cu HPBCD (Figura 4-V6) și crisină pură (Figura 4-V7) au prezentat o diminuare a ariilor fibrotice, în raport cu cele observate la lotul fibrotic. La aceste loturi persistă infiltratele inflamatorii la nivelul ariilor periportale, congestia sinusoidelor și microsteatoza hepatică. În cazul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, aspectul histologic al ficatului este apropiat de cel al lotului martor (Figura 4-V4).

Pentru evaluarea fibrozei hepatice a fost utilizată colorația tricromică Fouchet van Gieson. Sinteza crescută de colagen care însoțește procesul de fibrogeneză determină formarea de depozite de colagen care reduc parenchimul hepatic funcțional. În cazul lotului martor, analiza histologică a evidențiat o arhitectură lobulară normală, fără proliferare de colagen (Figura 5-V1). Spre deosebire de acesta, lotul cărui i s-a administrat CCl₄ a prezentat modificări importante materializate prin prezența pseudolobulilor caracteristici procesului de fibrozare și formarea de septele fibrotice perilobulare (Figura 5-V2). La două săptămâni de la administrarea ultimei doze de CCl₄, fibroza perilobulară persistă la nivelul lotului de reversie *de novo* a fibrozei (Figura 16-V3), dar mai redusă comparativ cu lotul fibrotic. În cazul lotului tratat cu crisină pură se remarcă prezența colagenului insular (Figura 5-V6). În ceea ce privește loturile cărora li s-a administrat CHR-HPBCD (Figura 5-V6) și extract gemoterapic de *Secale cereale* (Figura 5-V5) septele fibrotice sunt întrerupte, iar colagenul apare mai mult pericentrolobular. Arhitectura hepatică cea mai apropiată de lotul martor a fost observată în cazul lotului tratat timp de patru săptămâni cu Sc-CHR-HPBCD la nivelul cărui colagenul se menține sporadic (Figura 5-V4). Sc-CHR-HPBCD a inhibat procesul de fibrogeneză hepatică prin diminuarea grosimii septelor conjunctive care devin discontinue.

Activitatea 2.4. Evaluarea activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin analiza căii de semnalizare TGF- β (expresia imunohistochimică a proteinelor; expresia genică)

Expresia ARNm a TGF- β 1 a prezentat o creștere semnificativ statistică în cazul lotului fibrotic cărui i s-a administrat CCl₄ timp de opt săptămâni comparativ cu lotul martor ($p < 0,001$). Expresia genică a TGF- β 1 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 și cu lotul de reversie a fibrozei ($p < 0,001$), cea mai accentuată reducere fiind înregistrată pentru lotul care a fost tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figura 6).

Analiza imunohistochimică hepatică a evidențiat în cazul lotului martor un aspect histologic normal, fără imunopozitivitate pentru TGF- β 1 (Figura 6-V1). După opt săptămâni de administrare a CCl₄, creșterea imunopozitivității pentru TGF- β 1 a fost vizibilă la nivelul celulelor non-parenchimale și al hepatocitelor (Figura 6-V2). În cazul lotului de control fibrotic se remarcă o acumulare a celulelor marcate pozitiv pentru TGF- β 1 în jurul septelor fibrotice și periportal (Figura 6-V3), expresie care este ușor redusă comparativ cu lotul cărui i s-a administrat CCl₄ datorită faptului că ficatul a avut o perioadă de 2 săptămâni de recuperare *de novo*. Loturile tratate cu extract gemoterapic de *Secale cereale* (Figura 6-V5), crisină complexată cu HPBCD (Figura 6-V6) și crisină pură (Figura 6-V7) au prezentat o scădere semnificativă a expresiei proteice a TGF- β 1 comparativ cu lotul fibrotic, în special în cazul lotului cărui i s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figura 6-V4).

În ceea ce privește expresia ARNm a Smad 2 și 3, aceasta a crescut semnificativ statistic la lotul fibrotic în raport cu lotul martor ($p < 0,001$). În cazul lotului de reversie *de novo* al fibrozei această expresie a prezentat de asemenea o creștere semnificativă statistic comparativ cu lotul martor ($p < 0,001$). În schimb, 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 au prezentat o reducere semnificativă statistic comparativ cu lotul fibrotic și cu cel de reversie a fibrozei ($p < 0,001$) (Figura 7 și 8).

În cazul lotului martor, expresia proteică a Smad 2/3 a fost sub limita de detecție a kitului utilizat (Figura 9-V1). În cazul lotului fibrotic, analiza imunohistochimică hepatică a relevat o creștere a expresiei proteice a Smad 2/3 la nivelul spațiilor interlobulare și perivascular (Figura 9-V2). Această creștere este prezentă în cazul lotului de reversie spontană a fibrozei, dar sensibil mai redus decât în cazul lotului fibrotic (Figura 9-V3). Loturile cărora li s-au administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figura 9-V4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Figura 9-V5), crisină complexată cu HPBCD (Figura 9-V6) și crisină pură (Figura 9-V7) au prezentat o diminuare semnificativă a expresiei proteice a Smad 2/3. Efectul inhibitor asupra expresiei Smad 2/3 al extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD a fost semnificativ mai mare comparativ administrarea extractului gemoterapic de *Secale cereale*, a crisinei complexate cu HPBCD sau a crisinei pure. Șoarecii cărora li s-a administrat crisină pură au prezentat o diminuare a expresiei proteice a Smad 2/3 comparativ cu lotul fibrotic (Figura 9-V7), dar aceasta nu a fost la nivelul lotului martor și nici la nivelul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD. Aceste rezultate sugerează proprietatea de potențare a compușilor care intră în componența extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD și de a bloca activarea celulelor hepatice stelate indusă de TGF- β 1 prin inhibarea transducției semnalului Smad 2/3, contribuind în acest fel la reversia fibrozei hepatice. Diminuarea expresiei genice și proteice a Smad 2/3 care inhibă calea de semnalizare TGF- β /Smad poate fi un mecanism cheie prin care extractul gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD inhibă fibroza hepatică indusă cu CCl₄. Administrarea timp de patru săptămâni a extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD a exercitat un efect antifibrotic asupra fibrozei hepatice induse de CCl₄, a diminuat numărul celulelor hepatice stelate activate, a reechilibrat calea de semnalizare TGF- β /Smad, fapt demonstrat de diminuarea expresiei genice și proteice a TGF- β 1 și Smad 2/3.

Smad 7 urmează un model inversat în comparație cu expresia genică observată la Smad 2 și 3. Extractul gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură au indus o creștere semnificativă a expresiei genice a Smad 7, comparativ cu lotul cărui i s-a administrat CCl₄ și cu cel de control fibrotic (lotul 3) ($p < 0,001$) (Figura 10).

α -SMA reprezintă un marker al fibrozei hepatice utilizat pentru evidențierea celulelor hepatice stelate activate. În vederea evaluării efectului administrării extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD asupra reglării sintezei de α -SMA, markerul activării celulelor hepatice stelate, au fost efectuate analize asupra expresiei genice și expresiei proteice la nivel tisular hepatic.

Toate loturile experimentale prezintă un nivel crescut al expresiei genice a α -SMA comparativ cu lotul de control. Atât în cazul lotului fibrotic, cât și în cazul lotului de reversie a fibrozei se remarcă nivele înalte semnificativ statistic comparativ cu lotul de control și cu toate celelalte loturi experimentale, dar semnificativ mai scăzut în cazul lotului de reversie spontană a fibrozei. Loturile cărora li s-a administrat tratament cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură prezintă nivelul de expresie α -SMA semnificativ crescute față de lotul de control, dar în comparație cu loturile de fibroză și cel de reversie spontană a fibrozei, valorile acestora sunt semnificativ statistic mai reduse. În cazul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD se observă valori care tind spre valorile regăsite în lotul de control și mult reduse față de loturile 2 și 3 (Figura 11).

Administrarea timp de opt săptămâni a CCl₄ a indus o creștere semnificativă a imunopozitivității acestei proteine la nivel hepatic (Figura 12-V2). CCl₄ a stimulat activarea celulelor hepatice stelate în acest model experimental de fibroză hepatică la șoareci, fapt evidențiat de creșterea expresiei genice și a sintezei proteice a α -SMA. Această imunopozitivitate s-a menținut ridicată la două săptămâni după întreruperea administrării CCl₄ (Figura 12-V3). Loturile cărora li s-au administrat timp de patru săptămâni tratament cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figura 12-V4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Figura 12-V5), crisină complexată cu HPBCD (Figura 12-V6) și crisină pură (Figura 12-V7) au prezentat o diminuare a sintezei proteice a α -SMA, ceea ce sugerează rolul acestor formulări în creșterea capacității crisinei și a extractului gemoterapic de *Secale cereale* de a inhiba activarea celulelor hepatice stelate, ca celule cheie implicate în procesul de fibrogeneză. Reducerea numărului de celule marcate α -SMA a fost mai accentuată în cazul lotului căruia i s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Figura 12-V4).

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 fibrotic; (+) comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3); (^) comparativ cu lotul căruia i s-a administrat crisină pură.

Activitatea 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 colagenaza 1 sau colagenază interstițială, este principala protează care degradează colagenul de tip I, principalul tip de colagen prezent în ficatul afectat de fibroza hepatică.

Expresia ARMm 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 căruia i s-a administrat crisină complexată cu HPBCD a prezentat o creștere semnificativ statistică în raport cu lotul martor ($p < 0,001$) (**Figura 13**).

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 μ m. 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 colagenaze

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 colagenului fibrilar de tip I, ceea ce sugerează implicarea acestei colagenaze în reversia fibrozei hepatice (**Figura 14**).

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 15-17**).

Analiza imunohistochimică hepatică a evidențiat în cazul lotului martor un aspect histologic normal, fără imunopozitivitate pentru MMP-9 (Fig. 18-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. 18-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. 18-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. 18-V4), în raport cu loturile cărora li s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale*, crisină complexată cu HPBCD și crisină pură (**Figura 18**).

Din punct de vedere imunohistochimic, în cazul lotului martor se remarcă expresia MMP-13 la nivel bazal (Fig. 19-V1). În cazul lotului fibrotic (Fig. 19-V2) și al lotului de reversie spontană a fibrozei (Fig. 19-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. 19-V4) comparativ loturile cărora li s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 19-V5), crisină complexată cu HPBCD (Fig. 19-V6) și crisină pură (Fig. 19-V7) (**Figura 19**).

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 20**).

Analiza imunohistochimică hepatică a relevat în cazul lotului de control un aspect histologic normal, fără imunopozitivitate pentru TIMP-1 (Fig. 21-V1). În cazul lotului fibrotic se remarcă supraexpresia TIMP-1 la nivelul spațiului port, al venei centro-lobulare și a cordoanelor de hepatocite (Fig. 21-V2) care este vizibilă și în cazul lotului de reversie a fibrozei (Fig. 21-V3). Loturile cărora li s-au administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Fig. 21-V4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 9-V5), crisină complexată cu HPBCD (Fig. 21-V6) și crisină pură (Fig. 21-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 21**).

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 cărui i s-a administrat crisină pură.

Activitatea 2.6. Evaluarea activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin microscopie 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 acetona, 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 22a**). 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 22b**). La lotul de reversie spontană a fibrozei este evidentă îmbunătățirea aspectului nuclear și reducerea vacuolelor cu încărcare lipidică (**Figura 22c**). 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 22d**). 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 22 e, f, g**).

1. Impactul rezultatelor obținute

Peste 180 de milioane de oameni din întreaga lume sunt afectați de o formă de afecțiuni hepatice cronice care pot fi induse de diferiți agenți etiologici, precum consumul cronic de alcool, infecțiile

cronice cu virusul hepatitei B și C, evoluția steatohepatitei non-alcoolice în obezitate și diabet [1-2]. Indiferent de etiologie, toate afecțiunile hepatice cronice prezintă o patofiziologie comună, evoluând de la inflamație moderată până la severă ce conduce la fibroză și, în cele din urmă, la ciroză [3]. Printre afecțiunile tractului gastro-intestinal, ciroza reprezintă cea mai comună cauză de deces non-neoplazică în Europa și SUA și este a 7-a cea mai frecventă cauză de deces în țările occidentale [2]. Netratată, fibroza hepatică poate determina apariția cirozei hepatice avansate, a hipertensiunii portale, a carcinomului hepatocelular și a insuficienței hepatice [3-5]. Fibroza hepatică poate fi reversibilă, în timp ce ciroza, consecința finală a fibrozei este, în general, ireversibilă [6], având ca rezultat un impact economic și social semnificativ.

În acest context, dezvoltarea unui nou produs pe bază de complexe crisină/ciclodextrine și extract gemoterapic din rădăcină de *Secale cereale* conceput să inducă reversia fibrozei hepatice are un impact științific semnificativ, oferind o nouă perspectivă de tratament pentru fibroză hepatică.

Bibliografie:

- [1] El-Serag, H.B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, **2012**; *142*, 1264-1273.e1.
- [2] Rehm, J.; Samokhvalov, A.V.; Shield, K.D. Global burden of alcoholic liver diseases. *J Hepatol*. **2013**; *59*, 160-8.
- [3] Xu, X.; Zheng, L.; Yuan, Q.; Zhen, G.; Crane, J.L.; Zhou, X.; Cao, X. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Research*, **2018**, *6*, 2.
- [4] Sun, Q.; Wang, Y.; Zhang, J.; Lu, J. ENMD-1068 inhibits liver fibrosis through attenuation of TGF- β 1/Smad2/3 signaling in mice. *Scientific Reports*, **2017**, *7*, 5498.
- [5] Aydin, M.M.; Akcali, K.C. Liver fibrosis. *Turkish Journal of Gastroenterology*, **2018**, *29*, 14-21.
- [6] Friedman, S.L.; Bansal, M.B. Reversal of hepatic fibrosis - fact or fantasy? *Hepatology*. **2006**; *43*, S82-8.

Indicatori de rezultat:

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).

Prezentări la conferințe:

1. **Ciceu A**, Fenyvesi F, Olah N, Hermenean A, *Cellular and molecular pathways involved in liver fibrosis and the potential anti-fibrotic role of Secale cereale extract reinforced with chrysin/cyclodextrin nanocomplexes*, Arad Academic Days, XXXII-nd Edition, May 25-29, 2022, ISBN 978-973-664-920-2 – **Prezentare orală**
2. **Ciceu A**, Fenyvesi F, Olah N, Hermenean A, *Patogeneza fibrozei hepatice și potențialul efectelor antifibrotice al extractului de Secale cereale îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine*, Școala de Primăvară de Gemmaeterapie, Arad, 3-5 iunie 2022 – **Prezentare orală**

3. **Ciceu A**, Olah N-K, Hermenean A, *The role of gemmotherapeutic extract of Secale cereale enriched with chrysin/cyclodextrin nanocomplexes in the remodeling of the extracellular matrix at liver level*, Modern Phytotherapy Days, Arad, May 23-25, 2023 – **Prezentare orală**
4. **Ciceu A**, Olah N-K, Fenyvesi F, Hermenean A, *Phytochemical and antioxidant analysis of the gemmotherapy-based Secale cereale extract reinforced with chrysin/cyclodextrin nanocomplexes*, 44th Annual Symposium of the Institute of Cellular Biology and Pathology “Nicolae Simionescu” and 40th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology, Bucharest, November 16-18, 2023, Bulletin of Romanian Society for Cell Biology, No. 44, Poster abstracts, p. 79-80, ISBN 978-973-664-946-2 – **Poster**
5. **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**

Director de proiect
Dr. Alina Ciceu
Data: 17.09.2024

