

# Raport științific PD 94/2022

## Etapa II 2023

### 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:

În cadrul acestei etape s-au realizat o serie de activități în vederea evaluării potențialului anti-fibrotic al extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine. **Activitatea 2.1.** a fost reprezentată de realizarea *design*-ului experimental de model de fibroză hepatică indusă cu tetraclorură de carbon (CCl<sub>4</sub>) la șoareci CD1 masculi adulți. După confirmarea fibrozei hepatice, șoarecilor li s-au administrat pe cale orală tratamentul cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Sc-CHR-HPBCD), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Sc), crisină complexată cu HPBCD (CHR-HPBCD) și crisină pură (CHR). În cadrul **activității 2.2.** a fost efectuată analiza parametrilor biochimici serici AST, ALT și LDH. Tratamentul cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD a determinat normalizarea acestor parametri. **Activitatea 2.3** a presupus analiza histopatologică a biopsiilor de ficat de la șoarecii incluși în experiment pentru evaluarea activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo. Probele de la șoarecii cărora li s-a administrat timp de patru săptămâni tratament cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD au prezentat o histo-arhitectură apropiată de lotul martor și absența colagenului insular, ceea ce evidențiază eficiența acestui tratament. În cadrul **activității 2.4.** s-a efectuat evaluarea activității antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin analiza căii de semnalizare TGF-β/Smad. Aceasta a relevat faptul că loturile tratate au prezentat o diminuare semnificativă a expresiei genice a TGF-β1, Smad 2 și 3 și α-SMA și o creștere semnificativă a expresiei genice a Smad 7 în raport cu lotul fibrotic și lotul de reversie *de novo* al fibrozei, cele mai bune rezultate fiind obținute în cazul lotului tratat cu Sc-CHR-HPBCD datorită capacității sale de a diminua numărul celulelor hepatice stelate activate și de a reechilibra calea de semnalizare TGF-β/Smad. Expresia imunohistochimică hepatică pentru TGF-β1 și Smad 2/3 și α-SMA a prezentat aceeași tendință ca și în cazul expresiei genice. **Activitatea 2.5** a vizat diseminarea rezultatelor sub forma a unei prezentări orale și o prezentare de poster la două conferințe naționale/internaționale.

## II. Descrierea științifică

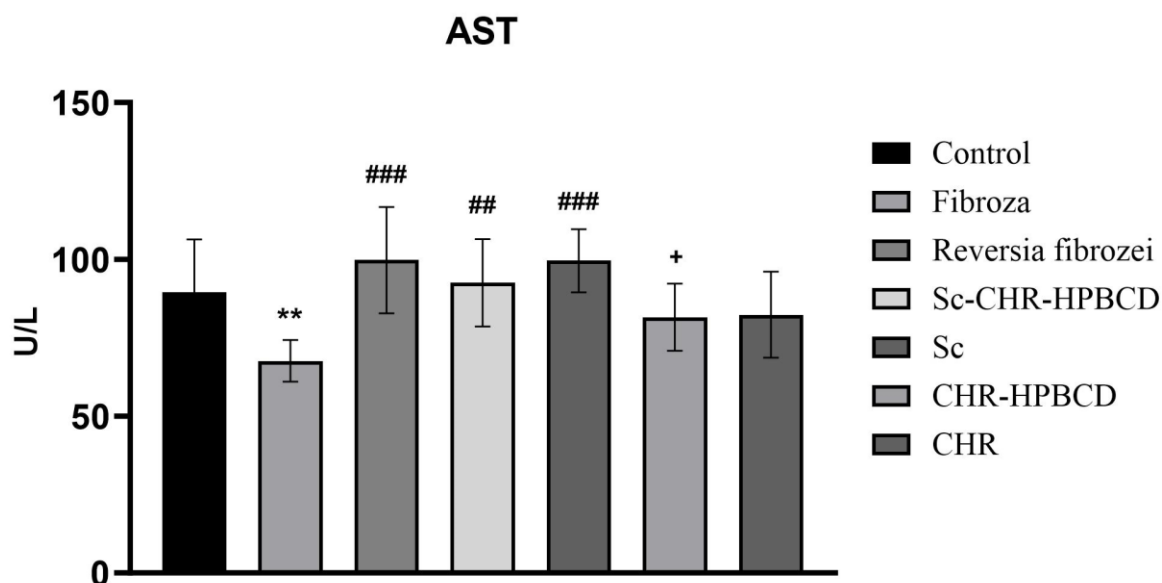
### Activitatea 2.1. Inducerea experimentală a fibrozei hepatice cu CCl<sub>4</sub>

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 CCl<sub>4</sub> 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 CCl<sub>4</sub>. 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-dihydroxiflavonă) 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 antifibrotice a SC-CHR/Cyclo prin analize biochimice

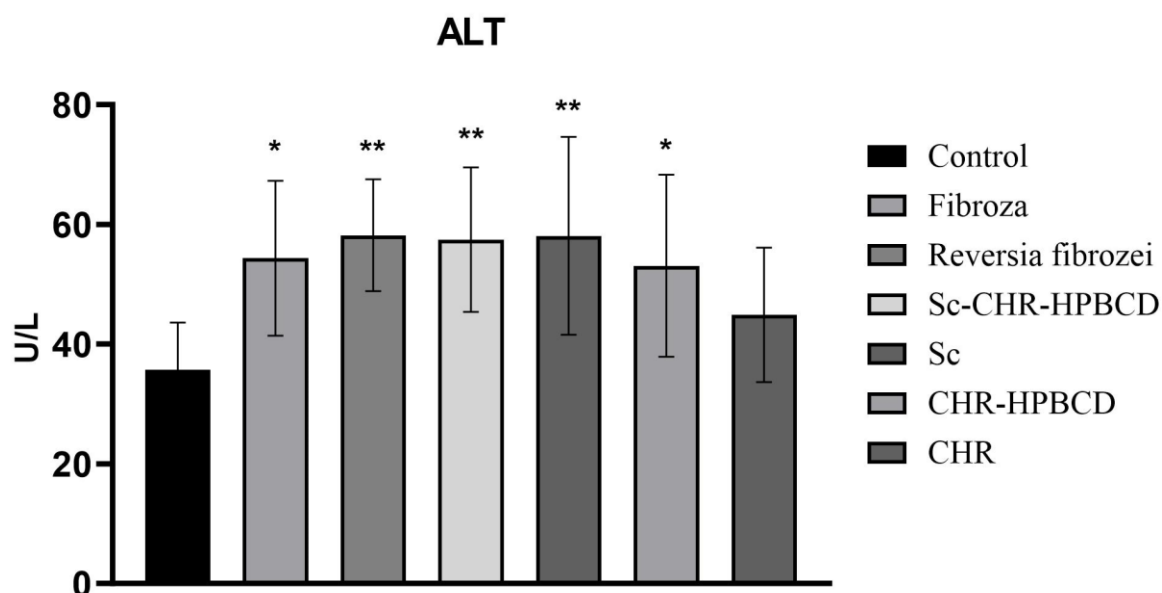
Evaluarea concentrației serice a markerilor hepatici (AST, ALT) și LDH a fost efectuată pe un analizor automat de biochimie (Mindray BS-120).

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 (Fig. 1).



**Figura 1. Analiza aspartataminotransferazei (TGO) în cazul loturilor experimentale.** \*\* $p < 0,01$  comparativ cu lotul martor; ### $p < 0,001$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); ## $p < 0,01$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); + $p < 0,05$  comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3)

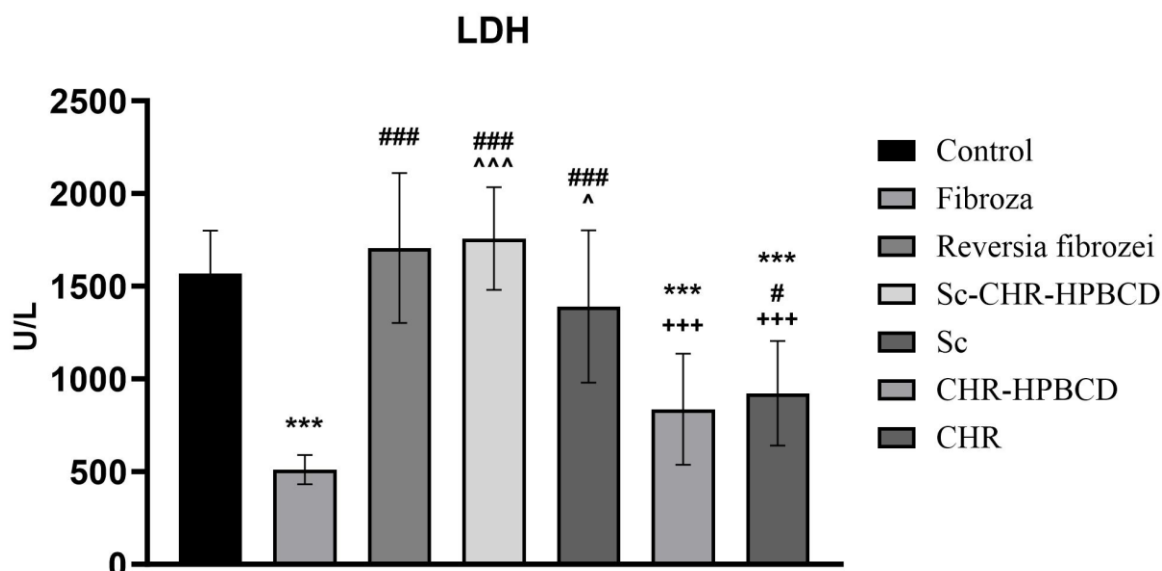
În cazul ALT se constată valori crescute în cazul tuturor loturilor experimentale comparativ cu lotul de control. Valori semnificativ mai crescute comparativ cu lotul martor se remarcă în cazul lotului tratat cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, al lotului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



**Figura 2. Analiza alaninaminotransferazei (TGP) în cazul loturilor experimentale.** \*\* $p < 0,01$  comparativ cu lotul martor; \* $p < 0,05$  comparativ cu lotul martor

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 căruia 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 (Fig. 3).



**Figura 3. Analiza lactat dehidrogenazei (LDH) la loturile experimentale.** \*\*\* $p < 0,001$  comparativ cu lotul martor; ### $p < 0,001$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); # $p < 0,05$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); +++ $p < 0,001$  comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3); ^^ $p < 0,001$  comparativ cu lotul căruia i s-a administrat crisină pură; ^ $p < 0,05$  comparativ cu lotul căruia i s-a administrat crisină pură

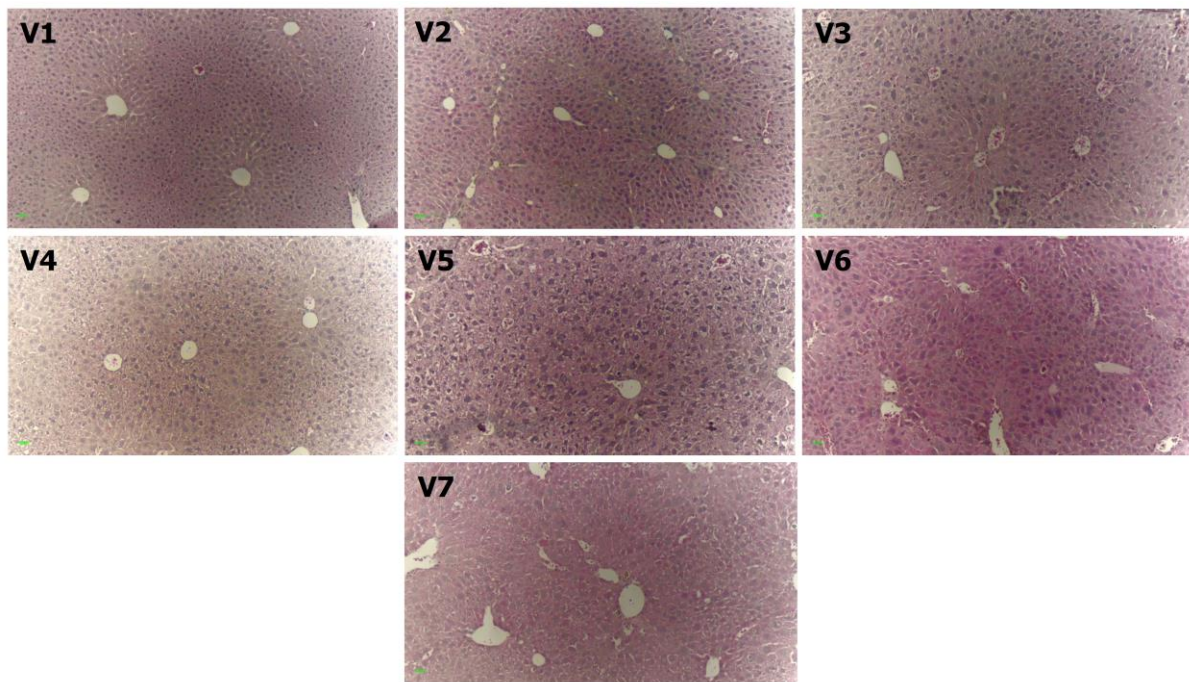
În cazul tuturor parametrilor analizați mai sus se constată normalizarea acestora în urma administrării extractului gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD, în cazul acestui lot constatându-se valori asemănătoare cu cele regăsite la lotul martor.

### 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 colagen de la nivel hepatic. Biopsiile de ficat ale loturilor experimentale au fost fixate în 4% formalină în tampon fosfat, incluse în parafină și secționare la o grosime de 5  $\mu\text{m}$ . Secțiunile histologice au fost apoi colorate cu hematoxilina și eozină (H&E) și colorație Tricromică Van Gieson în vederea evidențierii modificărilor histopatologice și a acumulărilor de colagen. 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 (Fig. 4-V1). Ficatul șoarecilor din lotul fibrotic a prezentat modificări majore în ceea ce privește

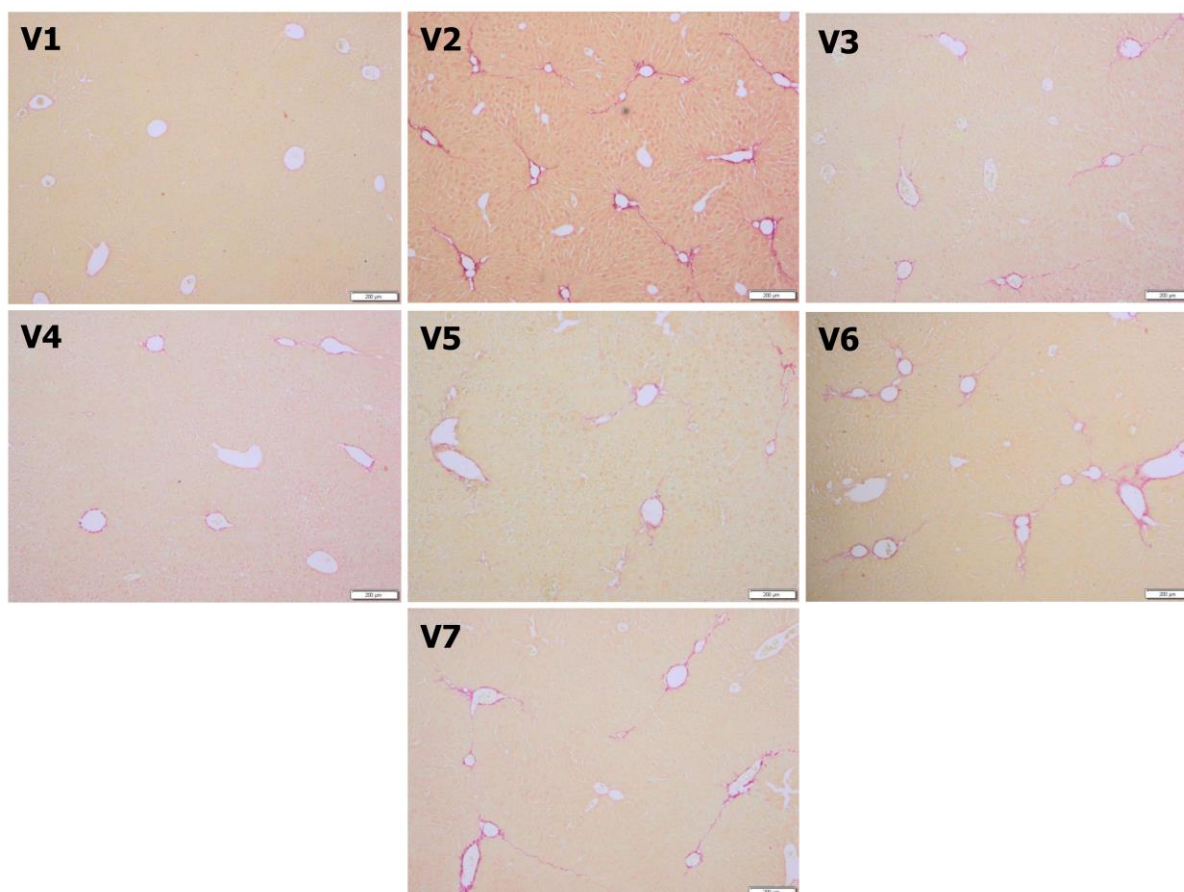
morfologia hepatică: evidente depuneri de colagen, formarea de pseudolobuli și infiltrarea de celule inflamatorii în zonele interstițiale hepatice. De asemenea, se remarcă prezența hepatocitelor cu steatoză micro- și macro-veziculară, „hepatocitelor spumoase” (*foamy*) perivenulare hipertrofiate cu acumulare masivă de grăsime microveziculară și congestia capilarelor sinusoidale (Fig. 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 (Fig. 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 (Fig. 4-V4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 4-V5), crisină complexată cu HPBCD (Fig. 4-V6) și crisină pură (Fig. 2-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 (Fig. 4-V4).



**Figura 4. Aspectul histologic al loturilor experimentale.** V1 - control; V2 - fibroză; V3 - reversia fibrozei; V4 - Sc-CHR-HPBCD; V5 - Sc; V6 - CHR-HPBCD; V7 - CHR; Col. H&E, 100  $\mu$ m

Pentru evaluarea fibrozei hepatice a fost utilizată colorația tricromică Fouchet van Gieson. Sinteza crescută de colagen care însoțește procesul de fibrogenză 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 (Fig. 5-V1). Spre deosebire de acesta, lotul cărui i s-a administrat  $CCl_4$  a prezentat modificări importante materializate prin prezența pseudolobulilor caracteristici procesului de fibrozare și formarea de septa fibrotice perilobulare (Fig. 5-V2). La două săptămâni de la administrarea ultimei doze de  $CCl_4$ , fibroza perilobulară persistă la nivelul lotului de reversie *de novo* a

fibrozei (Fig. 5-V3), dar mai redusă comparativ cu lotul fibrotic. În cazul lotului tratat cu crisină pură se remarcă prezența collagenului insular (Fig. 5-V6). În ceea ce privește loturile cărora li s-a administrat CHR-HPBCD (Fig. 5-V6) și extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 5-V5) septele fibrotice sunt întrerupte, iar collagenul 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 căruia collagenul se menține sporadic (Fig. 5-V4). Sc-CHR-HPBCD a inhibat procesul de fibrogenză hepatică prin diminuarea grosimii septelor conjunctive care devin discontinue.

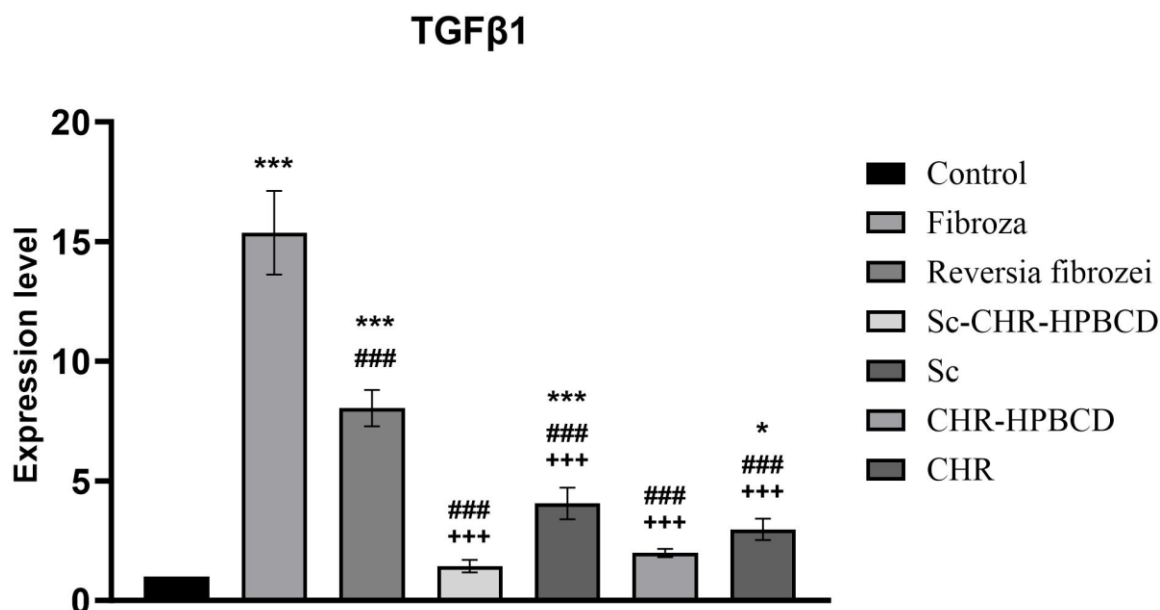


**Figura 5. Evidențierea proliferării de collagen la loturile experimentale cu ajutorul colorației tricromice Fouchet Van Gieson. V1 - control; V2 - fibroză; V3 - reversia fibrozei; V4 - Sc-CHR-HPBCD; V5 - Sc; V6 - CHR-HPBCD; V7 - CHR; 200 μm**

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

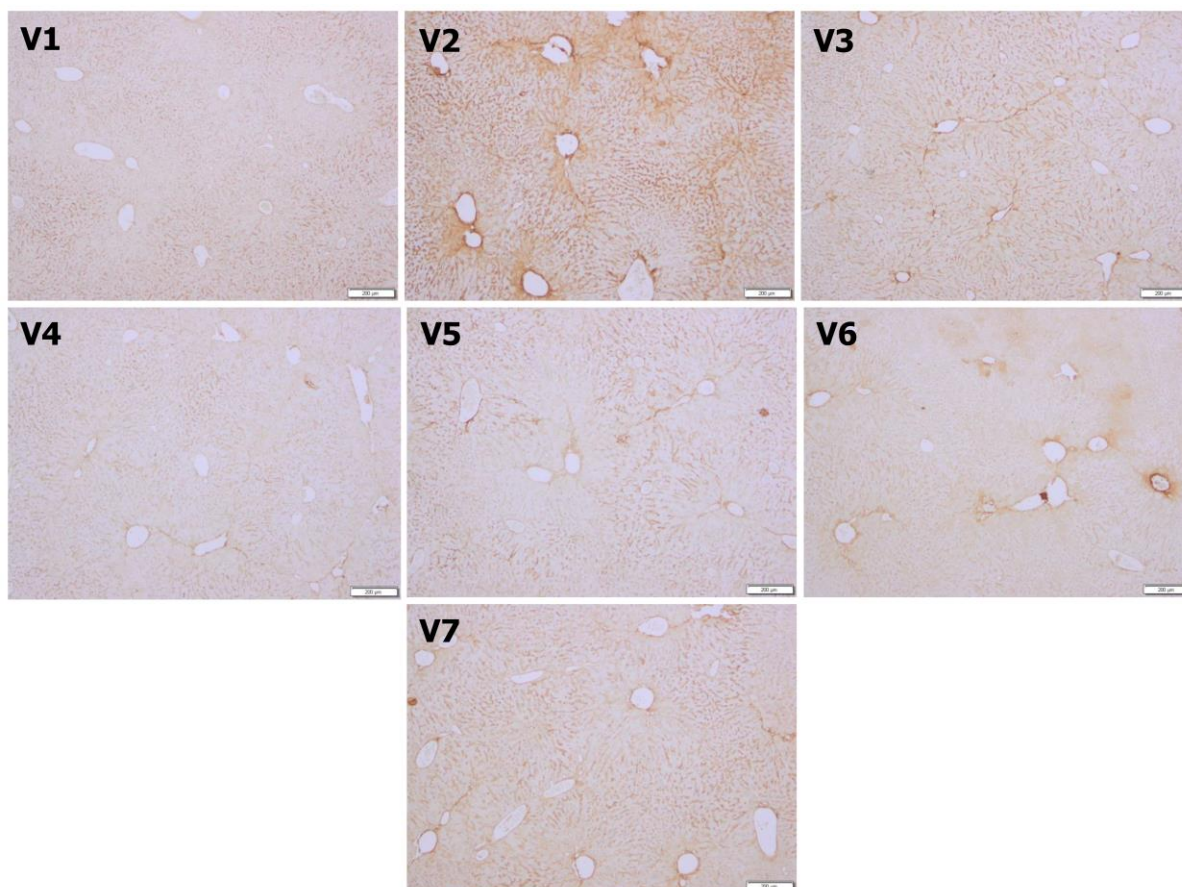
Expresia ARNm a TGF- $\beta$ 1 a prezentat o creștere semnificativ statistică în cazul lotului fibrotic cărui i s-a administrat CCl<sub>4</sub> timp de opt săptămâni comparativ cu lotul martor ( $p < 0,001$ ). Expresia genică a TGF- $\beta$ 1 s-a menținut crescută semnificativ statistic și în cazul lotului 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 (Fig. 6).



**Figura 6. Analiza expresiei genice a TGF-β1 la loturile experimentale.** \*\*\* $p < 0,001$  comparativ cu lotul martor; \* $p < 0,05$  comparativ cu lotul martor; ### $p < 0,001$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); +++ $p < 0,001$  comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3)

Analiza imunohistochimică hepatică a evidențiat în cazul lotului martor un aspect histologic normal, fără imunopozitivitate pentru TGF-β1 (Fig. 7-V1). După opt săptămâni de administrare a CCl<sub>4</sub>, creșterea imunopozitivității pentru TGF-β1 a fost vizibilă la nivelul celulelor non-parenchimale și al hepatocitelor (Fig. 7-V2). În cazul lotului de control fibrotic se remarcă o acumulare a celulelor marcate pozitiv pentru TGF-β1 în jurul septelor fibrotice și periportal (Fig. 7-V3), expresie care este ușor redusă comparativ cu lotul căruia i s-a administrat CCl<sub>4</sub> datorită faptului că ficatul a avut o perioadă de 2 săptămâni de recuperare *de novo*. Loturile tratate cu extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 7-V5), crisină complexată cu HPBCD (Fig. 7-V6) și crisină pură (Fig. 7-V7) au prezentat o scădere semnificativă a expresiei proteice a TGF-β1 comparativ cu lotul fibrotic, în special în cazul lotului căruia i s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Fig. 7-V4).

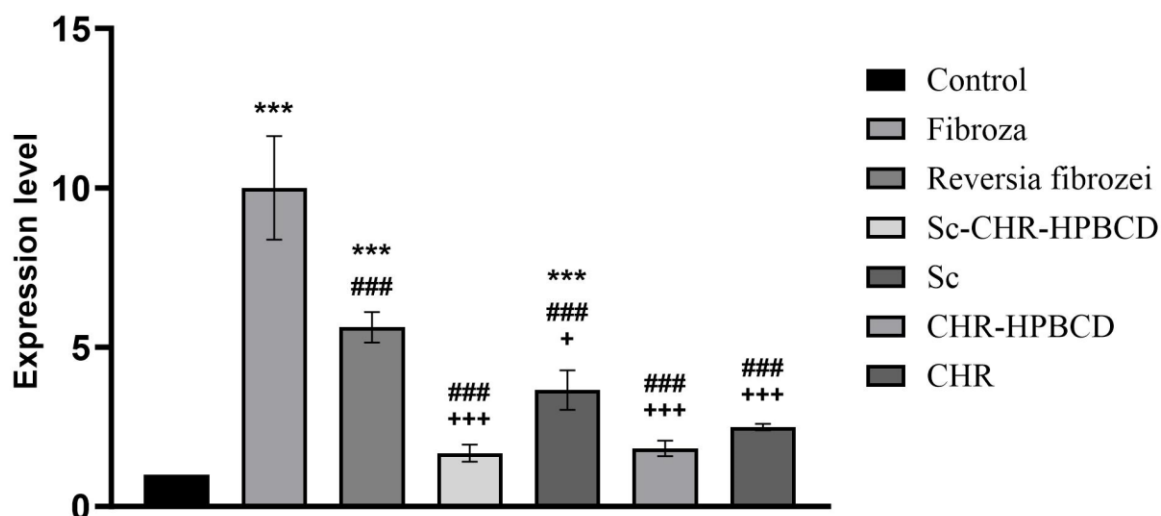


**Figura 7. Analiza expresiei imunohistochimice a TGF- $\beta$ 1 la loturile experimentale. V1 - control; V2 - fibroză; V3 - reversia fibrozei; V4 - Sc-CHR-HPBCD; V5 - Sc; V6 - CHR-HPBCD; V7 - CHR; 200  $\mu$ m**

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 ( $p < 0,001$ ) (Fig. 8 și 9).

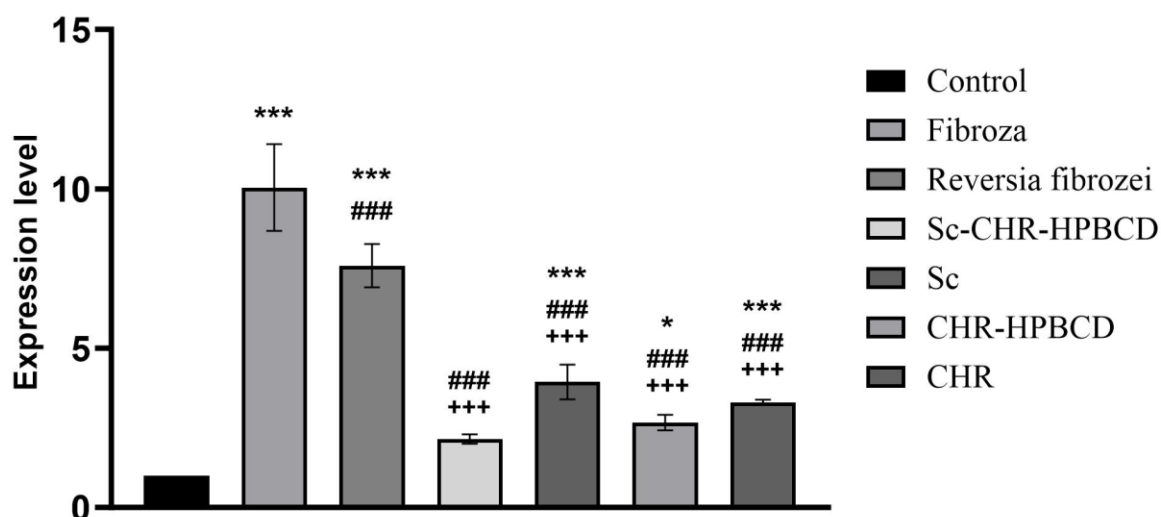


## Smad 2



**Figura 8. Expresia ARNm pentru Smad 2 la loturile experimentale.** \*\*\* $p < 0,001$  comparativ cu lotul martor; ### $p < 0,001$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); +++ $p < 0,001$  comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3); + $p < 0,05$  comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3)

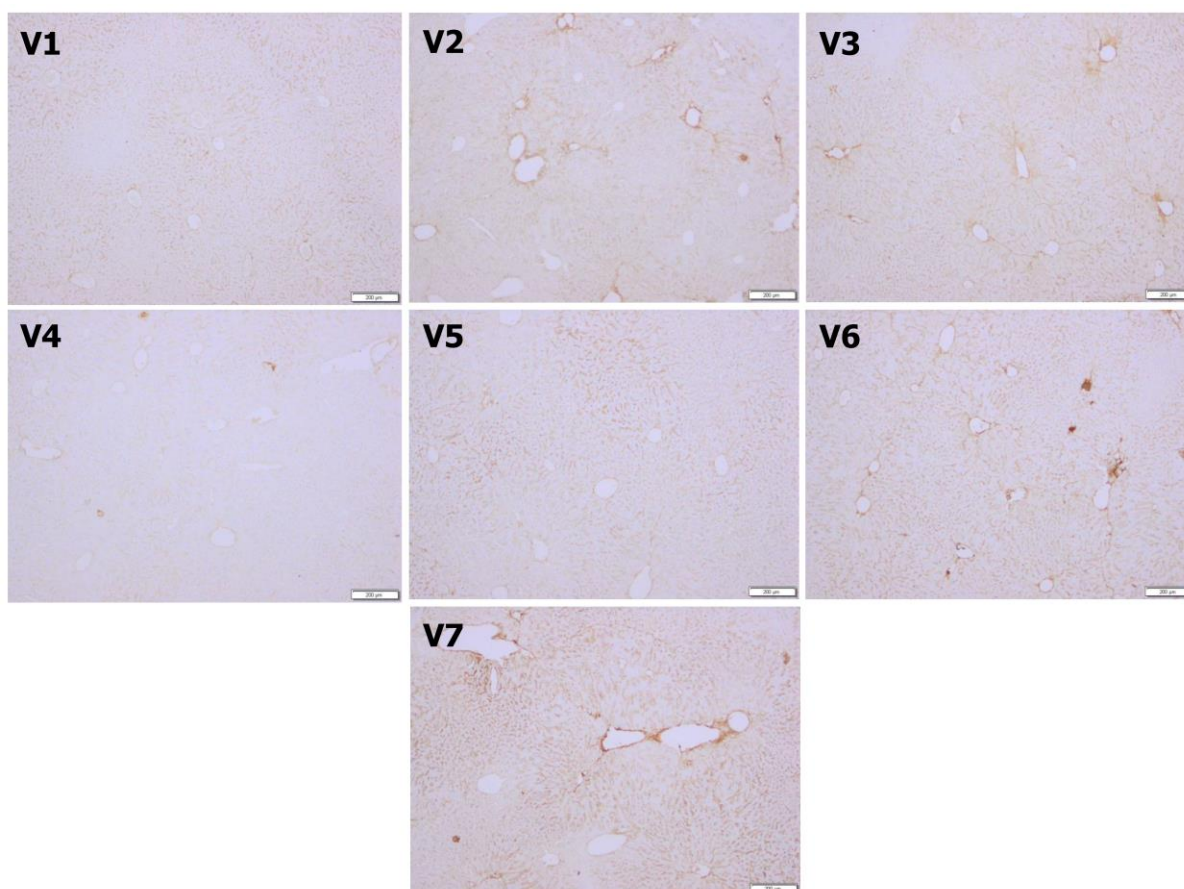
## Smad 3



**Figura 9. Expresia ARNm pentru Smad 3 la loturile experimentale.** \*\*\* $p < 0,001$  comparativ cu lotul martor; \* $p < 0,05$  comparativ cu lotul martor; ### $p < 0,001$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); +++ $p < 0,001$  comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3)

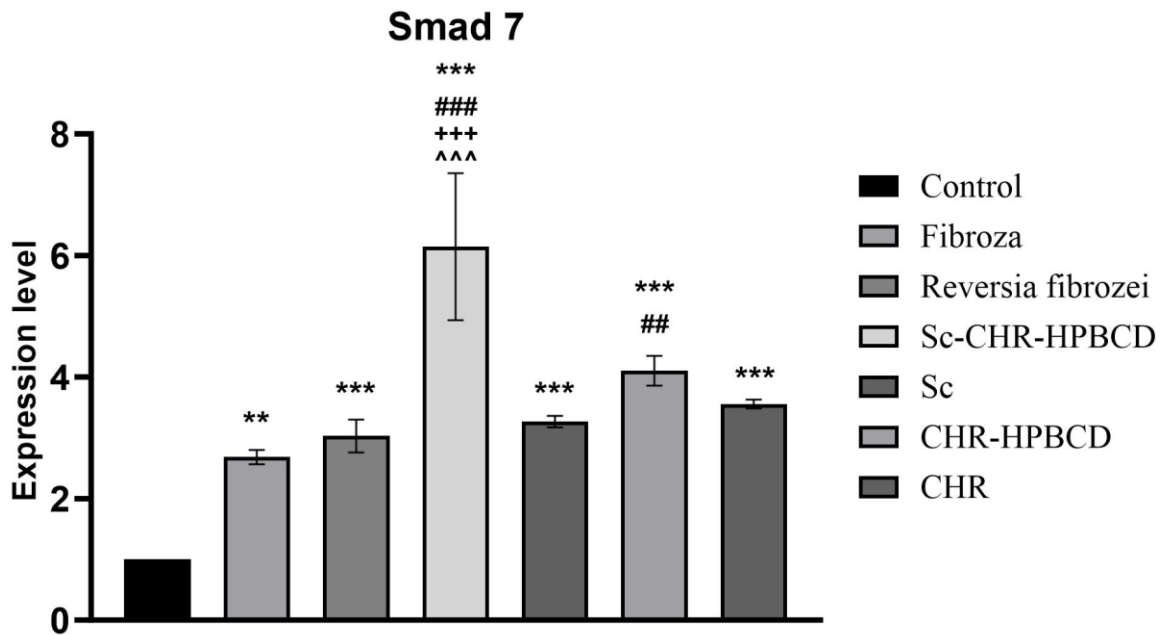
În cazul lotului martor, expresia proteică a Smad 2/3 a fost sub limita de detecție a kitului utilizat (Fig. 10-V1). În cazul lotului fibrotic, analiza imunohistochimică hepatică a relevat o creștere a expresiei proteice a Smad 2/3 la nivelul spațiilor interlobulare și perivascular (Fig. 10-V2). Această creștere este prezentă în cazul lotului de reversie spontană a fibrozei, dar sensibil mai redus decât în cazul lotului fibrotic (Fig. 10-V3). Loturile cărora li

s-au administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Fig. 10-V4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 10-V5), crisină complexată cu HPBCD (Fig. 10-V6) și crisină pură (Fig. 10-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 (Fig. 10-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- $\beta$ 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- $\beta$ /Smad poate fi un mecanism cheie prin care extractul gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD inhibă fibroza hepatică indusă cu CCl<sub>4</sub>. 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 CCl<sub>4</sub>, a diminuat numărul celulelor hepatice stelate activate, a reechilibrat calea de semnalizare TGF- $\beta$ /Smad, fapt demonstrat de diminuarea expresiei genice și proteice a TGF- $\beta$ 1 și Smad 2/3.



**Figura 10. Analiza expresiei imunohistochemice a Smad2/3 în cazul loturile experimentale.** V1 - control; V2 - fibroză; V3 - reversia fibrozei; V4 - Sc-CHR-HPBCD; V5 - Sc; V6 - CHR-HPBCD; V7 - CHR; 200  $\mu$ m

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 căruia i s-a administrat CCl<sub>4</sub> și cu cel de control fibrotic (lotul 3) ( $p < 0,001$ ) (Fig. 11).

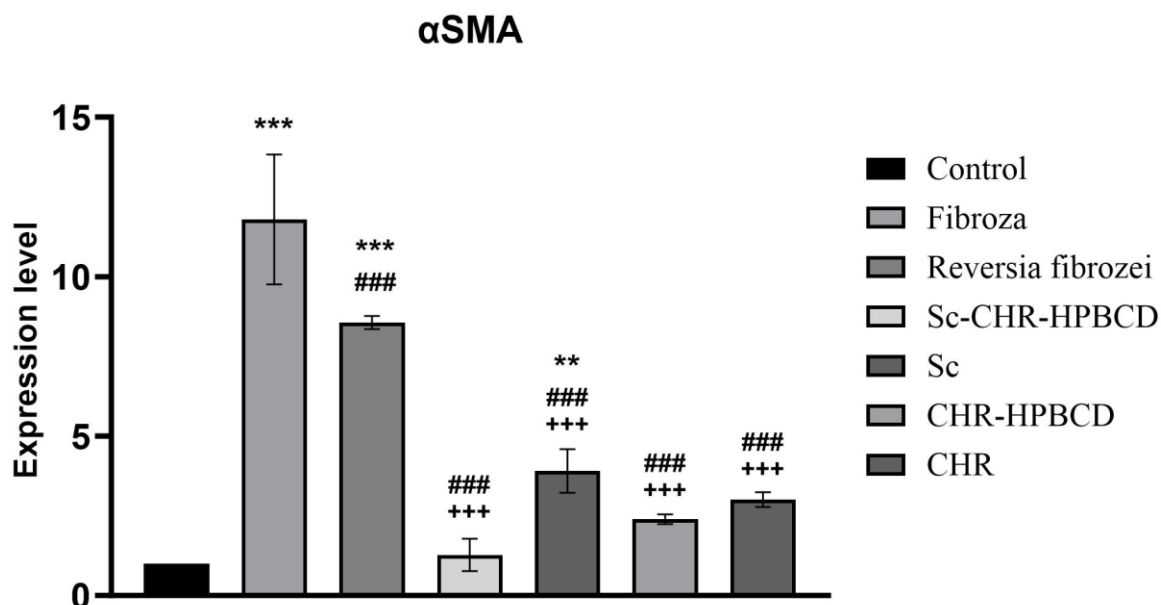


**Figura 11. Expresia ARNm a Smad 7 la loturile experimentale.** \*\*\* $p < 0,001$  comparativ cu lotul martor; \*\* $p < 0,01$  comparativ cu lotul martor; ### $p < 0,001$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); ## $p < 0,01$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); +++ $p < 0,001$  comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3); ^^^ $p < 0,001$  comparativ cu lotul căruia i s-a administrat crisină pură

$\alpha$ -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  $\alpha$ -SMA, markerul activării celulelor hepatice stelate, au fost efectuate analize asupra expresiei genice și expresiei proteice la nivel tisular hepatic.

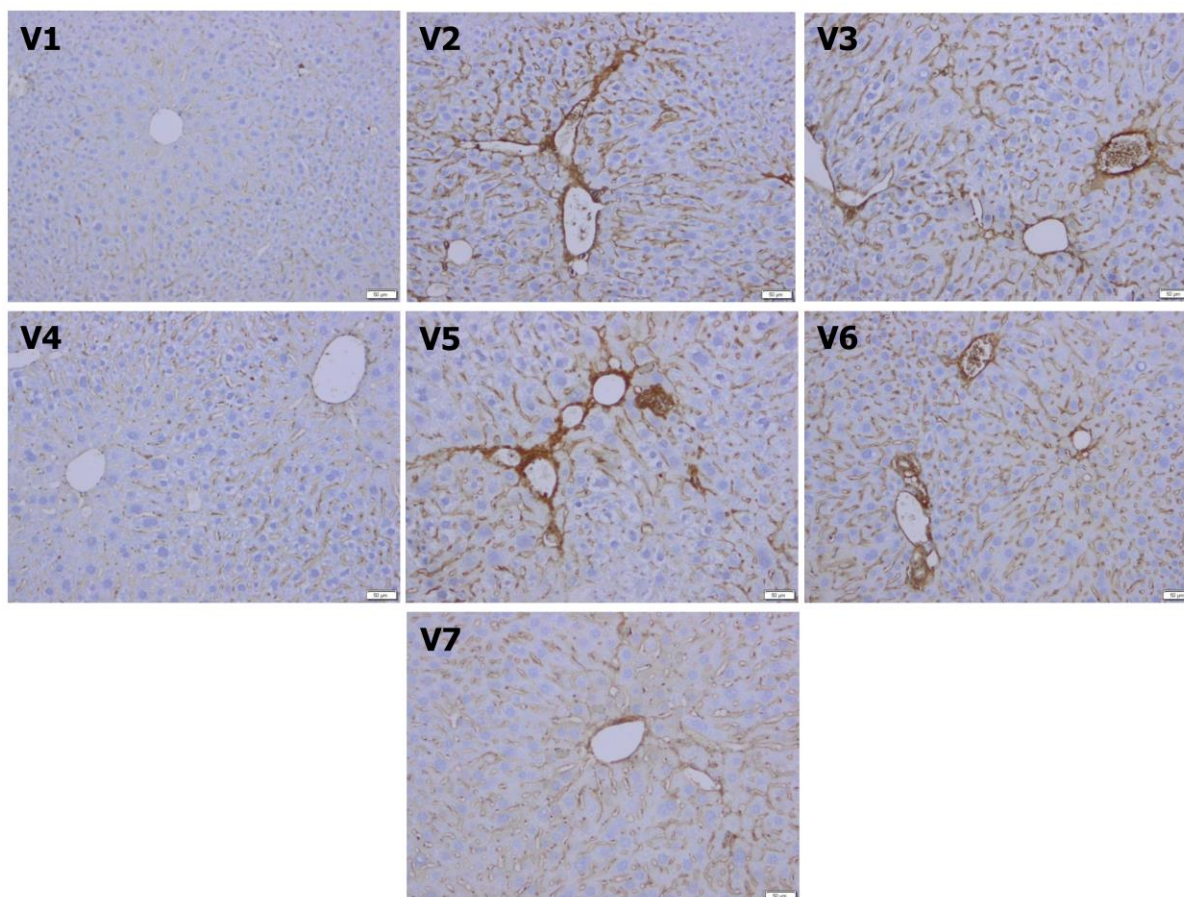
Toate loturile experimentale prezintă un nivel crescut al expresiei genice a  $\alpha$ -SMA comparativ cu lotul de control. Atât în cazul lotului fibrotic, cât și în cazul lotului de reversie a fibrozei se remarcă nivele înalte semnificativ statistic comparativ cu lotul de control și cu toate celelalte loturi experimentale, dar semnificativ mai scăzut în cazul lotului de reversie spontană a fibrozei. Loturile căroro 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  $\alpha$ -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 (Fig. 12).



**Figura 12. Analiza expresiei genice a  $\alpha$ -SMA la loturile experimentale.** \*\*\* $p < 0,001$  comparativ cu lotul martor; \*\* $p < 0,01$  comparativ cu lotul martor; ### $p < 0,001$  comparativ cu lotul fibrotic (lotul 2); +++ $p < 0,001$  comparativ cu lotul de control fibrotic (lotul 3)

Administrarea timp de opt săptămâni a  $\text{CCl}_4$  a indus o creștere semnificativă a imunopozitivității acestei proteine la nivel hepatic (Fig. 13-V2).  $\text{CCl}_4$  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  $\alpha$ -SMA. Această imunopozitivitate s-a menținut ridicată la două săptămâni după întreruperea administrării  $\text{CCl}_4$  (Fig. 13-V3). Loturile cărora li s-au administrat timp de patru săptămâni tratament cu extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Fig. 13-V4), extract gemoterapic de *Secale cereale* (Fig. 13-V5), crisină complexată cu HPBCD (Fig. 13-V6) și crisină pură (Fig. 13-V7) au prezentat o diminuare a sintezei proteice a  $\alpha$ -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 fibrogenză. Reducerea numărului de celule marcate  $\alpha$ -SMA a fost mai accentuată în cazul lotului cărui i s-a administrat extract gemoterapic de *Secale cereale* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină-HPBCD (Fig. 13-V4).



**Figura 13. Analiza expresiei imunohistochimice a  $\alpha$ -SMA la loturile experimentale.** V1 - control; V2 - fibroză; V3 - reversia fibrozei; V4 - Sc-CHR-HPBCD; V5 - Sc; V6 - CHR-HPBCD; V7 - CHR; 50  $\mu$ m

### 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 cărui i s-a administrat crisină pură.

### Activitatea 2.5. 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 două conferințe naționale/internaționale:

1. **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**
2. **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**

### **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, 2.5 (Etapa II, 2023), 3.1, 3.2, 3.3 (Etapa II, 2024) – grad de realizare 62%

**Livrabilele realizate** în această primă etapă sunt reprezentate de:

- realizarea *design*-ului experimental de model de fibroză hepatică indusă cu tetraclorură de carbon (CCl<sub>4</sub>) la șoareci și prelevarea probelor de ficat pentru analizele care vor fi efectuate ulterior (Activitatea 2.1.);
- efectuarea analizelor biochimice (Activitatea 2.2.);
- obținerea de imagini de microscopie optică a ficatului pentru colorațiile H&E și tricromică Fouchet Van Gieson (Activitatea 2.3.);
- obținerea de imagini de microscopie optică a ficatului pentru imunohistochimie (Activitatea 2.4.);
- diseminarea rezultatelor obținute sub forma unei prezentări orale și o prezentare de poster la conferințe naționale/internaționale (Activitatea 2.5.).

### **Indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor:**

Participarea la două conferințe naționale/internaționale.

Director proiect,  
Dr. Alina Ciceu

