Raport științific și tehnic 262PED/2019
Etapa II 2021

I. Rezumatul etapei

În cadrul aceste etape, s-au realizat o serie de activități cu scopul de a evalua potențialul anti-fibrotic al unor complexe pe bază de crisină asociată cu ciclodextrine (CD-RAMEB și HPBCD) îmbogățite cu extract gemoterapic din *Corylus avellana* (CAG-CHR/Cyclo). În **Activitatea 2.1**, a fost evaluat *in vitro* potențialul complexelor CAG-CHR/RAMEB și CAG-CHR/HPBCS de a interacționa cu calea de semnalizare TGFβ implicată în activarea celulelor hepatice stelate (HSC). În urma analizei markerilor fibrotici TGF-β și moleculelor SMAD, expresia lor a fost redusă și calea de semnalizare TGF-β1/SMAD inhibată, cu rezultate mai bune obținute pentru complexul cu RAMEB. În cadrul **activității 2.2,** s-a evaluat potențialul anti-fibrotic *in vitro* al complexelor CAG-CHR/Cyclo, prin investigarea la nivelul expresiei markerilor apoptotici. CAG-CHR/RAMEB a indus apoptoza HSC prin inhibarea Bcl-2 și stimularea expresiei și clivării caspazelor 3/8/9. Pe baza rezultatelor obținute *in vitro*, în **activitatea 2.3**, a fost selectat complexul CAG-CHR/RAMEB pentru realizarea experimentelor *in vivo*. În următoarea parte a etapei s-au realizat experimentele *in vivo* de evaluare a CAG-CHR/RAMEB. În cadrul **Activității 2.4**, s-a realizat *design-ul* experimental de model de fibroză hepatică indusă cu CCl_4 la șoareci diabetici. Au fost utilizați șoareci masculi adulți CD1 cărora li s-a indus diabet cu streptozotocină și fibroza hepatică cu CCl_4. După obținerea șoarecilor cu diabet și fibroză hepatică, acestora li s-au administrat pe cale orală CAG, CHR/Cyclo, CHR și CAG-CHR/Cyclo. În **Activitatea 2.5,** a fost evaluată activitatea anti-fibrotică a CAG-CHR/Cyclo prin analize hematologice si biochimice. **Activitatea 2.6,** a presupus analiza histopatologică a biopsiilor de ficat de la șoarecii incluși în experiment pentru evaluarea activității anti-fibrotice a complexelor. Probele de la șoarecii tratați au prezentat o histo-arhitectură apropiată controlului sănătos și mai puțin colagen insular, ceea ce sugerează eficiența tratamentului. În cadrul a**ctivității 2.7**, activitatea antioxidantă *in vivo* a CAG-CHR/Cyclo a fost evaluată, prin analiza expresiei proteinelor Nrf2, HemOX1, MMP2 și a MMP9 în țesutul hepatic prin tehnica Western blot. De asemenea, a fost determinată *activitatea enzimatică a metaloproteinazelor (MMPs)* prin metoda zimografiei. A**ctivitatea 2.8** a presupus evaluarea activității anti-fibrotice *in vivo* a complexelor prin analiza caii de semnalizare TGFβ. În urma analizei expresiei TGF-β și moleculelor SMAD, calea de semnalizare TGF-β1/SMAD a fost inhibată. Ultima **activitate 2.9**, a presupus diseminarea rezultatelor sub formă de articole ISI și abstracte la conferințe naționale și internaționale.

II. Descrierea științifică și tehnică

Activitatea 2.1 Evaluarea *in vitro* a activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analiza caii de semnalizare TGFβ

În cadrul **activității 2.1, s-**a realizat evaluarea *in vitro* a activității anti-fibrotice a complexelor CAG-CHR/RAMEB și CAG-CHR/HPBCD, prin analiza expresiei markerilor (TGF-β1, SMAD 2/3) din calea de semnalizare TGF-β, atât la nivel genic, cât și proteic. A fost analizată expresia markerului fibrotic TGF-β1 in celule hepatice stelate (HSC) din linia celulară LX2. În HSC latente, expresia TGF-β1 a fost redusă la nivel proteic (Fig 1a) și genic (Fig 1b), însă în urma activării prin stimulare cu TGF-β1, expresia acestui marker a fost crescută (Fig 1B). Tratamentul cu ambele complexele investigate, CAG-CHR/Cyclo, a redus semnificativ expresia TGF-β1 față de controlul activat, ceea ce indică eficiența complexelor de a inhiba calea de semnalizare TGF-β1/SMAD și implicit, activarea HSC. Complexul CAG-CHR/RAMEB s-a dovedit a fi mai eficient decât CAG-CHR/HPBCD în a induce reversia celulelor HSC activate către o stare de latență. Rezultatele au fost confirmate și la nivelul expresiei genice *tgf-β1*. În urma administrării celor două tipuri de complexe, nivelul expresiei a fost statistic semnificativ redusă față de controlul activat, cu un nivel de semnificație statistică mai mare în cazul complexului cu RAMEB ($p<0.01$) față de HPBCD ($p<0.05$).

A fost analizată și localizarea celulară a complexului fosforilat SMAD 2/3 prin marcare imunofluorescentă (Fig. 2).

În cazul controlului HSC, complexul proteic a fost localizat la nivelul citoplasmei, în întreaga celulă, ceea ce confirmă faptul că această cale nu este activată în HSC latente. În urma activării cu TGF-β1, complexul a fost translocat la nivelul nucleului, ceea ce indică faptul că a fost activată calea de semnalizare TGF-β1/SMAD. Tratamentul cu CAG-CHR/CD, a inhibat translocarea complexului în nucleu, efect observat cal mai bine în cazult complexului cu RAMEB. Acest lucru sugerează superioritatea complexului CAG-CHR/RAMEB și eficiența RAMEB de a elibera CAG și CHR din complex. Complexele au acționat și la nivelul expresiei genice, la nivelul căii de semnalizare TGF-β1/SMAD prin reducerea expresiei *smad2*, dar mai ales *smad3*, dar nu statistic semnificativ, deoarece efectul a fost observat cel mai bine la nivelul localizării complexelui SMAD 2/3. De asemenea, complexele au indus expresia *smad7*, moleculă care are rol inhibitor asupra căii de semnalizare TGF-β1/SMAD (Fig 3). Și la acest nivel, complexul cu RAMEB s-a dovedit a fi mai eficient în a elibera CAG și CHR care au indus o crestere statistic semnificativă a expresiei *smad7*.

Activitatea 2.2 Evaluarea *in vitro* a activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analiza apoptozei

În cadrul acestei activități, a fost evaluat *in vitro* potențialul antifibrotic al CAG-CHR/Cyclo prin analiza expresiei unor markeri apoptotici (bcl-2, caspaza 3/8/9) la nivel genic și proteic. În fibroza hepatică, HSC capătă un profil proliferativ și numărul lor crește mult peste

numărul normal. În timpul regenerării țesutului hepatic, HSC activate fie trec printr-un proces de reversie către starea de latență, fie intră în apoptoză și se restabilește un număr normal de HSC în ficat. BCL-2 reprezintă un factor anti-apoptotic, a cărui expresie indică semnalele de pro-supraviețuiere ale celulelor. Caspazele 3, 8, 9 reprezintă efectorii apoptozei, care sunt activate prin clivare. Prin marcarea nucleilor cu DAPI (albastru) si a caspazei 3 clivate cu Anticorp cuplat cu Alexa Fluor 546 (roșu), au fost observate aceste imagini la microscopul de fluorescenta (Fig 4). Celulele LX2 au fost activate prin tratament cu TGF-β1. În HSC latente și activate, nu a fost observată expresia caspazei 3 clivate deoarece aceste celule nu se află în procesul de apoptoză în condiții normale. Tratamentul cu cele două complexe a indus activarea apoptozei în aHSC, și s-a observat prezența formei clivate a caspazei 3. Deși ambele tipuri de complexe au indus apoptoza celulelor activate, complexul CAG-CHR/RAMEB este mai eficient decât cel cu HPBCD, și expresia formei clivate a caspazei 3 este mai bine evidențiată (Fig 4D).

De asemenea, a fost examinată și expresia markerilor apoptotici la nivel genic (Fig 5). În HSC tratate cu TGF-β1, s-a observat expresia *bcl-2* crescută față de controlul latent, ceea ce confirmă faptul că HSC secretă factori anti-apoptotici care le permit supraviețuirea și menținerea stării activate. În HSC tratate cu CAG-CHR/Cyclo, expresia *bcl-2* este redusă, ceea ce indică efectul moleculelor secretate de ADSC în reducerea supraviețuirii celulare. Efectul asupra procesului de apoptoză este observat mai bine la nivel proteic, deorece numai formele clivate al caspazelor induc apoptoza. Totuși, și la nivel genic s-a observat o creștere a expresiei caspazelor în cazul tratamentului cu complexele investigate, ceea ce indică o stimulare a acestei căi prin tratament. Superioritatea complexului CAG-CHR/RAMEB a fost observată cel mai bine în cazul caspazei 3 și 8, unde este indusă o creștere mai mare a nivelului expresiei lor față de nivelul indus de CAG-CHR/HPBCD. În cazul caspazei 9, ambele tratamente induc un răspuns similar în privința nivelului expresiei, confirmând faptul că cele două tipuri de complexe pot acționa ca posibile tratamente anti-fibrotice.

Activitatea 2.3 Selectarea celui mai performant CAG-CHR/Cyclo pentru experimentele *in vivo*

Pe baza rezultatelor obținute *in vitro*, prin evaluarea activității anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analiza căii de semnalizare TGFβ și a apoptozei, cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul CAG-CHR/RAMEB. Acest complex s-a dovedit a fi mai eficient în eliberarea CAG și CHR care au indus reversia HSC și inducerea apoptozei celulelor activate. CAG-CHR/RAMEB a redus mai mult expresia markerilor fibrotici și a indus un răspuns mai pronunțat în cazul apoptozei celulelor.

Activitatea 2.4 Design experimental *in vivo* pe model de fibroză hepatică indusă cu CCl_4 la șoareci diabetici

Protocolul experimental a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării din Universitatea de Vest Vasile Goldis (152/02.10.2019).

Pentru experiment au fost utilizați șoareci masculi CD1 din biobaza Universității de Vest Vasile Goldiș din Arad. Șoarecii au fost injectați, ip, cu o singură doză de streptozotocină (STZ; 65 mg·kg-1 greutate corporală), solubilizată în tampon citrat (50 mM, pH 4,5) pentru a induce diabetul zaharat. Nivelurile de glucoză din sânge au fost măsurate după 4 ore de inaniție, folosind un glucometru. După administrarea STZ, șoarecii cu un nivel de glucoză din sânge mai mare de 2,5 g·l-1 timp de două săptămâni consecutive au fost considerați șoareci cu diabet de tip 2 și incluși în studiu. Animalele cu diabet confirmat au fost tratați intraperitoneal (ip) cu CCl_4 dizolvat în ulei de măsline (20% v/v, 2 ml/kg), de două ori pe săptămână, timp de 7 săptămâni, și sacrificați la șaptezeci și două de ore după ultima injecție pentru confirmarea fibrozei hepatice (Lotul 2). Rezoluția spontană a fibrozei hepatice a fost investigată la animalele diabetice tratate cu CCl_4 după două săptămâni de recuperare (Lotul 3). Pentru a evalua efectul antifibrotic al produsului combinat extract gemmoterapic *Coryllus avelana*-nanocomplex CHR/cyclo, tratamentul a început la sfârșitul celor 7 săptămâni de tratament cu CCl_4, utilizând administrarea prin gavaj zilnic timp de 14 zile consecutive a următoarelor: extract gemoterapic *Coryllus avelana*-crisina/ciclodextrine (CAG-CHR/Cyclo - Lotul 4), extract gemmoterapic *Coryllus avelana* (CAG - Lotul 5), nanocomplex de crisină/ciclodextrină (CHR/Cyclo - Lotul 6) și crisină pură (CHR - Lotul 7). Toate produsele conțin 100 mg/kg de crisină. Șoarecii aparținând lotului 1 (martor -a.sanatos, b.diabetic), 2 (șoareci fibrotici) și 3 (rezoluția *de novo* a fibrozei) li s-au administrat vehiculele grupelor tratate. Animalele au fost sacrificate la 24 de ore sub anestezie după ultima doză administrată (loturile 1, 3, 4, 5, 6, 7).

Activitatea 2.5 Evaluarea activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analize hematologice si biochimice

Analiza parametrilor hematologici a fost realizata la un analizor automat de hematologie (2900 VetPlus). Se inregistrează o creștere semnificativă a numărului total de leucocite la soarecii diabetici si loturile experimentale comparativ cu martorul sănătos, dar în același timp o scădere semnificativă la loturile cu fibroză indusă experimental comparativ cu controlul diabetic (Fig.6).

Analiza parametrilor biochimici serici a fost realizata la un analizor automat de biochimie (BS-120). Se inregistrează o creștere semnificativă a markerilor hepatici (TGO, TGP) si renali (Creatinina) la soarecii diabetici si loturile experimentale comparativ cu martorul sănătos, si o scadere pentru LDH (Fig.7). Loturile tratate au avut o ameliorare semnificativă comparativ cu controlul diabetic.

Activitatea 2.6 Evaluarea activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analize histopatologice

Analiza histologică a ficatului lotului martor a indicat o arhitectură lobulară normală cu vena centrolobulară și cordoane de hepatocite radiare, fără o proliferare a țesutului conjunctiv intralobular (Fig.8-V1a) si o ușoară dilatare a capilarelor sinusoide (Fig.8-V1b). Probele de ficat din lotul CCl_4 au prezentat modificări severe ale morfologiei, evidente depuneri de colagen,

formarea de pseudolobuli și infiltrarea de celule inflamatorii în zonele interstițiale hepatice. De asemenea, se observă numeroase hepatocite cu steatoză micro- și macro-veziculară și congestia capilarelor sinusoide (Fig.8-V2). Se remarcă prezența „hepatocitelor spumoase" (foamy) perivenulare hipertrofiate cu acumulare masivă de grăsime microveziculară. După două săptămâni de recuperare *de novo*, în lipsa unui tratament de recuperare, se observă prezența semnificativă a țesutului fibros și a pseudo-lobulilor, acompaniate de infiltrate de celule inflamatorii, comparativ cu grupul CCl_4 (Fig.8-V3). Hepatocitele hipertrofiate cu citoplasma spumoasă sunt prezente. In cazul grupului de șoareci tratați timp de 2 săptămâni cu extract gemmoterapic *Coryllus avelana* (Fig.8-V5), nanocomplex de crisină/ciclodextrină (Fig.8-V6), ADSC, după instalarea fibrozei, ariile fibrotice au fost reduse (insulare), comparativ cu cele înregistrate în cazul grupului CCl_4. Infiltrate inflamatorii în ariile perivasculare se pastrează si de asemenea si congestia sinusoidelor. Microsteatoza hepatică este prezentă la aceste loturi. Șoarecii cărora li s-a administrat extract gemoterapic *Coryllus avelana*-crisina/ciclodextrine au prezentat o histo-arhitectură apropiată de cea a martorului si peste grupul V1b – control diabetic (Fig.8-V4). Cea mai slaba recuperare structurală s-a înregistrat pentru șoarecii cărora li s-a administrat doar crisină pură (Fig.8-V7).

Formarea septelor fibrotice perilobulare si pseudolobulilor a fost confirmată în coloratie tricromică pentru lotul V2 (Fig.9-V2) și în egală măsură la lotul de reversie *de novo* a fibrozei (Fig.9-V3). Colagen insular se mai evidentiază la administrarea CHR pur (fig.9-V7), mai puțin la CHR/Cyclo (fig.9-V4), a CAG (Fig.9-V5) unde septele sunt intrerupte iar colagenul apare mai mult pericentrolobular, si sporadic la grupul tratat cu CAG-CHR/Cyclo, comparabil cu martorii sanatos si diabetic (Fig.9-V6).

Activitatea 2.7 Activitatea antioxidantă *in vivo* a CAG-CHR/Cyclo

În cadrul activităţii A 2.7 (UB) s-a analizat nivelul peroxidării lipidice, concentraţia glutationului redus, produşii de oxidare avansată a proteinelor, nivelul expresiei proteinei Nrf2, HemOxigenaza1 precum și expresia și activitatea metaloproteinazelor MMP2 și MMP9.

Pentru realizarea experimentelor *in vivo* s-au folosit soareci albi CD-1 care au fost împărţiţi în 6 loturi (câte 6-10 indivizi per lot): lot şoareci în care a fost indus diabetul şi fibroza (grup 2), lot şoareci Diabet+reversie Fibroză (grup 3), lot şoareci Diabet+Fibroză+CAG/CHR/Cyclo (grup 4); lot şoareci Diabet+Fibroză+CAG (grup 5); lot şoareci Diabet+Fibroză+CHR/Cyclo (grup 6); lot şoareci Diabet+Fibroză+CHR (grup 7). Prelevarea tesutului hepatic s-a realizat după 24 de ore de la expunere, acestea fiind conservate imediat la -80ºC până la efectuarea testelor biochimice. Lizatul tisular total a fost obţinut prin omogenizare cu un sonicator în soluţie tampon Tris-EDTA 0.1 M, pH 7.4, la un raport de extracţie de 1g/10ml. Proteinele din extractele tisulare au fost determinate prin metoda Lowry (Lowry, 1951) folosind albumina serică bovină ca standard.

Malondialdehida (MDA) ca marker de peroxidare lipidică a fost evaluată prin metoda descrisă de Del Rio (Del Rio şi colab., 2003). Măsurarea fluorescenţei s-a efectuat la lungimile de undă Ex520nm/Em549nm cu ajutorul fluorimetrul Jasco FP-750 iar exprimarea rezultatelor este dată în nmoli MDA/mg proteină.

Determinarea concentraţiei de glutation redus a fost realizată cu kitul Arbor Assays Detectx™ Glutathione Colorimetric Detection Kit-K006-H1 (Sigma). Proteinele din probe au fost îndepărtate prin precipitare cu acid sulfosalicilic (SSA) 10%. Rezultatele au fost raportate la concentraţia proteică a probelor şi au fost exprimate în nmoli/mg proteină.

Nivelul produsilor de oxidare avansată a proteinelor (AOPP) s-a realizat spectrofotometric conform metodei descrise de Witko (Witko şi colab., 1996), folosind ca standard o curbă de etalonare pe bază de cloramină T. Concentraţia de AOPP a fost calculată prin extrapolarea densităţilor optice ale probelor utilizând curba de etalonare obţinută din Cloramină T 100 µM.

Rezultatele obţinute în urma tratamentului *in vivo* au arătat că nivelul peroxidării lipidelor a scăzut semnificativ în cazul loturilor tratate cu complexele CAG-CHR/Cyclo, CAG si CHR/Cyclo comparativ cu grupul de şoareci fibrotici. Acest lucru demonstrează efectul benefic al complexelor CAG-CHR/Cyclo în atenuarea stresului oxidativ indus de CCl_4 la şoarecii CD1. În urma analizei concentraţiei de GSH si AOPP, profilul acestora se menţine usor crescut în cazul lotului tratat cu complexul CAG-CHR/Cyclo, urmat de o scădere semnificativă în cazul celorlalte loturi tratate cu complexele CAG, CHR/Cyclo si CHR.

Expresia proteinelor Nrf2, HemOX1, MMP2 si a MMP9 in tesutul hepatic

În vederea punerii in evidenţă a modicarilor de expresie proteica s-a folosit tehnica Western Blot. Metoda se bazeaza pe identificarea proteinelor cu ajutorul anticorpilor specifici.

Prima etapă a presupus prepararea gelului de poliacrilamida 10% care conţine gelul de migrare şi gelul de concentrare 4.5%. După polimerizarea gelului s-a încărcat în fiecare godeu o cantitate de 50 µg proteină/godeu. Drept marker de masă moleculară s-a utilizat See Blue Plus2 Prestained Standard. Migrarea proteinelor s-a realizat la 90 V constant, timp de 2 ore la 25°C în tampon de migrare Tris/Glicina/SDS 1X. După migrarea în gel de poliacrilamidă, proteinele au fost transferate pe membrana de difluorură de poliviniliden în prezenţa tamponului de transfer Tis/Glicină/Metanol, la 350 mA, timp de 1h si 30 de minute.

După transfer, membrana a fost spălată de 2 ori cu apă distilată şi apoi blocată în tampon de blocare (tamponul de blocare, anticorpul secundar, substratul cromogenic si solutiile de dilutie a anticorpilor ca si solutia de spălare după expunerea la anticorpi sunt incluse in kitul Invitrogen Western Breeze, Chromogenic Immunodetection System). Pentru revelarea proteinelor, membranele au fost incubate timp de 1 oră cu anticorpi primari specifici (Santa Cruz Biotechnology), urmată de o incubare timp de30 minute cu anticorpul secundar. Apoi s-a adăugat substratul cromogenic BCIP (5 brom-4 clor-3indolil-1 fosfat) / NBT (nitro blue tetrazoliu) care a fost menţinut pană la apariţia benzilor. Acestea au fost vizualizate şi cuantificate cu programul ImageLab de la BioRad.

Expresia proteică a proteinelor Nrf2, HemOX1 si a MMPs a fost analizată prin tehnica Western blot. Pregătirea probelor, migrarea şi transferul s-au realizat conform protocolului menţionat anterior. Pentru detecţia proteinelor de interes au fost utilizaţi anticorpi primari

policlonali de iepure anti-MMP2, anti-MMP9, Nrf2 şi HemOX1. Drept anticorpi secundari, s-au utilizat anticorpi anti-IgG de iepure conjugaţi cu fosfatază alcalină.

Nrf2 este un factor de transcripție leucin-zipper (bZIP) de bază, care reglează expresia a numeroase gene, care codifică pentru antioxidanți și pentru enzime detoxificatoare prin legarea sa la elementele de răspuns antioxidante (AREs) ce se află în promotorii acestor gene. Nrf2 crește hemoxigenaza 1, ducând la o creștere a enzimelor de fază II *in vitro*.

Hemoxigenazele (HO) sunt enzime esențiale care degradează hemul în monoxid de carbon (CO), biliverdină și fier liber având proprietăți antiinflamatorii si anti-apoptotice.

În figura 2 se poate observa profilul și densitometrarea rezultatelor obţinute în cazul expresiei proteice Nrf-2, HemOX1, MMP2, respectiv MMP9 în urma tratamentului *in vivo* cu diferite complexe. Nivelul expresiei Nrf2 scade semnificativ în urma tratamentului cu complexele CAG-CHR/Cyclo, CAG, CHR/Cyclo şi CHR la toate loturile analizate comparativ cu grupul de şoareci fibrotici. În contrast, expresia HemOX1 a evidenţiat un profil crescător. Analiza expresiei proteice (Figura 2) indică o scădere semnificativă a nivelului MMP9 comparativ cu grupul de şoareci fibrotici, în timp ce expresia MMP-2 se menţine la nivelul primului lot, urmată de o scădere semnificativă în cazul grupului tratat cu complexul CHR.

Pentru determinarea *activităţii enzimatice a metaloproteinazelor (MMPs)* s-a utilizat metoda zimografiei. Aceasta metodă s-a realizat în sistem discontinuu pe un gel de concentrare de poliacrilamidă 4% şi un gel de migrare de poliacrilamidă 7.5%, în condiţii denaturante (SDS-PAGE). În compoziţia gelurilor de migrare s-a adăugat o soluţie de gelatină 2% . Pentru gelatin zimografie s-au încărcat 80 µg proteină/godeu.

Migrarea s-a realizat la 4 ^{o}C în tampon de electroforeză 1X la o tensiune de 90 V constant. După migrare, gelurile au fost spălate cu apă distilată şi apoi incubate de 2 ori timp de 15 minute cu tampon de renaturare Triton X-100, pentru a permite enzimelor să-şi recapete activitatea enzimatică. După renaturare, s-a realizat o nouă spălare cu apă distilată, iar apoi gelurile au fost incubate sub agitare peste noapte la 37 ^{o}C în tampon de incubare 1X. Ulterior, s-a realizat colorarea gelurilor cu soluţie Coomasie Brillant Blue timp de 1 oră la temperatura camerei. Decolorarea gelurilor s-a făcut cu soluţie 10% metanol şi 10 % acid acetic în apă distilată, de 2 ori timp de 30 minute, până la apariţia benzilor. Gelurile au fost vizualizate cu ajutorul programului Image Lab BioRad, iar benzile obţinute s-au densitometrat utilizând programul Image J.

Analizând figura 12 se poate observa că, activitatea pro-MMP2, respectiv MMP2 scade semnificativ la toate loturile tratate cu complexele CAG-CHR/Cyclo, CAG, CHR/Cyclo şi CHR comparativ cu grupul de şoareci fibrotici. De asemenea, activitatea enzimatică a MMP9 scade semnificativ în cazul loturilor tratate cu complexele CAG-CHR/Cyclo, CHR/Cyclo şi CHR.

Analiza statistică

Datele au fost analizate din punct de vedere statistic cu programul GraphPad Prism 8.0.2 utilizând metoda ANOVA one-way și testul Tukey. Rezultatele au fost reprezentate ca medie a replicatelor (n = 6-10) ± deviația standard și considerate semnificative statistic la o valoare a lui $p < 0.05$. Toate probele au fost comparate între ele iar semnificatia statistică a fost reprezentată cu

(*) față de proba Diabet + fibroză; (#) față de proba Diabet + reversie Fibroză; (&) față de proba Diabet + Fibroză + CAG-CHR/Cyclo; (∞) față de proba Diabet + Fibroză + CHR/Cyclo.

Referinte:

- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L & Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265, 1951.
- Del Rio D., Pellegrini N., Colombi B., Bianchi M., Serafini M., Torta F., Tegoni M., Musci M., Brighenti F., *Rapid fluorimetric method to detect total plasma malondialdehyde with mild derivatization conditions*, Clin. Chem., 49, 690–692, 2003.
- Witko-Sarsat, V., Nguyen, A.T., Descamp, S., Latsha, B. Microtitre plate assay for phagocyte derived taurine chloroaminea. J. Clin. Lab. Annals 1992, 6: 47-53.

Activitatea 2.8 Evaluarea activității anti-fibrotice *in vivo* a CAG-CHR/Cyclo prin analiza căii de semnalizare TGFβ

Analiza expresiei genice a αSMA a relevat o supraexprimare semnificativă a tuturor loturilor experimentale comparativ cu martorul sanatos. Inducerea fibrozei a determinat o crestere suplimentara semnificativă a expresiei genice a αSMA si care se mentine la nivel ridicat si la 2 saptamani dupa inducerea fibrozei comparativ cu lotul diabetic ($p<0.001$). Loturile tratate au avut o scadere semnificativă comparativ cu lotul diabetic si diabet-fibroza ($p<0.001$) (Fig.13). Același pattern a fost confirmat pentru expresia imunohistochimică a αSMA în tesuturile hepatice (fig.14).

Analiza expresiei genice a Smad 2 si 3 au relevat o supraexprimare semnificativă a tuturor loturilor experimentale comparativ cu martorul sanatos. Inducerea fibrozei a determinat o crestere suplimentara semnificativă a expresiei genice a Smad 2 si 3 si care se mentine la nivel ridicat si la 2 saptamani dupa inducerea fibrozei comparativ cu lotul diabetic ($p<0.001$). Loturile tratate au avut o scadere semnificativă comparativ cu lotul diabetic si diabet-fibroza ($p<0.001$) (Fig.15). Același pattern a fost confirmat pentru expresia imunohistochimică a Smad 2 si 3 în tesuturile hepatice (fig.16).

In schimb, mRNA Smad 7 a crescut semnificativ statistic la loturile tratate comparativ cu lotul diabetic si diabet-fibroza, în special pentru lotul CAG-CHR/Cyclo ($p<0.001$) (Fig.15).

Analiza expresiei genice a TGFβ a relevat o supraexprimare semnificativă a tuturor loturilor experimentale comparativ cu martorul sanatos. Inducerea fibrozei a determinat o crestere suplimentara seminificativă a expresiei genice a TGFβ si care se mentine la nivel ridicat si la 2 saptamani dupa inducerea fibrozei comparativ cu lotul diabetic ($p<0.001$). Loturile tratate au avut o scadere semnificativă comparativ cu lotul diabetic si diabet-fibroza, in special pentru lotul GAG-CHR/Cyclo ($p<0.001$) (Fig.17). Același *pattern* a fost confirmat pentru expresia imunohistochimică a TGFβ în tesuturile hepatice (fig.18).

Activitatea 2.9 Diseminare

În cadrul **activității Act 2.9** de diseminare a rezultatelor, au fost publicate următoarele articole în reviste indexate ISI:

- Ciceu, A., Balta, C., Herman, H., Gharbia, S., Ignat, S. R., Dinescu, S., Váradi, J., Fenyvesi, F., Gyongyosi, S., Hermenean A., Costache, M. (2021). Complexation with Random Methyl-β-Cyclodextrin and (2-Hidroxypropyl)-β-Cyclodextrin Enhances In Vivo Anti-Fibrotic and Anti-Inflammatory Effects of Chrysin via the Inhibition of NF-κB and TGF-β1/Smad Signaling Pathways and Modulation of Hepatic Pro/Anti-Fibrotic miRNA. International Journal of Molecular Sciences, 22(4), 1869.

De asemenea, rezultatele au fost prezentate și în cadrul unor conferințe sub formă de prezentări orale sau postere la conferințe naționale și internaționale:

- Ignat, S. R., Gharbia, S., Dinescu, S., Balahura, R., Fenyvesi, F., Hermenean, A., & Costache, M. (2021). Human adipose-derived stem cells secretome and hepatocyte growth factor (HGF) exhibit a beneficial effect on hepatic fibrosis reversion. The 45th FEBS Virtual Congress, 3-8 iulie 2021, FEBS OPEN BIO, Vol. 11, p. 346-346. **Poster**
- Ignat, S. R., Dinescu, S., Fenyvesi, F., Váradi, J., Costache, M., Hermenean, A. (2021). *In vitro* biocompatibility of *Corylus avellana* gemmotherapic extract reinforced with chrysin/cyclodextrin nanocomplexes. 42nd Anniversary Symposium Of The Institute Of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" and 38th Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology. Virtual. Book of abstracts, p. 39 **Prezentare orală**
- Ignat, S. R., Dinescu, S., Fenyvesi, F., Váradi, J., Costache, M., Hermenean, A. (2021). Antifibrotic effects of *Corylus avellana* gemmotherapic extract reinforced with chrysin/cyclodextrin nanocomplexes on hepatic stellate cells. 42nd Anniversary Symposium Of The Institute Of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" and 38th Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology. Virtual. Book of abstracts, p. 38 **Prezentare orală**
- Olah N.K, Pripon-Furtuna, Burtescu R.F., Kelemen I., Chișe E., Turcuș V., Herman H., Ciceu A., Hermenean A, Morpho-anatomical and phytochemical study of the *Corylus avellana* L. species (buds), 42nd Anniversary Symposium Of The Institute Of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" and 38th Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology. Virtual. Book of abstracts, p. 37 **Prezentare orală**
- Olah N.K, Burtescu R.F., Chișe E., Herman H., Ciceu A., Balta C, Gharbia S, Rosu M, Mladin B., Hermenean A., Phytochemical study of the gemmotherapic extract from Hazel buds (Corylus avellana L.) enriched with chrysin/cyclodextrins, 42nd Anniversary Symposium Of The Institute Of Cellular Biology And Pathology "Nicolae Simionescu" and 38th Annual Scientific Session Of The Romanian Society For Cell Biology. Virtual. 04-06.11.2021, Poster abstracts, p. 27 **Poster**