Raport ştiinţific final

(2020 - 2022)

Competiţia:	**Proiect experimental demonstrativ - PED 2019**
Nr. contract:	262PED
Cod proiect:	PN-III-P2-2.1.-2019-3609
Domeniul de cercetare:	Bioeconomie
Titlul :	**UN NOU PRODUS PE BAZĂ DE EXTRACT GEMOTERAPIC DE CORYLUS AVELLANA ÎMBOGĂȚIT CU NANOCOMPLEXE DE CRISINĂ/CICLODEXTRINE DESTINAT FIBROZEI HEPATICE ÎN DIABETUL ZAHARAT**
Acronim:	GEMMODIALIVER
Dată începere proiect:	03.08.2020
Dată finalizare proiect:	02.08.2022
Durata (luni):	24
Buget total:	670.000,00
Sursa 1 Bugetul de stat	600.000
Sursa 2 Alte surse atrase (cofinanţare):	70.000,00
Pagina web proiect:	https://unibuc.ro/cercetare/promovarea-rezultatelor-cercetarii/proiecte-de-cercetare/proiecte-cu-finantare-nationala/pn-iii-p2-2-1-ped-2019-3609-262ped/
Instituţia coordonatoare:	Universitatea din Bucuresti
Director de proiect:	Prof.dr.Anca Hermenean
Partener 1 proiect (P1):	Universitatea de Vest Vasile Godis din Arad
Partener n proiect (Pn):	SC PlantExtrakt SRL

1. **Prezentare generală a realizării obiectivelor proiectului, cu punerea în evidență a rezultatelor și gradul de realizare a obiectivelor. Prezentarea trebuie să includă explicații care să justifice diferențele (dacă există) dintre activitățile preconizate și cele realizate.**

Scopul acestui proiect este dezvoltarea unei noi formulări complexe de produs fitoterapeutic bazat pe flavonoidul crisină încapsulat în ciclodextrine și extractul gemoterapic de *Corylus avellana*, conceput pentru a trata fibroza hepatică în diabetul zaharat.

Obiectivul 1. Dezvoltarea și caracterizarea noului produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* și nanocomplexe de crisină/ciclodextrine.

Obiectivul 2. Evaluarea *in vitro* a biocompatibilității, potențialului antioxidant și antifibrotic al noului produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* și nanocomplexe de crisină/ciclodextrine

Obiectivul 3. Validarea *in vivo* a efectelor anti-fibrotice ale produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* și nanocomplexe de crisină/ciclodextrine la șoareci diabetici cu fibroza indusă experimental

<u>Obiectiv 1: Dezvoltarea și caracterizarea noului produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* și nanocomplexe de crisină/ciclodextrine</u>.

Gradul de indeplinire al obiectivului: 100%

Rezumat rezultate: S-a realizat dezvoltarea și caracterizarea unui nou produs pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* (CAG) îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (CAG-CHR/RAMEB si CAG-CHR/HPBCD). Caracterizarea chimică a dovedit că CAG este bogat în poliflavonoizi, în special hiperozidă și izocvercitrină, dar și luteolin-7-O-glucozidă, crizină, cvercetină și acid galic. Crisina a fost formulată cu două β-ciclodextrine diferite pentru a forma complexe de incluziune cu hidroxipropil- (HPBCD) și ramdomly metilat (RAMEB) β-ciclodextrine la raporturi molare 1: 1. Complexele au fost testate pentru solubilizare în apă. Creșterea eficienței de solubilizare a crisinei a fost detectată în ambele complexe, dar complexul RAMEB a prezentat o solubilizare mai bună a crisinei decât complexul HPBCD. Extractul de gemoterapic de *Corylus avellana* a fost amestecat atât cu complexe RAMEB-, cât și cu HPBCD-crisină și a fost supus liofilizării. S-au testat diferite rapoarte de extract-complex pentru stabilizarea amestecului prin liofilizare si caracterizate prin analiza cromatografică. Analiza LC-MS a relevat faptul că preparatele fitoterapeutice de *Corylus avellana* si nanoparticule de crisină/ciclodextrine au un continut bogat în polifenoli. Se remarcă o concentrație mai mare din grupa acizilor fenolici - acidul clorogenic, iar dintre flavonoide – hiperozida, rutozida si crisina. Cele mai mari concentrații s-au înregistrat pentru varianta CAG-CHR/RAMEB fără PEG.

<u>Activitatea 1. Obtinerea si caracterizarea extractului gemoterapic de *Coryllus avelana*</u>

1.1.*Prepararea maceratului glicerinic.* Mugurii de Alun, *Corylus avellana* L. au fost recoltați, în februarie 2019 si 2020, din flora spontană, pădurea Baciului, Jud. Cluj. Recoltarea s-a realizat conform certificării EcoInspect Ro-008, respectând regulile de bună practică de colectare și biodiversitatea zonei. Masa de plantă recoltată a fost conservată în amestec glicerină – alcool etilic 96 % vol. (1:1). Mugurii au fost identificați de către expertul de la laboratoarele de Controlul Calității de la PlantExtrakt. Extractul din muguri de Alun s-a obținut conform Farmacopeei Franceze respectiv Farmacopeei Europene, monografia 2.1.3, folosind ca și solvent amestec de glicerină – alcool etilic 96 % vol. (1:1). Planta s-a prelucrat în stare proaspătă, conservată în amestec de solvent. Raportul de extracție este 1:20 partea uscată din plantă – solvent. Cantitatea de solvent adăugat s-a calculat conform umidității plantei (tabel 1). Extracția s-a realizat la rece, prin macerare, timp de 20 zile, cu agitări zilnice 2 x 10 minute. După 20 zile de agitare lichidul s-a decantat de pe masa de plantă, iar planta s-a supus presării la 350-400 atm, lichidul presat fiind amestecat cu lichidul decantat. Soluția extractivă astfel obținută este extractul gemoterapic din muguri de Alun (CAG).

1.2.*Evaluarea profilului fitochimic al extractului*

1.2.1. *Screening inițial prin cromatografie pe strat subțire (CSS)*. Evaluarea inițială s-a realizat prin CSS, metodă prin care se poate evalua ce clase de compuși activi se regăsesc în extractele gemoterapice de *Corylus avellana* (CAG).

Concluzii: În urma screeningului CSS am putut stabili că CAG conține polifenoli, în special din clasa flavonoidelor (fig.1-3) și puține componente lipofile (fig.4), respectiv nu conține alcaloizi (fig.5), ceea ce subliniază siguranța în administrare a acestui extract. Pe baza acestei analize se poate identifica în CAG hiperozida și quercetina din clasa flavonoidelor.

1.2.2. 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.

Se observă un conținut ridicat de polifenoli din care 5,3 – 7,3 % reprezintă flavonoide. Polifenolii totali sunt în concentrație mai mare în stadiu de evoluție mai timpurie a mugurilor și scade în timpul dezvoltării acestora, iar conținutul de flavonoide evoluează invers fiind mai mic la începutul dezvoltării mugurelui și crește odată cu dezvoltarea acestuia.

Concluzii:Conținutul de polifenoli totali se poate stabili la min. 6 mg/ml, iar cel de flavonoide totale la min. 0,4 mg/ml. În funcție de acest conținut se poate stabili ca perioadă optimă de recoltare a mugurilor începând de la mijlocul lunii februarie, când mugurii sunt mai dezvoltați.

1.2.3. Analiza cromatografică pe coloană

Analiza cromatografică pe coloană, HPLC s-a realizat pentru a identifica mai în detaliu polifenolii conținuți de CAG, atât calitativ cât și cantitativ.

Concluzii: Din datele prezentate se poate observa că CAG conține cantități mai mari de hiperozidă și izocvercitrină, este de asemenea relative bogat în luteolin-7-O-glucozidă, crizină, cvercetină și acid galic. Variațiile de conținut sunt relativ mici de la un an la altul.

1.2.4.Analiza gaz-cromatografică

Screeningul CSS inițial a evidențiat și posibile componente lipofile în CAG. Analiza gaz-cromatografică cuplată cu spectrometria de masă a urmărit determinarea acestor componente.

Concluzii: În urma analizei s-au identificat acizi grași liberi dintre care cu o precizie de peste 80 % s-a putut identifica acidul 9-octadecenoic.

1.2.5. Analiza LC-MS

Pentru a evalua compoziția cât mai detaliată a extractului gemoterapic din muguri de Alun - *Corylus avellana* (CAG) s-a realizat o analiză LC/MS pentru determinarea profilului polifenolic.

Aceste analize au fost realizate suplimentar față de cerințele proiectului.

Concluzii:Extractul de Corylus are un continut bogat în polifenoli. Se remarcă o concentrație mai mare din grupa acizilor fenolici - acidul clorogenic, iar dintre flavonoide – hiperozida, rutozida si crisina.

<u>Activitatea 2. Obtinerea si caracterizarea nanocomplexelor de crisina/ciclodextrine</u>

2.1.Prepararea complexelor crisină-ciclodextrine. Crisina a fost formulată cu două β-ciclodextrine diferite pentru a forma complexe de incluziune cu hidroxipropil- (HPBCD) și ramdomly metilat (RAMEB) β-ciclodextrine la raporturi molare 1: 1.

2.2. Testul de solubilitate. Complexele au fost testate pentru solubilizare în apă. Complexele au fost dizolvate în apă timp de 24 de ore și spectrele de absorbție au fost înregistrate cu spectrofotometru UV. Ameliorarea eficientă a solubilității crisinei a fost detectată în ambii complexe, în timp ce complexul RAMEB a prezentat o solubilizare mai bună a crisinei decât complexul HPBCD (fig. 7)

2.3. Testul de solubilitate de fază a fost efectuat prin adăugarea unei cantități excesive cunoscute de pulbere de crisină. Au fost realizate concentrații crescătoare de crisină în ciclodextrine RAMEB/HPBCD (5-80 mM). Tuburile au fost vortexate timp de 30 de secunde pentru a obține dispersii bine amestecate (temeratura camerei, întuneric). După 72 de ore, fiecare probă a fost centrifugată la 15.000 rpm timp de 10 minute.

Probele au fost preluate din supernatantul clar, iar conținutul de crisină al probelor a fost analizat prin spectrofotometrie (Shimadzu UV-1900). Profilurile de solubilitate de fază ale crisinei au fost realizate de trasând solubilitatea crisinei față de concentrația ciclodextrinelor. Constanta de stabilitate (Ks) ale complexelor crisină-CD au fost calculate din diagrame de solubilitate de fază conform următoarei ecuații:

$$K_s = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})}$$

S0 — Solubilitatea crisinei în apă

Eficiența complexării (CE) și raportul molar medicament:ciclodextrina (D: CD) au fost calculate după cum urmează:

$$\text{CE} = \frac{\text{slope}}{(1 - \text{slope})}$$

$$\text{D} : \text{CD} = 1 : (1 + \frac{1}{CE})$$

2.4. Microscopie electronică scanning (SEM)

Morfologia particulelor solide de ciclodextrine, crisină și complexe crisină-ciclodextrină a fost investigată prin SEM (Hitachi S-4300 CFE).

Morfologia crisinei pure si a complexelor de crisină-ciclodextrine au fost examinate prin SEM (Fig.9). Crisina brută a prezentat particule agregate cu diferite forme și cu un spectru larg al dimensiunii particulelor. Particulele HPBCD au prezentat o formă sferică, în timp ce imaginile RAMEB au arătat că majoritatea particulelor sferice au fost sparte. Complexele crisina-HPBCD sau crisină-RAMEB au prezentat o morfologie complet diferită. După procesul de complexare, particulele originale de ciclodextrină și crisină au fost neidentificabile; cu toate acestea, agregatele care conțin particule amorfe mai mici au dezvăluit interacțiunea dintre crisină și ciclodextrine. Noua structură formată contribuie la o solubilitate mai mare și la biodisponibilitatea îmbunătățită a crisinei.

<u>Activitatea 3. Obtinerea si caracterizarea CAG-CHR/Cyclo</u>

3.1. Obținere.Extractul de gemmoterapic de *Coryllus avelana* a fost amestecat atât cu complexe RAMEB-, cât și cu HPBCD-crisină și a fost supus liofilizării. S-au utilizat atât ciclodextrine pure, cat și

polietilenglicol (PEG) pentru liofilizare. S-au testat diferite rapoarte de extract-complex pentru stabilizarea amestecului prin liofilizare. Cantitatea exces de ciclodextrină a fost, de asemenea, testată pentru stabilizare.

3.2. Analiza LC-MS

Pentru a evalua compoziția cât mai detaliată a produselor fitoterapeutice combinate muguri de *Corylus avellana* (CAG) și nanoparticule CHR/ciclodextrine, s-a realizat o analiză LC/MS pentru determinarea profilului polifenolic pentru următoarele combinații: CAG-CHR/RAMEB PEG, CAG-CHR/HPBCD PEG, CAG-CHR/RAMEB, CAG-CHR/HPBCD.

Aceste analize au fost realizate suplimentar față de cerințele proiectului.

Concluzii:Preparatele fitoterapeutice de Corylus avellana si nanoparticule de crisină/ciclodextrine au un continut bogat în polifenoli. Se remarcă o concentrație mai mare din grupa acizilor fenolici - acidul clorogenic, iar dintre flavonoide – hiperozida, rutozida si crisina. Cele mai mari concentrații s-au înregistrat pentru CAG-CHR/RAMEB fără PEG.

Obiectiv 2: Evaluarea *in vitro* a biocompatibilității, potențialului antioxidant și antifibrotic al noului produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* și nanocomplexe de crisină/ciclodextrine

Gradul de îndeplinire al obiectivului: 100%

Rezumat rezultate:

S-a realizat evaluarea capacității antioxidante a unui nou produs pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* (CAG) îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (CAG-CHR/RAMEB si CAG-CHR/HPBCD, cu si fără PEG) precum si evaluarea biocompatibilității in vitro. Analiza activității antioxidante a relevat faptul că extractul gemoterapic de Coryllus avelana cu nanoparticule crisină/RAMEB si fără PEG, are un potențial antioxidant semnificativ, corelabil cu conținutul de polifenoli. Probabil conținul mai mare de crisină din CAG-CHR/RAMEB a determinat o activitate anti-oxidantă mai mare decât a celorlalte compozitii fitoterapeutice.De asemenea, extractele au un efect inhibitor mediu asupra ureazei, cel mai mare efect anti-ureazic înreginstrându-se pentru CAG-CHR/RAMEB. Analiza biocompatibilității complexelor CHR/RAMEB, CHR/HPBCD, CAG-CHR/RAMEB, CAG-CHR/HPBCD, s-a realizat pe culturi de celule hepatice stelate umane din linia celulară LX2. Rezultatele testelor MTT, LDH și LIVE/DEAD au demonstrat biocompatibilitatea in vitro a complexelor CAG-CHR/Cyclo în concentrații mai mici de 100 µM. Activității anti-fibrotice in vitro realizată prin analiza expresiei markerilor (TGF-β1, SMAD 2/3) a avut-o CAG-CHR/RAMEB. Pe baza rezultatelor obținute *in vitro*, CAG-CHR/RAMEB a fost produsul selectat pentru validare prin teste *in vivo*.

Activitatea 1. Analiza biocompatibilitatii in vitro

S-a evaluat biocompatibilitatea complexelor CHR/RAMEB, CHR/HPBCD, CAG-CHR/RAMEB, CAG-CHR/HPBCD pe culturi de celule hepatice stelate umane din linia celulară LX2. După însămânțare, celulele au fost expuse timp de 24 h la mediu cu diferite concentrații de complexe (10, 50, 100 µM). În

urma expunerii la complexe, s-a evaluat nivelul viabilității celulare la nivel cantitativ prin testul MTT și la nivel calitativ prin Live/Dead. De asemenea, nivelul citotoxicității induse de complexe, a fost evaluat cantitativ prin testul LDH.

În urma realizării testului MTT, s-a obținut un profil descrescător al viabilității celulare care scade odată cu creșterea concetrației complexelor (Fig. 10). În prezența a 10 µM complexe, viabilitatea celulară nu este scăzută statistic semnificativ față de control. Între complexele diferite testate în această concentrație, nu se observă diferențe semnificative între nivelurile viabilității. 50 µM din complexele CHR/Cyclo, reduc viabilitatea celulară mai mult față de complexele CAG-CHR/Cyclo, ceea ce sugerează efectul benefic al CAG la nivelul complexului. Dar, niciunul dintre complexe în concentrația de 50 µM, nu reduc statistic semnificativ nivelurile viabilității celulare. În prezență de 100 µM de complexe, viabilitatea celulară este statistic semnificativ redusă față de control ($p<0.05$). Complexele CAG-CHR/Cyclo au menținut un nivel al viabilității celulare mai ridicat față de complexele CHR/Cyclo în toate concentrațiile, și mai ales la 100 µM. Acest lucru indică influența pozitivă a CAG asupra biocompatibilității complexelor.

Rezultatele testului MTT au fost confirmate și prin testul LDH care indică citotoxicitatea indusă de complexe asupra celulelor hepatice stelate (Fig. 11). Complexele în concentrația 10 µM nu au indus niveluri mai ridicate de citotoxicitate față de control. De asemenea, nici 50 și 100 µM din complexele CAG-CHR/Cyclo nu au afectat celulele în mod statistic semnificativ. Spre deosebire, CHR/Cyclo în concentrația de 50 µM au indus niveluri mai ridicate ale citotoxicității, iar 100 µM a indus niveluri statistic semnificativ crescute ($p<0.05$) față de control. Acest lucru indică superioritatea complexelor îmbogățite cu CAG în a avea un efect benefic asupra celulelor, față de complexele fără CAG.

Concluzii: *Așadar, pe baza rezultatelor testelor MTT, LDH și LIVE/DEAD, complexele CAG-CHR/Cyclo s-au dovedit a fi biocompatibile în concentrații mai mici de 100 µM.*

<u>Activitatea 2. Analiza capacitatii antioxidante in vitro</u>

2.1. Evaluarea efectului antioxidant

Efectul antioxidant este probabil datorat conținutului bogat în polifenoli de tipul flavonoide, acizi fenolici, taninuri.

Efectul antioxidant al acestor extracte s-a evidențiat prin mai multe metode spectrale: DPPH calculând IC_{50}, FRAP și CUPRAC, folosind metodele standard.

Se observă un potențial antioxidant mai mare la extractele cu un conținut mai mare de polifenoli totali la determinarea DPPH, metodă care evaluează un potențial antioxidant total. Potențialul antioxidant relativ la ionii feros și cupros arată un potențial sensibil mai mare la extractele cu un conținut mai ridicat de flavonoide.

Se poate concluziona că produsul analizat prezintă un potențial antioxidant semnificativ, corelabil cu conținutul de polifenoli. Efectul antioxidant al complexelor CAG cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine este probabil datorat conținutului bogat în polifenoli de tipul flavonoide, acizi fenolici, taninuri.

Efectul antioxidant al acestor extracte s-a evidențiat prin mai multe metode spectrale: DPPH calculând IC_{50}, FRAP și CUPRAC, folosind metodele standard.

Se observă un potențial antioxidant mai mare la produsului fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* si nanoparticule de crisină în RAMEB, fără PEG (CAG-CHR/RAMEB).

Concluzii: Se poate concluziona că complexul de extract gemoterapic de Corylus avellana cu RAMEB si fără PEG are un potențial antioxidant semnificativ, corelabil cu conținutul de polifenoli. Probabil conținul mai mare de crisină din CAG-CHR/RAMEB a determinat o activitate anti-oxidantă mai mare decât a celorlalte compozitii fitoterapeutice.

2.2. Evaluarea efectului anti-ureazic

Ureaza este o enzimă care scindează ureea și este corelat cu virilitatea anumitor bacterii ureazo-dependente.

Efectul anti-ureazic s-a determinat prin metoda standard, spectrofotometric.

Inhibarea ureazei pe o cantitate de 0,03 ml EGMA a fost de: 55,24 % la EGMA_02.2019; 60,28 % la EGMA_03.2019; 55,98 % la EGMA_01.2020 respectiv 57,28 % la EGMA_02.2020, față de 93,26 % al unei cantități de 0,2 mg de tiouree (standard inhibitor de urează) *Se poate observa că extractele au un efect inhibitor mediu asupra ureazei și relativ similar de la o perioadă de dezvoltare la alta respectiv de la un an la altul.*

Inhibarea ureazei pe o cantitate de 0,03 ml complex EGMA cu ciclodextrine a fost de: 62,57 % la RAMEB/PEG, 68,41 % RAMEB, 55,78 % HPBCD/PEG respectiv 57,62 % HPBCD, față de 93,26 % al unei cantități de 0,2 mg de tiouree (standard inhibitor de urează).

Concluzii. Se poate observa că extractele au un efect inhibitor mediu asupra ureazei, cel mai mare efect anti-ureazic înreginstrându-se pentru CAG-CHR/RAMEB.

<u>Activitatea 3 Evaluarea *in vitro* a activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analiza căii de semnalizare TGFβ</u>

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) s-a realizat prin analiza căii de semnalizare profibrotice TGF-β. 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 12a) și genic (Fig 12b), 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. 13).

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 14). 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*.

<u>Activitatea 4. Evaluarea *in vitro* a activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analiza apoptozei</u>

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 15). 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 15D).

De asemenea, a fost examinată și expresia markerilor apoptotici la nivel genic (Fig 16). 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.

<u>Activitatea 5. Selectarea celui mai performant CAG-CHR/Cyclo pentru experimentele *in vivo*</u>

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.

Obiectivul 3. Validarea *in vivo* a efectelor anti-fibrotice ale produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Coryllus avelana* și nanocomplexe de crisină/ciclodextrine la șoareci diabetici cu fibroza indusă experimental

Gradul de îndeplinire al obiectivului: 100%

Rezumat rezultate: Validarea proprietăților anti-fibrotice in vivo ale CAG-CHR/RAMEB s-a realizat pe un model experimental de soareci diabetici cu fibroză indusă cu CCl_4. Analiza căii de semnalizare profibrotice TGFβ/Smad, a markerului de activare a HSC - αSMA și a modulatorilor matricii extracelulare hepatice – MMP/Timp, a confirmat in vivo efectul antifibrotic hepatic al noului produs fitoterapeutic pe bază de *Corylus avellana* si nanoparticule de crisină în RAMEB. Aceste rezultate sunt confirmate si de studiile structurale și ultrastructurale, care au evidențiat restabilirea morfologiei hepatice aproape de lotul de control după tratament timp de 2 săptămâni cu CAG-CHR/RAMEB. De asemenea preparatul a dovedit și o puternică activitate anti-oxidantă la nivel hepatic.

Activitatea 1. Design experimental in vivo pe model de fibroza hepatica indusa cu CCl_4 la soareci 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 *Corylus avellana*-nanocomplex CHR/RAMEB, 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 *Corylus avellana*-crisina/ciclodextrine-RAMEB (CAG-CHR/RAMEB - Lotul 4), extract gemoterapic *Corylus avellana* (CAG - Lotul 5), nanocomplex de crisină/ciclodextrină (CHR/RAMEB - 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. Evaluarea activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analize hematologice si biochimice

Analiza parametrilor hematologici au relevat 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.

Analiza parametrilor biochimici serici au înregistrat 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. Loturile tratate au avut o scădere semnificativă comparativ cu controlul diabetic.

Activitatea 3. 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.17-V1a) si o ușoară dilatare a capilarelor sinusoide (Fig.17-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.17-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.17-V3). Hepatocitele hipertrofiate cu citoplasma spumoasă sunt prezente. In cazul grupului de șoareci tratați timp de 2 săptămâni cu extract gemmoterapic *Coryllus avelana* (Fig.17-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 *Corylus avellana*-crisina/ciclodextrine au prezentat o histo-arhitectură apropiată de cea a martorului si peste grupul V1b – control diabetic (Fig.17-V4). Cea mai slaba recuperare structurală s-a înregistrat pentru șoarecii cărora li s-a administrat doar crisină pură (Fig.17-V7).

Formarea septelor fibrotice perilobulare si pseudolobulilor a fost confirmată în coloratie tricromică pentru lotul V2 și în egală măsură la lotul de reversie *de novo* a fibrozei. Colagen insular se mai evidentiază la administrarea CHR pur , mai puțin la CHR/Cyclo, a CAG 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.

Activitatea 4. Activitatea antioxidanta in vivo a CAG-CHR/Cyclo

S-a analizat nivelul peroxidării lipidice, concentraţia glutationului redus, produşii de oxidare avansată a proteinelor, nivelul expresiei proteinei Nrf2, HemOxigenaza1 (fig.18).

În figura 11 se poate observa profilul și densitometrarea rezultatelor obţinute în cazul expresiei proteice Nrf-2, HemOX1 în urma tratamentului *in vivo* cu diferite complexe.

Concluzii: 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. 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.

Activitatea 5. Evaluarea activitatii anti-fibrotice in vivo a CAG-CHR/Cyclo prin analiza caii 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.12). Același pattern a fost confirmat pentru expresia imunohistochimică a αSMA în tesuturile hepatice.

Analiza expresiei genice a Smad 2 si 3 si TGFβ (fig.13) 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 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 ($p<0.001$). Același pattern a fost confirmat pentru expresia imunohistochimică a TGFβ în tesuturile hepatice. 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 ($p<0.001$).

<u>Activitatea 6. Evaluarea activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin analiza matricii extracelulare (EMC)</u>

Pentru a investiga efectele inhibitoare ale CAG-CHR/Cyclo, CAG, CHR/Cyclo, CHR asupra proliferării matricei extracelulare am măsurat nivelele mRNA ale Col-1, TIMP-1, MMP-1, -2, 3 si -9 prin analiză RT-PCR. Analiza expresiei genice a colagen 1 (Col-1) a relevat o supraexprimare semnificativă a expresiei genice a αSMA după instalarea diabetului si care se mentine la nivel ridicat imediat după inducerea fibrozei hepatice, precum si la 2 saptamani dupa inducerea fibrozei comparativ cu lotul martor si lotul diabet ($p<0.001$). Loturile tratate au avut o scadere semnificativă comparativ cu lotul diabetic si diabet-fibroza ($p<0.001$).

Expresia genică a TIMP-1, MMP-2, -3 si -9 au fost semnificativ crescute în cazul diabet-fibroză ($p < 0.001$). Nivelul mRNA ale TIMP-1, MMP-2, -3 si -9 hepatic au fost semnificativ scăzute la grupurile tratate cu CAG-CHR/Cyclo, CAG, CHR/Cyclo, CHR, comparativ cu grupurile diabet-fibroză si Diabet-

reversie fibroză ($p < 0.001$). Valorile cele mai apropiate de martor s-au inregistrat în cazul lotului CAG-CHR/Cyclo. In schimb, expresia genică a MMP-1 a fost semnificativ scăzută în cazul diabet-fibroză ($p < 0.001$) si crescută pentru grupurile tratate cu CAG-CHR/Cyclo, CAG, CHR/Cyclo, CHR, comparativ cu grupurile diabet-fibroză si Diabet-reversie fibroză ($p < 0.001$).

Expresiile imunohistochimice ale MMP-1 si MMP-9 confirmă patternul expresiei genice pentru acesti markeri.

Concluzii: *Dintre loturile tratate, produsul fitoterapeutic CAG-CHR/Cyclo (RAMEB) a avut cel mai puternic efect inhibitor asupra proliferării matricei extracelulare, restabilirea fiind evidențiată prin rebalansarea MMP/TIMP si scăderea expresiei genice a colagenului 1 la nivel tisular, comparativ cu lotul dibet fibroză.*

Activitatea 7. Evaluarea activitatii anti-fibrotice a CAG-CHR/Cyclo prin microscopie electronică

Aspectul ultrastructural al ficatului lotului martor indică un aspect normal al hepatocitelor uni si binucleate, cu mitocondrii avand criste evidente, un reticul endoplasmatic rugos cu retea de cisterne bine dezvoltate, depozite glicogen intracitoplasmatice si câteva lipide, precum si celule Ito care indica o activitate normală, cu implicare in metabolismul lipidelor (figura 18).

Inducerea fibrozei hepatice cu CCl_4 pe o perioadă de 7 săptămâni au indus profunde modificări ultrastructurale care afectează celulele parenchimului. Citoplasma hepatocitelor prezintă proliferări de reticul endoplasmatic neted (REN), alterări ale profilelor de reticul endoplasmatic rugos (RER), cu detașarea ribozomilor, alterări ale cristelor mitocondriale, acumulări de lipide. Se remarcă hipertrofieri ale celulelor hepatice stelate, care adopă fenotipul contractil si de asemenea acumulari masive de colagen peri-sinusoidal si în parenchimul hepatic (figura 19).

Co-tratamentul post-fibroză cu GAG- CHR/Cyclo RAMEB a restabilit ultrastructura hepatică aproape de martor. Se mai observă doar sporadic colagen în parenchim, proliferare moderată de REN (fig.20).

In schimb, tratamentul doar cu extract gemoterapic de *Corylus avellana,* sau crisină pură a imbunatațit doar partial ultrastructura hepatică, observându-se încă hepatocite degenerate cu cisterne de RER dilatate, proliferări de REN, nuclei modificați. De asemenea, acumularea de lipide este prezentă în unele hepatocite precum si colagen insular în parenchim. Celulele Ito au o activitate intensă si se remarcă infiltrate de celule imune în parenchim.

Concluzii: *Dintre loturile tratate, produsul fitoterapeutic CAG-CHR/Cyclo (RAMEB) a avut cel mai puternic efect de restabilire a ultrastructurii hepatice comparative cu lotul fibroză diabet.*

2. Prezentarea şi argumentarea nivelului de maturitate tehnologică (TRL) la finalul proiectului.

Conceptul de bază al proiectului a fost de a crește potențialul biologic al extractului gemoterapic obținut din muguri de *Corylus avellana*, cunoscut pentru vindecarea fibrozei hepatice din experiența fitoterapeutică a medicilor practicieni și din monografiile de gemoterapie, prin combinarea cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine. Ipoteza de la care am plecat în implementarea acestui proiect s-a bazatpe studiile noastre anterioare în care am arătat pentru prima dată activitatea antifibrotică hepatică a crisinei (Baltă, 2015, 2018).

Pornind de la TRL2 la începutul proiectului, având doi compuși naturali individuali, deja validați în laborator de către noi și de către fitoterapeuți în practică medicală, ne-am propus să dezvoltăm, să testăm, să validăm și să certificăm (brevet) un nou produs gemoterapic din muguri de *Coryllus avelan,a* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine cu potențial antifibrotic sporit în comparație cu cele individuale (TRL4), concepute pentru a vindeca fibroza hepatică în diabetul cronic. Pentru a realiza TRL4, am parcurs următoarele etape: (1) în prima etapă ne-am propus să dezvoltăm o formulă nouă de extract gemoterapic de *Coryllus avelana* înbogățit cu crisină/ciclodextrine, bazată pe nanoformulările complexelor crisină-ciclodextrină (HPBCD si RAMEB). Am realizat caracterizarea variantelor prin metode analitice si evaluarea conținutului specific în polifenoli; (2). în a doua etapă produsele obținute anterior au fost testate in vitro pentru potențialul antioxidant și antifibrotic (3). în a treia etapă, din cele 4 formule fitoterapeutice: CAG-CHR/RAMEB PEG, CAG-CHR/HPBCD PEG, CAG-CHR/RAMEB și CAG-CHR/HPBCD, produsul fitoterapeutic CAG-CHR/RAMEB a fost validat pentru studiile in vitro; (4) în etapa a patra, potențialul antifibrotic al produsul fitoterapeutic CAG-CHR/RAMEB a fost validat *in vivo* pe un model experimental de soareci diabetici cu fibroză hepatică indusă experimental, ceea ce confirmă nivelul de TRL4 la finalul proiectului. În pasul final, am brevetat noul nanocomplex gemoterapic dezvoltat și validat *in vitro* si *in vivo*, precum si tehnologia de obtinere.

Bibliografie: Balta C. et al. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 240:94-101; Balta C. *Dose-Response*, 2018, 16(3):1559325818789835;

3. Gradul de atingere a rezultatelor estimate (prezentarea produsului/tehnologiei sau a serviciului rezultat al proiectului).

<u>*Noul produs fitoterapeutic*</u> pe bază de extract gemoterapic obținut din muguri de *Corylus avellana* si nanoparticule de crisină/ciclodextrina RAMEB (CAG-CHR/RAMEB) a fost validat pentru proprietățile antifibrotice cele mai potente în urma studiilor in vitro si in vivo, fiind patentat ca o nouă combinație fitoterapeutică cu potențiale efecte terapeutice în tratarea fibrozei hepatice în diabetul zaharat. Acest produs fitoterapeutic are un continut bogat în polifenoli. Analiza LC-MS a evidențiat o concentrație mai mare din grupa acizilor fenolici - acidul clorogenic, iar dintre flavonoide – hiperozida (0,505±0,0374), rutozida (0,145 ±0,0241) si crisina (5,830 ±0,0942). Acest produs a dovedit cea mai mare activitate anti-oxidantă prin metodele DPPH, FRAP și CUPRAC, probabil pe baza conținutului cel mai mare de crisină dintre cele 4 combinații analizate: CAG-CHR/RAMEB sau HPBCD, cu sau fară polietilenglicol.

Produsul fitoterapeutic dezvoltat si caracterizat de noi în cadrul acestui proiect a dovedit (CAG-CHR/RAMEB) a demonstrat cea mai mare activitate anti-fibrotică in vitro, prin analiza expresiei markerilor (TGF-β1, SMAD 2/3). Analiza căii de semnalizare profibrotice TGFβ/Smad, a markerului de

activare a HSC - αSMA și a modulatorilor matricii extracelulare hepatice – MMP/Timp, a confirmat in vivo efectul antifibrotic hepatic al noului produs fitoterapeutic pe bază de *Corylus avellana* si nanoparticule de crisină în RAMEB. Aceste rezultate sunt confirmate si de studiile structurale și ultrastructurale, care au evidențiat restabilirea morfologiei hepatice aproape de lotul de control după tratament timp de 2 săptămâni cu CAG-CHR/RAMEB. De asemenea preparatul a dovedit și o puternică activitate anti-oxidantă la nivel hepatic.

Tehnologia de obținere, caracterizare și validare prin studii experimentale in vitro si in vivo a noului produs fitoterapeutic pentru activități anti-fibrotice hepatice în condiții de hiperglicemie, a fost de asemenea un indicator de rezultat, fiind inclus în brevetul submis la OSIM, împreună cu produsul fitoterapeutic.

S-a realizat dezvoltarea și caracterizarea unui nou produs pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* (CAG) îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (CAG-CHR/RAMEB si CAG-CHR/HPBCD). Caracterizarea chimică a dovedit că CAG este bogat în poliflavonoizi, în special hiperozidă și izocvercitrină, dar și luteolin-7-O-glucozidă, crizină, cvercetină și acid galic. Crisina a fost formulată cu două β-ciclodextrine diferite pentru a forma complexe de incluziune cu hidroxipropil- (HPBCD) și ramdomly metilat (RAMEB) β-ciclodextrine la raporturi molare 1: 1. Complexele au fost testate pentru solubilizare în apă. Creșterea eficienției de solubilizare a crisinei a fost detectată în ambele complexe, dar complexul RAMEB a prezentat o solubilizare mai bună a crisinei decât complexul HPBCD. Extractul de gemoterapic de *Corylus avellana* a fost amestecat atât cu complexe RAMEB-, cât și cu HPBCD-crisină și a fost supus liofilizării cu sau fără PEG. S-au testat diferite rapoarte de extract-complex pentru stabilizarea amestecului prin liofilizare si caracterizate prin analiza cromatografică si analiza LC-MS.

4. Impactul rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut.

Ciroza hepatică și diabetul zaharat (DZ) sunt două boli cronice cu impact semnificativ asupra calității vieții. DZ are o prevalență globală estimată de aproximativ 9%, iar până în 2030, 300-400 de milioane de oameni vor fi afectați în întreaga lume [1], rezultând un efort economic și social semnificativ [2, 3]. Scăderea toleranței la glucoză este observată la aproximativ 80% dintre pacienții cu ciroză, în timp ce 30-60% dintre pacienții cu ciroză avansată dezvoltă diabet [4]. Dovezile cumulate ale rezultatelor cercetărilor anterioare sugerează că diabetul [5], rezistența la insulină [6, 7] și nivelul de glucoză din sânge [8] sunt asociate cu progresia fibrozei hepatice la pacienții cu boli hepatice cronice. Puține studii au evidențiat impactul DZ de tip 2 asupra rezultatelor clinice ale cirozei. În mai multe analize retrospective transversale ale pacienților cu ciroză, DZ a conferit un risc mai mare de complicații [9, 10]. Mai mult, studiul Verona, care a înrolat > 7000 de indivizi cu DZ de tip 2, a concluzionat un risc de mortalitate pe 5 ani de 2,52 ori (IC 95%: 1,96–3,2) la acesti pacienți raportat la riscul general în populație[11].

In acest context, dezvoltarea unei noi formulări complexe de produs fitoterapeutic, bazată pe compusul natural crisină, încapsulat pentru o bună solubilizare în ciclodextrine (RAMEB) și extractul gemmoterapic de *Coryllus avelana*, conceput pentru a inversa fibroza hepatică în diabet, are un *impact științific* important. De asemenea, prin implementarea unei noi tehnologii de obținere, proiectul are și un *impact economic* pentru industria de profil (transfer tehnologic), dar si din punct de vedere al posibilelor reduceri de costuri pentru tratamentul fibrozei hepatice în complicațiile incipiente ale diabetului zaharat. De asemenea, proiectul are și un însemnat *impact social*, costurile

de obținere a noului produs ce vor fi reflectate într-un preț redus al produsului pe piață, îl va face accesibil tuturor categoriilor sociale.

Bibiliografie:

[1] Sudharsanan N. et al., 1990-2008. *Population HealthMetrics*, 2015, 13(1):33; [2] GBD 2015 *The lancet*, 2016, 388:1459–1544; [3] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). *The Lancet*, 2016, 387(10027): 1513–1530; [4] García-Compeán D. et al. *Ann Hepatol*, 2012, 11:240-248; [5] Musso G. et al. *JAMA Internal Medicine*, 2017, 177(5):633–640; [6] Petta S. et al. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103(5):1136–1144; [7] D'Souza R. et al. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(7): 1509–1515; [8] Ratziu V. et al. *J Hepatol*, 2003, 39(6):1049-55; [9] Harrison S. A. *J Clin Gastroenterol*, 2006, 40(1):68–76; [10] Li X. et al. *BioMed Res Int*, 2019:5308308; [11] Trombetta M. et al. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2005, 22(2):24-27;

5. Detalii privind exploatarea și diseminarea rezultatelor proiectului

Articole ISI:

1. Ferenc Fenyvesi, Thi Le Phuong Nguyen, Ádám Haimho, Ágnes Rusznyák, Gábor Vasvári, Ildikó Bácskay, Miklós Vecsernyés, Simona-Rebeca Ignat, Sorina Dinescu , Marieta Costache, Alina Ciceu, Anca Hermenean, Judit Váradi. 2020. Cyclodextrin Complexation Improves the Solubility and Caco-2. Permeability of Chrysin, *Materials*, 13, 3618; doi:10.3390/ma13163618

2. Ignat, S.R.; Dinescu, S.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Nguyen, T.L.P.; Ciceu, A.; Hermenean, A.; Costache, M. Complexation with Random Methyl-β-Cyclodextrin and (2-Hydroxypropyl)-β-Cyclodextrin Promotes Chrysin Effect and Potential for Liver Fibrosis Therapy. *Materials* 2020, 13, 5003. DOI: 10.3390/ma13215003

3. 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.

Meeting Abstracts:

1. 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

2.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. Book of abstracts, p. 38

3. Olah N.K, Pripon-Furtuna, Burtescu R.F., Kelemen I., Chișe E., Turcuș V., Herman H., Ciceu A., Hermenean A, (2021).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. Book of abstracts, p. 37

4. 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.

5.Cornel Baltă, Hildegard Herman, Sami Gharbia, Alina Ciceu, Marcel Rosu, Bianca Mladin, Sorina Nicoleta Voicu, Coralia Cotoraci, Anca Dinischiotu, Ferenc Fenyvesi, Judit Váradi, Neli Olah, Ramona Burtescu, Anca Hermenean, Hepatoprotective effects of Corylus avellana extract and chrysin/cyclodextrin nanocomplexes in diabetes mellitus complications, Zilele Academice aradene, Ed.XXXII, Arad 25-29 mai 2022, Book of Abstracts, p37-p38, ISBN 978-973-664-920-2

6.S.R. Nazarie, S. Dinescu, F. Fenyvesi, N. Olah, M. Costache, A. Hermenean, Gemmotherapic extract from *Corylus avellana* potentiates the chrysin effect on activated hepatic stellate cells reversion, FEBS Open Bio 12 (Suppl. S1) (2022) 67–336 DOI: 10.1002/2211-5463.13440, P-03.4-054, pp.219.

Prezentări la conferințe științifice naționale/internaționale:

1.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 conference. **Prezentare orală**

2. 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 conference. **Prezentare orală**

3. 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 conference. **Prezentare orală**

4. 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**

5.Cornel Baltă, Hildegard Herman, Sami Gharbia, Alina Ciceu, Marcel Rosu, Bianca Mladin, Sorina Nicoleta Voicu, Coralia Cotoraci, Anca Dinischiotu, Ferenc Fenyvesi, Judit Váradi, Neli Olah, Ramona Burtescu, Anca Hermenean, Hepatoprotective effects of Corylus avellana extract and chrysin/cyclodextrin nanocomplexes in diabetes mellitus complications, Zilele Academice aradene, Ed.XXXII, Arad 25-29 mai 2022. **Prezentare orală**

6.Cornel Baltă, Hildegard Herman, Sami Gharbia, Alina Ciceu, Marcel Rosu, Bianca Mladin, Sorina Nicoleta Voicu, Coralia Cotoraci, Anca Dinischiotu, Ferenc Fenyvesi, Judit Váradi, Neli Olah, Ramona Burtescu, Victor Eduard Peteu, Mihaela Gherghiceanu, Anca Hermenean - Evaluarea in vivo a activității antifibrotice la nivel hepatic unei noi compoziții fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine în complicațiile diabetul zaharat, Școală de Primăvară de Gemmaeterapie Ediția 2022, Arad 3-5 iunie 2022. **Prezentare orală**

7.S.R. Nazarie, S. Dinescu, F. Fenyvesi, N. Olah, M. Costache, A. Hermenean, Gemmotherapic extract from *Corylus avellana* potentiates the chrysin effect on activated hepatic stellate cells reversion- P-03.4-054, 25th IUBMB Congress, the 46th FEBS Congress and the 15th PABMB Congress (*The Biochemistry Global Summit)*, Lisabona 9th – 14th July 2022. **Poster**

Workshop de diseminare – organizat de PlantExtrakt în colaborare cu Universitatea de Vest Vasile Goldiș din Arad, Asociatia Romana de Gemotrapie si Homeopatie, Colegiul Farmacistilor si Colegiul Medicilor – Școală de Primăvară de Gemmaeterapie Ediția 2022, 3-5 iunie 2022.

Brevet OSIM:

Patent national – aplicația nr. A/00328, 14.06.2022 "Compoziție fitoterapeutică pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine destinat fibrozei hepatice în diabetul zaharat si metodă de obținere a acesteia"

6. **Prezentarea livrabilelor/indicatorilor obținuți la finalul proiectului comparativ cu cei propuşi.**

Nr. crt.	Livrabile/indicatori planificați	Nr.	Livrabile/indicatori realizați	Nr.
1.	Articole ISI	3	Articole ISI reviste Q1 si Q2 (Materials si IJMS)	3
2.	Meeting Abstracts	0	Meeting Abstracts, din care 2 indexate ISI	6
3.	Participari conferinte nationale/internationale	7	Prezentari orale si poster	7
4.	Variante de produse fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* (CAG) și nanoparticule de crisină/ciclodextrine obtinute, caracterizate și evaluate pentru activitatea anti-fibrotică prin experimente *in vitro*	4	CAG-CHR/RAMEB, CAG-CHR/HPBCD, CAG-CHR/RAMEB-PEG, CAG-CHR/HPBCD-PEG	4
5.	Produse noi fitoterapeutice pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* (CAG) și nanoparticule de crisină/ciclodextrine validat *in vivo* pentru activitatea anti-fibrotică hepatică în asociere cu diabet	1	CAG-CHR/RAMEB	1
6.	Tehnologie de obtinere și caracterizare a unui nou produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* (CAG) și nanoparticule de crisină/ciclodextrine		Tehnologie de obtinere și caracterizare a CAG-CHR/RAMEB	
6.	Brevetarea noului produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* (CAG) și nanoparticule de crisină/ciclodextrine validat *in vivo* cu activitate anti-fibrotică hepatică si a tehnologiei de obtinere	1	cerere brevet OSIM A/00328, 14.06.2022	1
7.	Workshop de diseminare	1	Școală de Primăvară de Gemmaeterapie, 3-5 iunie 2022	1

Prezentarea succintă a rezultatelor proiectului

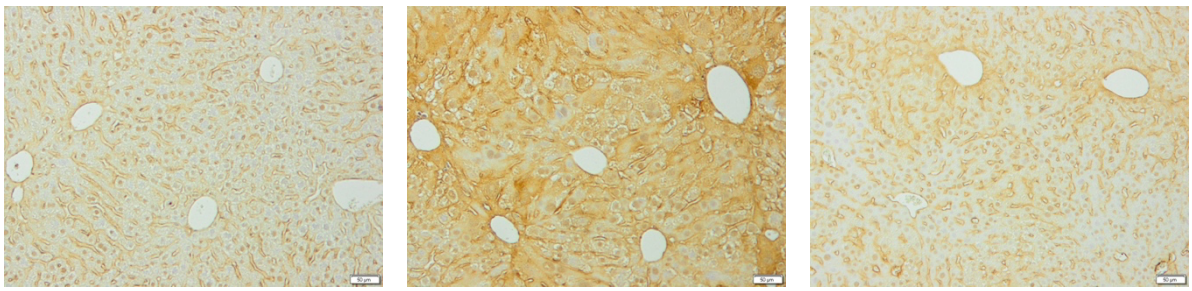
Ciroza hepatică și diabetul zaharat sunt două boli cronice cu impact semnificativ asupra calității vieții. Diabetul are o prevalență globală estimată de aproximativ 9%, iar până în 2030, 300-400 de milioane de oameni vor fi afectați în întreaga lume, rezultând un efort economic și social semnificativ. Scăderea toleranței la glucoză este observată la aproximativ 80% dintre pacienții cu ciroză, în timp ce 30-60% dintre pacienții cu ciroză avansată dezvoltă diabet.

In acest context am dezvoltat un nou produs fitoterapeutic bazat pe flavonoidul crisină încapsulat în ciclodextrine și extractul gemoterapic din muguri de *Corylus avellana*, conceput pentru a trata fibroza hepatică în diabetul zaharat. Acest produs fitoterapeutic conține o concentrație mai mare din grupa acizilor fenolici - acidul clorogenic, iar dintre flavonoide – hiperozida, rutozida si crisina, care-i conferă o puternică activitate anti-oxidantă și proprietăți terapeutice anti-fibrotice, și care au fost demonstrate prin experimente *in vitro* si *in vivo* pe model experimental de fibroză hepatică la soareci diabetici.

Rezultatele științifice au fost diseminate, după cum urmează: 3 articole în reviste ISI, participări la 7 conferințe naționale si internationale si organizarea unui workshop de diseminare.

Noul produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana,* îmbogățit cu nanoparticule de crisină/ciclodextrine împreună cu tehnologia de obținere au fost incluse în cererea de brevetare națională, pentru a pregăti transferul tehnologic către piața de profil.

a. **b.** **c.**



Expresia imunohistochimică a proteinei pro-fibrotice TGF-β1 în ficatul lotului diabet fibroză (b) si scăderea expresiei proteice în ficatul lotului tratat cu noul produs fitoterapeutic pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana,* îmbogățit cu nanoparticule de crisină/RAMEB (c), similar lotului de control (a)

Director de proiect
Prof.dr. Anca Hermenean
Data:02.08.2022