I.O.S.U.D. - Universitatea de Vest ”Vasile Goldiș” din Arad
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Arad, 2016

REZUMAT

Cercetări privind hepatotoxicitatea unor xenobiotice și hepatoprotecția indusă de extracte și principii bioactive de origine vegetală

Doctorand: **Teodora Melinda Horga (Mariașiu)**

Conducător de doctorat: **Prof.univ.dr. Eftimie Miuțescu**

Arad, 2016

PhD THESIS

Research on the hepatotoxicity of xenobiotics and hepatoprotective induced bioactive extracts and vegetable products

PhD Student: **Teodora Melinda Horga (Mariașiu)**

Scientific supervisor: **Prof.univ.dr. Eftimie Miuțescu**

CUPRINS

INTRODUCERE 15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII 17
1. ROLUL CENTRAL AL FICATULUI ÎN METABOLISMUL XENOBIOTICELOR 18
1.1. Ficatul – Structură şi funcţii 18
1.1.1. Structura ficatului 18
1.1.1.1. Lobul hepatic clasic (descris de Malpighi în 1866) 18
1.1.1.2. Lobul hepatic portal 19
1.1.1.3. Acinul hepatic (descris de Rappaport în 1962) 19
1.1.2. Funcţiile ficatului 20
1.2. Hepatocitele 21
1.2.1. Celulele hepatice 21
1.2.2. Celule parenchimale 21
1.2.3. Celulele non-parenchimale 22
1.3. Celulele Kupffer 22
1.4. Celulele Ito 23
1.5. Celulele Pit 23
1.6. Celulele entoteliale 24
2. PRINCIPALELE XENOBIOTICE CARE AFECTEAZĂ HOMEOSTAZIA 25
2.1. Medicamentele 25
2.1.1. Subsţante direct hepatotoxice 25
2.1.2. Reacţii idiosincrazice 26
2.1.3. Reacţii colestatice 26
2.2. Aditivi alimentari 26
2.2.1. Coloranţi 27
2.2.2.Conservanţi 27
2.2.3. Edulcoranţi 28
2.2.4. Antioxidanţi 29
2.2.5. Emulsifianţi 30
2.2.6. Preparate enzimatice 30
2.2.7. Aromatizanţii 31
2.2.8. Potenţiatori de aromă 31
2.2.9. Alte substanţe cu specific de aditivi alimentari 32
2.3. Droguri 32
2.3.1. Opiaceele 32
2.3.2. Stimulentele 32
2.3.3. Cannabis-ul şi derivaţii acestuia 33
2.3.4. Drogurile sintetice 33
2.3.5. Halucinogenele 33
2.3.6. Sedativele şi somniferele 33
2.3.7. Inhalantele 33
2.3.8. Alcoolul 33
2.3.9. Tutunul 34
2.3.10. Drogurile de petrecere 34
2.4. Agrochimicale 34
2.4.1. Pesticide Organo-Clorurate 35
2.4.2. Pesticide Organo-Fosforice 35
2.5. Poluanţi produşi prin contaminare microbiană 36
2.6. Poluanţi produşi prin transformări chimice şi fizice ale compuşilor naturali 36
3. BIOACTIVAREA XENOBIOTICELOR ÎN METABOLIŢI REACTIVI 39

3.1. Citocromul P450 39
3.2. Reacţiile de biotransformare 40
3.2.1. Faza I (funcţionalizarea) 40
3.2.2. Faza II (conjugarea) 41
3.3. Peroxidazele 41
3.3.1 Uridin-difosfat glucuronoziltransferaza (UGT) 42
3.3.2. SULT (sulfotransferaze) 44
3.3.3. N-acetil transferaza (NAT) 45
3.3.4. Glutation S-transferazele (GST) 47
4. MODIFICĂRI HISTOPATOLOGICE ŞI FUNCŢIONALE LA NIVEL HEPATIC DETERMINATE DE METABOLIZAREA XENOBIOTICELOR 50
4.1. Clasificarea leziunilor hepatice 50
4.1.1. Leziuni citotoxice acute 50
4.1.1.1. Steatoza hepatică 50
4.1.1.2. Degenerarea parenchimatoasă 51
4.1.2. Leziuni colestatice 51
4.1.3. Hepatopatii cronice active 51
4.1.3.1. Fosfolipidoza 51
4.1.3.2.Ciroza hepatică 52
4.1.4. Tumori 52
4.2. Diagnosticul leziunilor hepatice cu ajutorul unor biomarkeri de laborator 53
4.2.1. Enzimele serice – aminotransferazele 53
4.2.2. Fosfataza serică alcalină 54
4.2.3. γ- Glutamiltransferaza serică (GGT) 55
4.2.4. 5'-Nucleotidaza serică 55
4.2.5. Bilirubina serică 55
4.2.6. Acizii serici biliari 56
4.2.7. Albumina serică 57
4.2.8. Timpul de protrombină (PT) 57
5.EXTRACTE ŞI PRINCIPII BIOACTIVE DE ORIGINE VEGETALĂ CU EFECT HEPATOPROTECTOR 59
5.1. Extracte vegetale şi compuşi bioactivi 59
5.1.1. Saponinele (saponozide) 60
5.1.2. Flavonoidele (pigmenţi vegetali) 60
5.1.3. Uleiurile eterice 61
5.1.4. Derivaţii acizilor polifenol-carboxilici 61
5.1.5. Depsidele 61
5.1.6. Taninurile 61
5.2. Flavonoizi 62
5.2.1. Silimarina (ciulinul laptelui, armurariul) 63
5.2.2. Crisina (5,7-Dihydroxyflavone) 68
5.2.3. Quercetina 70
5.2.4. Hesperetina (5, 7, 3 '- trihidroxi - 4 - metoxiflavanonă) 75
5.2.5. Rutina (quercentin-3-o-rutinozid) 77
CONTRIBUŢIA PERSONALĂ 80
1. IPOTEZA DE LUCRU/SCOP/OBIECTIVE GENERALE 81
1.1. Motivaţie 81
1.2. Obiective 82
1.3. Metodologie generală 82
2. CERCETĂRI *IN VITRO* PRIVIND ACŢIUNEA HEPATOPROTECTOARE A

FLAVONOIZILOR ÎMPOTRIVA TOXICITĂŢII INDUSE DE CCl_4 84
2.1. Ipoteză, scop, obiective 84
2.2. Materiale şi metode 85
2.2.1.Cultura celulară 85
2.2.2. Tratament celular 85
2.2.3. Testul de toxicitate MTT 86
2.2.4. Analize statistice 86
2.3. Rezultate 86
2.4. Discuţii 91
2.5. Concluzii 92
3. CERCETĂRI *IN VIVO* PRIVIND ACŢIUNEA HEPATOPROTECTOARE A CRISINEI ÎMPOTRIVA ACŢIUNII TOXICE ACUTE INDUSĂ DE TERTACLORURA DE CARBON (CCl_4) 93
3.1. Ipoteză, scop, obiective 93
3.2. Materiale şi metode 94
3 .2.1. Substanţe chimice 94
3.2.2. Animale şi Protocol Experimental 95
3.2.3. Activitatea markerilor hepatici serici 95
3.2.4. Examen histopatologic 96
3.2.5. Teste de imunohistochimie 96
3.2.6. Microscopie electronică 97
3.2.7. Studiu de modelare moleculară 97
3.2.8. Analiză statistică 98
3.3 Rezultate 98
3.3.1. Activitatea transaminazelor serice ALT şi AST 98
3.3.2. Analiza histologică 100
3.3.3. Analiza imunohistochimică a markerilor de inflamaţie 106
3.3.4. Microscopie electronică 114
3.3.5. Studiu de modelare moleculară 117
3.4. Discuţii 120
3.5. Concluzii 122
4. CERCETĂRI *IN VIVO* PRIVIND ACŢIUNEA HEPATOPROTECTOARE A CRISINEI ÎMPOTRIVA HEPATOTOXICITĂŢII INDUSE DE TRATAMENTUL CU MITOXANTRONĂ 123
4.1 Ipoteză, scop şi obiective 123
4.2.Materiale şi metode 125
4.2.1. Substanţe chimice 125
4.2.2. Animale şi protocol experimental 125
4.2.3. Metode şi tehnici utilizate în investigaţiile structurale 126
4.2.3.1. Tehnica histologică 126
4.2.3.2. Tehnica imunohistochimică 127
4.3. Rezultate 128
4.3.1. Examen histopatologic 128
4.3.2. Analiza imunohistochimică a markerilor de apoptoză 133
4.4. Discuţii 139
4.5. Concluzii 141
CONCLUZII GENERALE 142
BIBLIOGRAFIE 145
LISTA DE PUBLICAŢII 178
ANEXE 180

INTRODUCERE

Studiul eficacităţii şi toxicităţii administrării unor substanţe chimioterapeutice prezintă în contextul medical actual un interes deosebit care se confruntă cu creşterea incidenţei unor boli cum ar fi: cancerul, alergii, bolile autoimune, etc. Administrarea citostaticelor în chimioterapia anticanceroasă manifestă de cele mai multe ori efecte toxice secundare provocând dereglarea funcţionalităţii metabolismului celular al ţesuturilor şi organelor secundare.

Majoritatea citostaticelor îşi exercită efectele asupra proliferării celulare şi creşterii tumorale [1]. Una dintre caracteristicele importante a chimioterapiei clasice este absenţa unei specificităţi absolute asupra celulei canceroase [2].

Dintre citostaticele utilizate în practica medicală, mitoxantrona este un antibiotic non-antraciclinic din clasa antracendionelor (o clasă nouă de citostatice), având indicaţii terapeutice multiple: leucemii acute limfocitare, leucemii acute non-limfocitare, leucemii mieloide cronice, limfoame maligne, cancere mamare avansate şi recidivate, cancere ovariene, cancere de prostată hormono-rezistente, hepatocarcinoame [1].

Tetraclorura de carbon (CCl_4) este un hepatotoxic foarte des folosit în zilele noastre pentru a evalua activitatea hepatoprotectoare a diferiţilor compuşi. Leziunea hepatică produsă de tetraclorura de carbon (CCl_4) se caracterizează prin leziuni tisulare progresive, începând cu inflamarea şi necroza, urmate de fibroză şi terminându-se cu ciroza. Rapoarte anterioare au arătat faptul că inflamaţia este iniţiată de eliberarea unor mediatori proinflamatori, inclusiv TNF-α, COX şi IL-6 în condiţiile de stres al speciilor reactive de oxigen (ROS) în hepatotoxicitatea indusă de CCl_4, în paralel cu dezvoltarea unor procese apoptozice.

In ultimul timp o serie de produse naturale obţinute dintr-o serie de plante medicinale tradiţionale au fost tot mai mult cercetate şi investigate din punct de vedere chimic şi biologic pentru efectele lor de stimulare a unor funcţii ale organismului.

Polifenolii constituie un grup larg de produşi naturali de o mare diversitate structurală. Printre polifenoli, flavonoidele sunt o grupă despre care se ştie că au implicaţii multiple: efect antiaterosclerotic [3], antiinflamator [4], antiproliferativ [5] şi antioxidant datorită potenţialului redox scăzut şi a capacităţii de a ceda electroni şi atomi de hidrogen [6].

Rutinul este un polifenol natural care prezintă importante proprietăţi farmaceutice: antioxidant, antitrombotic dar şi un remediu împotriva alergiilor [7]. Quercetina a înregistrat proprietăţi de protecţie împotriva peroxidării lipidice în fosfolipidele bistratificate datorită proprietăţilor sale antioxidante [8]. Hesperetina exercită activităţi antialergice [11,12], antiinflamatorii [13,14], anticancerigene [15] şi antiaterogene [9,10].

Crisin a devenit un candidat pentru sănătate, datorită bioactivităţii sale multiple cum ar fi: activităţiile antioxidante [16], antialergice [17], antiinflamatoare [18], anxiolitice [19] şi antihipertensive [20]. Silimarina s-a demonstrat a avea aplicaţii clinice în tratamentul hepatitei toxice, ficatului gras, cirozei, leziunilor ischemice, toxicităţii de la radiaţii şi hepatitei virale, prin efectele sale antioxidative, antiperoxidative asupra lipidelor, antifibrotrice, antiinflamatoare, imunomodulatoare şi de regenerare hepatică [21].

În acest context lucrarea şi-a propus selectarea unor extracte vegetale cu conţinut bogat în compuşi flavonoidici, obţinute din plante pentru performanţele observate în prevenţia şi terapia unor patologii, investigarea potenţialului citoprotector şi a interferenţelor cu medicamentele convenţionale, în vederea elucidării unor mecanisme farmacodinamice de protecţie celulară şi a implicării produselor fitoterapice în aceaste mecanisme.

O preocupare majoră cercetărilor toxicologice pe plan internaţional este găsirea unor soluţii de prevenire sau eliminare a efectelor adverse ale unor medicamente de sinteză, de identificare şi evaluare a unor noi mijloace de protecţie a ţintelor agresiunii toxice la nivel hepatic.

Scopul cercetărilor efectuate a fost de a evalua efectele protectoare ale Crisinei împotriva leziuni acute induse de CCl_4 şi Mitoxantronă şi un posibil mecanism de acţiune protectoare dar şi evaluarea şi compararea efectelor protectoare a unui grup de antioxidanţi împotriva CCl_4 – citotoxicitate indusă în celulele Huh-7.

Consider că aprofundarea bazei ştiinţifice şi elucidarea mecanismelor de acţiune a acestor preparate la nivelul ficatului, precum şi aspecte legate de posibila aplicare a lor în terapeutică ca adjuvante, pot fi de o reală utilitate în practica medicală.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII

Partea generală a tezei este structurată în cinci capitole care prezintă date de actualitate din literatură referitoare la tema studiată. Primul capitol intitulat ’’ Rolul central al ficatului în metabolismul xenobioticelor’’ prezintă noţiunile teoretice de anatomie şi cele

de fiziologie şi sublinează importanţa cunoaşteri acestora în vederea întelegerii dezvoltării fiziologice a ficatului şi pentru a sesiza eventualele transformări fiziologice.

Capitolul al doilea descrie principalele tipuri de xenobiotice, care în contact direct sau indirect cu organismele vii, pot să inducă alterări de diferite intensităţi ale structurilor şi echilibrului funcţional, deci practic perturbă homeostazia organismului putând genera stări patologice.

Capitolul intitulat ''Bioactivarea xenobioticelor în metaboliţi reactivi'' descrie reacţiile de biotransformare a xenobioticelor şi peroxidazele. Tot în acest capitol, mai sunt descrise şi aspectele importante referitoare la citocromii P450. În următorul capitol intitulat ''Modificări histopatologice şi funcţionale la nivel hepatic determinate de metabolizarea xenobioticelor'' sunt prezentate principalele leziuni hepatice precum şi diagnosticul lor cu ajutorul unor biomarkeri de laborator.

Ultimul capitol, ''Extracte şi principii bioactive de origine vegetală cu efect hepatoprotector'' prezintă succint date definitorii pentru extractele şi principiile bioactive de origine vegetală importante în această cercetare şi anume importanţa lor în hepatoprotecţie.

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea specială a tezei de doctorat cuprinde prezentarea materialului de lucru și a metodelor utilizate în cercetare precum și descrierea pe larg a celor trei studii realizate în vederea atingerii obiectivelor propuse.

2.1. Motivația

Hepatoprotecția este un subiect de interes mondial, deoarece afecțiunile hepatice sunt frecvent întâlnite, iar nevoia transplanturilor de ficat este în creștere în ultimii ani, reducând drastic numărul celor care pot îndeplini cerințele unui transplant de ficat.

O serie de medicamente au fost indentificate ca factori de leziune hepatică, motiv pentru care majoritatea dintre ele au fost retrase de pe piață. Leziunile hepatice cauzate de medicamente reprezintă 5% din motivelele de spitalizare și 50% dintre insuficiențele hepatice, iar vârsta, etnia, sexul, starea nutrițională, pre-existența unor boli hepatice, funcția renală defectuoasă, sarcina, durata îndelungată și dozajul toxic al medicamentului, precum și reacțiile cu anumite enzime ori cu alte medicamente sunt factori care contribuie la accentuarea acestor leziuni.

În ultimul timp au apărut o serie de produse naturale obținute din plante medicinale, cu efecte benefice diverse, care pot înlocui efectele brutale ale medicamentelor.

Flavonoizi ai căror efect hepatoprotector am ales să-l studiez sunt: Crisina, Quercetina, Hesperetina, Rutina și Silimarina. Flavonoidele sunt o grupă despre care se arată că au implicații multiple și complexe: acțiune antioxidantă, antiinflamatoare, capacitate de curațare a radicalilor liberi, de prevenire a bolilor coronariene și acțiune anticancerigenă.

Prin această teză doresc să evidențiez posibilele efecte benefice aduse ficatului de către aceste flavonoide.

2.2. Obiective

Cercetările experimentale prezentate în această teză de doctorat au constat în urmărirea efectelor induse de administrarea produselor vegetale, asupra structuri și funcției ficatului la șoareci CD-1, în trei condiții experimentale:

- evaluarea și compararea efectelor protectoare a unui grup de antioxidanți (Rutin, Hesperetin și Quercetin) împotriva CCl_4 - citotoxicitate indusă de celulele Huh-7 (linie celulară de tumoare hepatică umană). Formele formulate ale antioxidanților au fost proiectate pentru a crește solubilitatea și biodisponibilitatea extractelor neformulate. Ambele ciclodextrine α și β au fost folosite, iar proprietățile lor de creștere a efectelor antioxidante au fost de asemenea evaluate;
- urmărirea efectelor protectoare ale Crisinei împotriva leziunii acute induse de tetraclorura de carbon (CCl_4) și un posibil mecanism de acțiune protectoare. In plus, interacțiunea dintre Crisină și citokina proinflamatorie TNF-α a fost evaluată prin procedeul de modulare moleculară computațională;
- urmărirea efectelor protectoare ale Crisinei asupra structuri și funcțiilor ficatului la șoareci CD-1 împotriva leziuni induse de administrarea de Mitoxantronă și un posibil mecanism de acțiune.

2.3. Metodologie generală

Studiile pe care m-am concentrat în analiza efectelor acestor produse vegetale la nivelul ficatului șoarecilor CD-1 au fost de tip biochimic, pentru a evalua starea generală a ficatului, structurală și ultrastructurală, pentru a evalua eventualele modificări induse de aceste extracte vegetale. In studiul in Vitro, am analizat capacitatea citostatică și antitumorală a celor trei antioxidanți (Rutin, Hesperetin și Quercetin), urmărind parametri de viabilitate și analizând efectele morfologice induse de cei trei antioxidanți.

Studiile experimentale efectuate şi prezentate în capitolele următoare ale tezei, au fost realizate pentru descifrarea efectelor induse de acţiunea următoarelor flavonoide: Crisin, Rutin, Hesperetin, Quercetin şi a Silimarinei; precum şi asupra structurii şi funcţiilor ficatului, atât în condiţii normale, cât şi după administrarea de Mitoxantronă sau CCl_4.

Analizele statistice au fost efectuate prin intermediul unor grupe de tratament variate folosind testul t-Student. Diferenţele s-au considerat semnificative când $p<0.05$. De asemenea s-a folosit analiza unidirecţională a variaţiei (ANOVA) cu software-ul Stata 13 (StataCorp LP, Texas, USA). O valoare de $p<0.05$ a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic.

S-au folosit şoareci CD1 care au fost crescuţi în regim şi condiţii standard în Biobaza Universităţii de Vest "Vasile Godiş" din Arad. Protocoalele experimentale au fost aprobate de către Comisia de Etică a Cercetării ştiinţifice din Universitatea de Vest "Vasile Godiş" din Arad.

III.CERCETĂRI *IN VIVO* PRIVIND ACŢIUNEA HEPATOPROTECTOARE A FLAVONOIZILOR ÎMPOTRIVA TOXICITĂŢII INDUSE DE TETRACLORURA DE CARBON (CCl_4)

3.1. Ipoteză / scop / obiective

Acest studiu a fost efectuat în vederea evaluării şi comparării efectelor protectoare a unui grup de antioxidanţi împotriva CCl_4 - citotoxicitate indusă în celulele Huh-7. Formele formulate ale antioxidanţilor au fost proiectate pentru a creşte solubilitatea şi biodisponibilitatea extractelor neformulate. Ambele ciclodextrine α şi β (α-CD şi β-CD) au fost folosite, iar proprietăţile lor de creştere a efectelor antioxidante au fost de asemenea evaluate.

3.2. Materiale şi metode

3.2.1. Cultura celulară

Pentru acest studiu s-a folosit linia celulară Huh-7 (ATTCC-USA). Linia celulară de tumoră hepatică umană, Huh-7 prezintă asemănări metabolice cu celulele hepatice normale şi este mai stabilă în comparaţie cu celulele hepatice umane primare [315].

3.2.2. Tratament celular

Au fost testate trei tipuri de flavonoizi: rutina (R), hesperetina (H) şi quercetina (Q), pentru efectul proliferativ asupra liniei celulare Huh-7. S-au folosit atât extracte neformulate şi formulate nano-încapsulate. Extractele formulate au fost preparate în α - CD şi β - CD.

3.2.3. Testul de toxicitate MTT

Celulele au fost însămânţate în plăci cu 96 de godeuri, iar după 24 de ore de la însămânţare au fost tratate pentru 48 de ore atât cu extracte de flavonoide neformulate cât şi cu extracte de flavonoide nano - încapsulate în ciclodextrină α şi β. Viabilitatea celulară a fost evaluată printestul MTT după 48 de ore.

3.2.4. Analize statistice

Analizele statistice au fost efectuate prin intermediul unor grupe de tratament variate folosind testul t - Student. Diferenţele s-au considerat semnificative când $p<0.05$. Informaţiile sunt prezentate ca medie ± SD pentru triplicat, valori P statistic semnificative $^{**}p\leq0.001$; $^{**}p\leq0.0001$ împotriva valorii standard normale, $p\leq0.05$ împotriva CCl_4.

3.3. Rezultate

Viabilitatea celulară şi efectul protector al extractelor de flavonide (rutina, hesperetina şi quercentina) au fost evaluate pe baza testului MTT.

Portocolul experimental a cercetat avantajul protector împotriva citotoxicităţii induse de CCl_4 a unui extract de flavonoid α-CD şi β-CD nano-încapsulat în comparaţie cu extractele neformulate. Celulele Huh-7 netratate au fost folosite pe post de valoare standard (Fig. 5).

Celulele Huh-7 au fost incubate cu doze echivalente de 5, 7.5 şi 10 μg/ml de extracte formulate şi neformulate, pentru 48 de ore. După 48 de ore de tratament cu flavonoidul rutin (Fig. 6-8) s-a constatat o citotoxicitate semnificativ dependentă de doză pentru extractele neformulate şi formulate cu α-CD. Forma nano-încapsulată cu β-CD nu a arătat nici o citotoxicitate şi a înregistrat o viabilitate uşor crescută pentru concentraţia 7,5 μg/ml în comparaţie cu valorile standard. Referitor la efectul de protecţie împotriva citotoxicităţii induse de CCl_4, toate extractele de rutină au demonstrat o protecţie redusă a liniei celulare Huh-7 împotriva citotoxicităţii cu CCl_4 (Fig. 5).

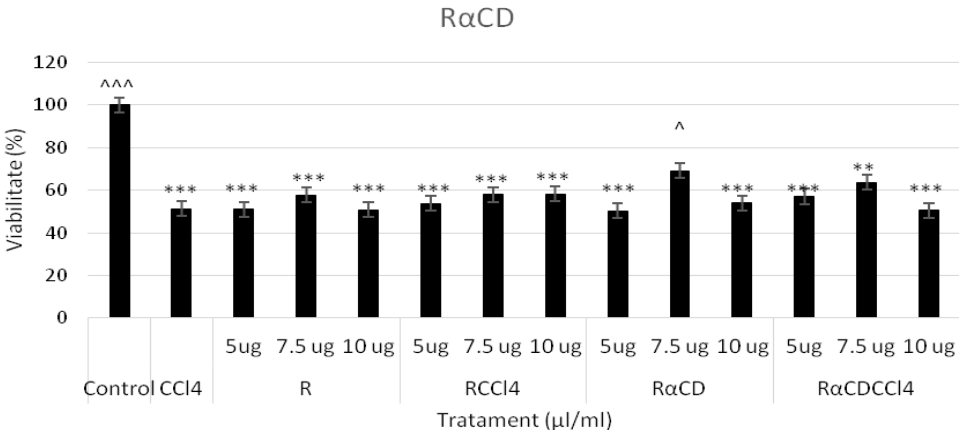


Figura.1. Viabilitatea celulară a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu rutină neformulată şi nano-încapsulată în alpha-ciclodextrină.

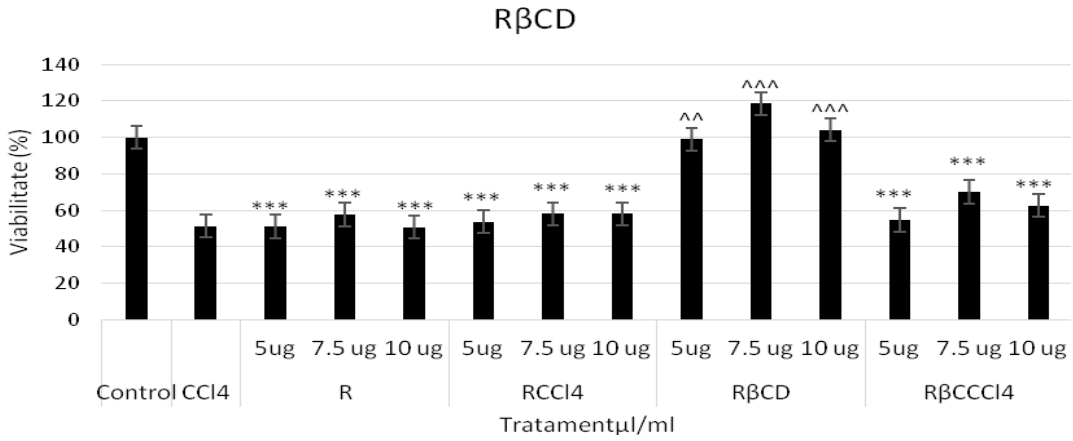


Figura.2. Viabilitatea celulară a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu rutină neformulată şi nano-încapsulată în beta-ciclodextrină.

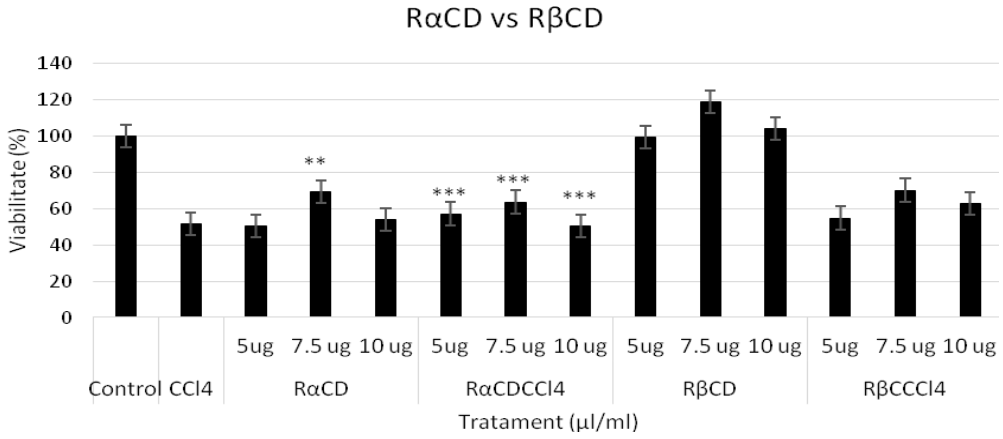


Figura. 3. Prezentarea comparativă a viabilităţii celulare a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu rutină neformulată şi nano-încapsulată în beta-ciclodextrină, respectiv alpha-ciclodextrină.

În cazul extractului de Hesperetină, după 48 de ore de tratament (Fig. 9-11), citotoxicitatea dependentă de doză a fost semnificativ mai mică pentru ambele extracte neformulate şi formulate cu α-CD şi β-CD. Efectul de protecţie faţă de CCl_4 a fost semnificativ mai crescut în comparaţie cu extractul de rutin. Extractele neformulate au prezentat o protecţie semnificativ crescută faţă de citotoxicitatea CCl_4 la o concentraţie de 7,5 μg/ml. Extractele formulate cu β-CD au fost mai protectoare şi mai puţin citotoxice în comparaţie cu valorile standard netratate.

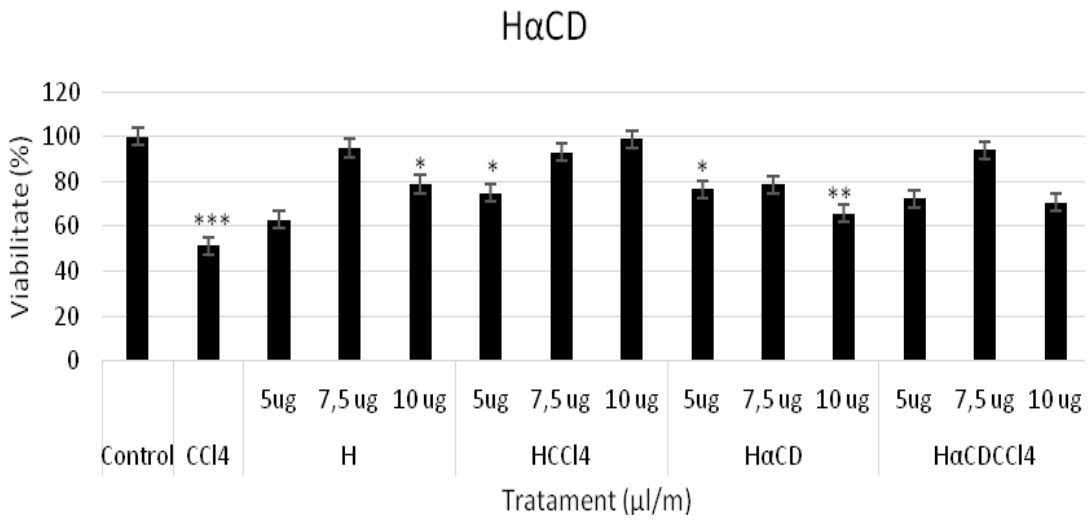


Figura.4. Viabilitatea celulară a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu hesperetină neformulată şi nano-încapsulată în alpha-ciclodextrină.

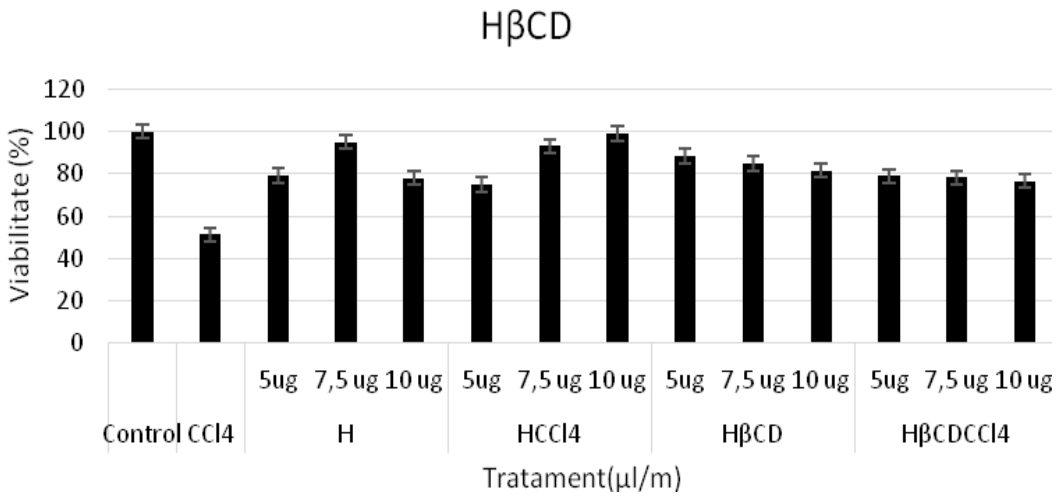


Figura.5. Viabilitatea celulară a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu hesperetină neformulată şi nano-încapsulată în beta-ciclodextrină.

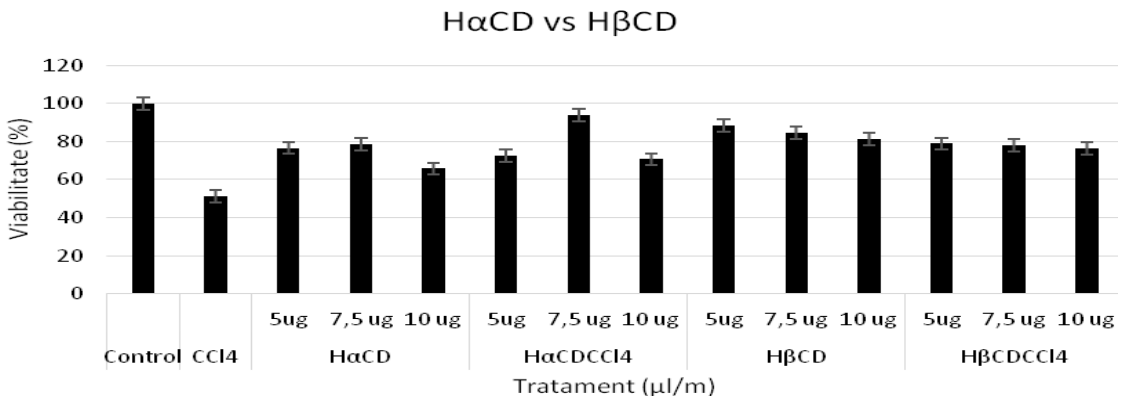


Figura.6. Prezentarea comparativă a viabilităţii celulare a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu hesperetină neformulată şi nano-încapsulată în beta-ciclodextrină, respectiv alpha-ciclodextrină.

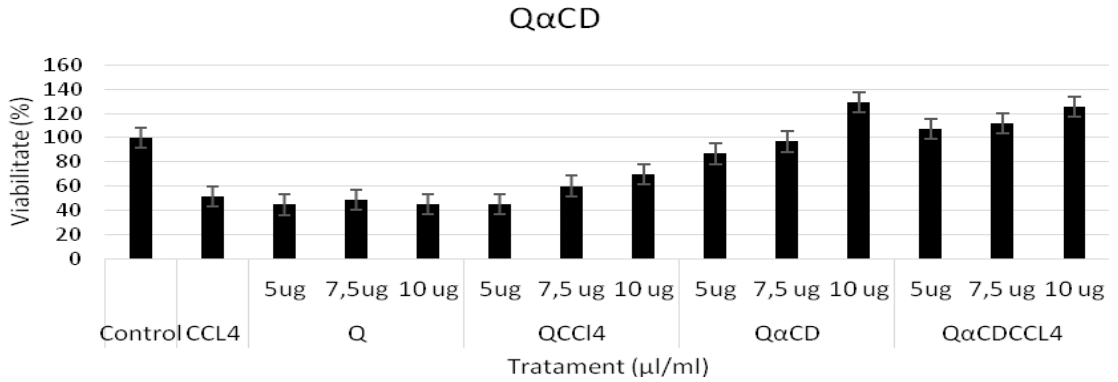


Figura.7. Viabilitatea celulară a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu quercetină neformulată şi nano-încapsulată în alpha-ciclodextrină.

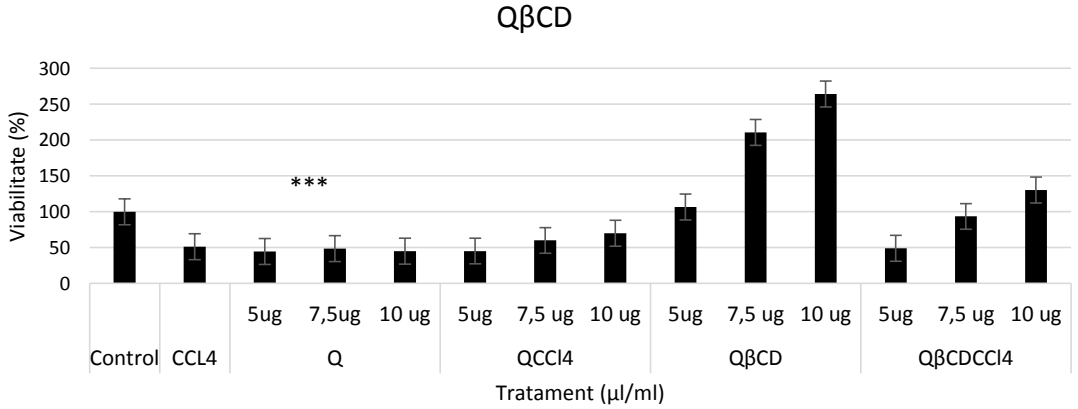


Figura.8. Viabilitatea celulară a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu quercetină neformulată şi nano-încapsulată în beta-ciclodextrină.

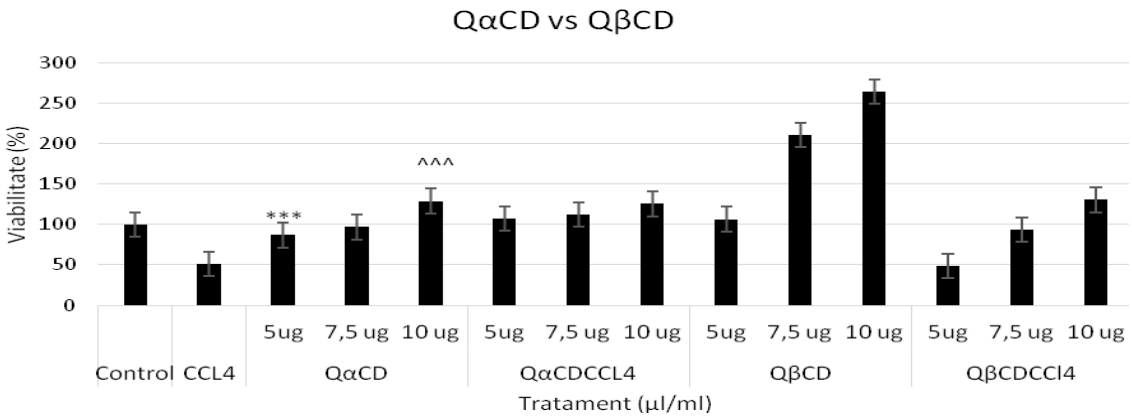


Figura.9. Prezentarea comparativă a viabilităţii celulare a celulelor Huh-7 la 48 de ore de tratament cu quercetină neformulată şi nano-încapsulată în beta-ciclodextrină, respectiv alpha-ciclodextrină.

Flavonoidul quercetină a demonstrat o citotoxicitate semnificativ dependentă de doză pentru extractul neformulat, după 48 de ore de tratament, dar extractul formulat s-a dovedit a fi mai puţin citotoxic şi a asigurat o protecţie crescută împotriva citotoxicităţii cu CCl_4. Forma nano-încapsulată cu β-CD nu a arătat nici o toxicitate şi a înregistrat valori crescute de rezistenţă pentru concentraţiile de 7,5 µg/ml şi de 10 µg/ml în comparaţie cu valorile standard.

3.4. Discuţii

Rezultatul prezentului studiu a demonstrat faptul că expunerea liniei celulare Huh-7 la CCl_4 a avut ca rezultat o proliferare celulară scăzută. Quercetina a demonstrat cel mai sporit efect de protecţie împotriva CCl_4, urmat de hesperetină. Incapsularea cu β-ciclodextrină s-a dovedit a fi superioară formei formulate de α-ciclodestrină. Rezultatele noastre sunt în concordanţă cu celelalte studii din literatura de specialitate, şi indică faptul că încapsularea ciclodextrinelor asigură o solubilitate şi o biodisponibilitate sporită, astfel încât extractul de flavonoid să-şi manifeste acţiunea antioxidantă. Extractele formulate şi neformulate de rutină au demonstrat efecte protectoare mult mai reduse în comparaţie cu celelalte două flavonoide studiate. Formele formulate au arătat de asemenea o proliferare scazută în comparaţie cu valorile standard, care indică o biodisponibilitate redusă a flavonoidului rutin în forma sa formulată.

3.5. Concluzii

Quercetina în extractele formulate determină o mai bună ameliorare a stresului oxidativ, are un efect citoprotector şi îmbunătăţeşte modificările induse de CCl_4 în

comparaţie cu ceilalţi flavonoizi studiaţi, în extracte formulate şi neformulate. Extractul formulat bazat pe încapsulare cu β-ciclodextrină s-a dovedit a fi superior formei formulate în α-ciclodextrină.

IV. CERCETĂRI *IN VIVO* PRIVIND ACŢIUNEA HEPATOPROTECTOARE A CRISINEI ÎMPOTRIVA ACŢIUNII TOXICE ACUTE INDUSĂ DE TERTRACLORURA DE CARBON (CCl_4)

4.1. Ipoteză / scop / obiective

Rapoartele anterioare au arătat faptul că inflamarea este iniţiată de eliberarea unor mediatori proinflamatori, inclusiv TNF-α, COX-2 şi IL-6 în condiţiile de stres oxidativ indus despeciile reactive de oxigen (ROS) în urma administrării de CCl_4, în paralel cu dezvoltarea unor procese apoptozice [326,327]. În primele faze ale leziunii hepatice toxice, s-a demonstrat o eliberare crescută a citokinei proinflamatorii TNF-α [328].

În acest experiment am cercetat efectele protectoare ale crisinei împotriva alterărilor acute induse de CCl_4 precum şi un posibil mecanism de acţiune al acestui flavonoid. În plus, interacţiunea dintre crisină şi citokina proinflamatorie TNF-α a fost evaluată prin modulare moleculară computaţională.

4.2. Materiale şi metode

4.2.1. Substanţe chimice

Crisina 97%, silimarina 98% şi carboximetilceluloza au fost procurate de la Sigma-Aldrich (Germania). Anticorpii anti TNF-α şi α-SMA au fost furnizaţi de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Kitul Novocasta pentru imunohistochimie a fost cumpărat de la Leica Microsystems (Germania).

4.2.2. Animale şi Protocol Experimental

S-au folosit şoareci masculi CD-1 (20 ± 3 g), furnizaţi de către Biobaza de animale a Universităţii de Vest Vasile Goldiş din Arad. Animalele au fost ţinute într-un ciclu de 12 ore lumină / întuneric, cu hrană *ad libitum*.

Patruzeci de animale au fost folosite în acest experiment care au fost împărţite în 5 grupe (grupul de control, grupul CCl_4, grupul de pre-tratament cu CHR, grupul de pre-tratament cu SI şi grupul CHR).

4.2.3. Activitatea markerilor hepatici serici

Determinarea nivelului de Aspartat aminotransferază (AST - Transaminaza glutamoxalică - TGO) și aminotransferaza alanină (ALT) serice au fost evaluate prin metoda spectofotometrică folosindu-se kituri comerciale (Roche Reagents, Franța) în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

4.2.4. Examen histopatologic

Secțiuni histologice de ficat cu o grosime de 5 μm au fost deparafinate și procesate conform protocolului de colorare cu Hematoxilină - eozină (H&E). Gradul de alterare hepatică indus de CCL_4 a fost evaluat prin observarea schimbărilor morfologice tisulare. Secțiuni înghețate au fost tăiate la 8 μm folosind un criostat SLEE MNT, fixat în formaldehidă tamponată 10% și colorat cu kitul Oil Red O în conformitate cu protocolul furnizat de Bio-Optica. Lamele montate au fost examinate la un microscop optic (Microscop Olympus BX43) și fotografiate utilizând o cameră digitală Olympus XC30.

4.2.5. Teste de imunohistochimie

Studiile imunohistochimice au fost realizate pe secțiuni de țesut hepatic cu o grosime de 4 μm.

Activitatea endogenă peroxidazică a fost blocată prin incubare în peroxid de hidrogen 1% în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). Pentru detecția anticorpilor a fost folosit kitul de colorare Santa Cruz ABC Peroxidase / DAB Staining kit (sc-2017), conform indicațiilor producătorului.

După neutralizarea peroxidazei endogene, secțiunile au fost incubate cu soluție de blocare și incubate pe timpul nopții la 4°C cu anticorpi anti - TNF-α sau α - SMA (diluție 1:100). Detectarea s-a efectuat folosindu-se un polimer (Sistem detectare Novolink max Polymer, Novocastra Leica Biosystems) și DAB (3,3'- Diaminobenzidina, Novocastra Leica Biosystems) ca substrat cromogenic. Țesuturile au fost contra-colorate cu hematoxilină, deshidratate într-un gradient de alcool și montate. Imaginile au fost obținute prin examinare înmicroscopie optică (Olympus BX43, Hamburg, Germania). Intensitatea imuno-pozitivității TNF - α și a α - SMA au fost analizate cu ajutorul software-ului Image J64 (NIH, Bethesda, Maryland, USA). Cinci porțiuni au fost alese la întâmplare din fiecare secțiune de ficat. Aceste valori sunt prezentate prin procentaj maro de câmpuri pozitive în comparație cu valoarea de referință , care este setată la 100%.

4.2.6. Microscopie electronică

Specimene de ficat pentru microscopul electronic au fost pre - fixate într-o soluție pe bază de glutaraldehidă 0.1 cu tampon de fosfat M timp de 1,5 ore, la 4°C. După aceea, au fost spălate cu tampon de fosfat M 0.15 (Ph 7.2) și post fixate în soluție de acid osmic 2% în tampon de fosfat M 0.15 timp de o ora la 4°C. Deshidratarea s-a realizat în acetonă, și includerea făcută în rășină epoxidică încorporată Epon 812. Blocurile au fost secționate la o grosime de 70 nm cu ultramicrotomul Leica EM UC7, contrastat de două ori cu acetat de uranil și soluție de acetat de plumb și în final analizatelaun microscop electronic TEM Tecnai 12 Biotwin.

4.2.7. Studiu de modelare moleculară

În acest studiu am luat în considerare domeniul catalitic al proteinei, care a fost disponibil în Banca de Date a Proteinei (BDP). Structura cristalină a TACE în complex cu un inhibitor, Ik682 (ID BDP: 2FV5) [344] s-a luat în considerare pentru studiul de andocare. Inhibitorul de legătură a fost considerat ca un ligand de referință, iar aria de acțiune a receptorului a fost definită prin alegerea reziduurilor din tăieturi de 10 Å în jurul ligandului de referință. Structura 3-D a crisinei a fost construită folosindu-se interfața de construcție moleculară HYPERCHEM 8.0 [345] și optimizată folosind câmpul de forță la o rădăcină medie pătrată PM3 (RMS) gradient de 0.01 kcal/Å mol Polak - Ribiere conjugat cu gradient algoritm și importat în format mol2.

Crisina a fost andocată în aria de acțiune a TACE folosindu-se FlexX [346]. Programul folosește o procedură de defragmentare care rupe ligandul în fragmente, plasează fragmentul ancoră în aria de legătură și apoi construiește întregul ligand. Un total de 377 soluții de andocare posibile au fost generate și toate soluțiile au fost clasificate folosindu-se o funcție de punctare care estimează energia liberă de legare (ΔG) a complexului proteină-ligand. Pregătirea receptorului, a ligandului și toate interacțiunile post-andocare au fost analizate folosindu-se vizualizatorul molecular LeadIT [374].

4.2.8. Analiză statistică

Pentru analiza statistică s-a folosit analiza unidirecțională a variației (ANOVA) cu software-ul Stata 13 (StataCorp LP, Texas, USA). O valoare de $p<0.05$ a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic.

4.3. Rezultate

4.3.1. Activitatea transaminazelor serice ALT şi AST

În figura 10 şi 11 sunt prezentate efectele administrării crisinei timp de 7 zile asupra activităţii markerilor ALT şi AST serici la şoareci din diferite grupe de tratament. După 24 de ore de la administrarea CCl_4, activitatea markerilor AST şi ALT serici a crescut semnificativ în comparaţie cu grupul de referinţă ($p<0.001$). Pre-tratamentul cu crisină a redus semnificativ creşterea nivelului de aminotransferază serică, asemănător cu pre-tratamentul din grupul cu silimarină ($p<0.001$ în comparaţie cu grupul toxic). Grupul tratat doar cu crisină nu a prezentat nici o creştere a activităţii markerilor ALT şi AST în comparaţie cu grupul toxic.

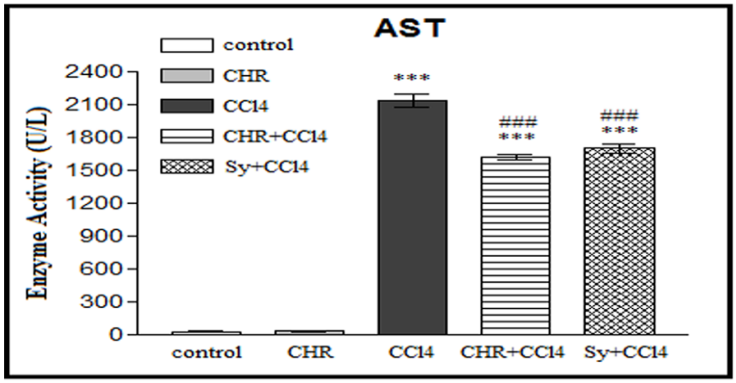


Figura. 10. Efectul protector al dozei de 50 mg/kg crisină asupra nivelului de AST seric. Valorile sunt exprimate ca medie (±SD)(n=8). *** Semnificaţia statistică la $p<0.001$ comparativ cu valoarea de referinţă. ### Semnificaţia statistică la $p<0.001$ comparativ cu grupul tratat cu CCl_4. După administrarea de CCl_4 s-a constatat o creştere semnificativă a markerului enzimatic AST iar pre-tratamentul cu crisină şi silimarină a redus semnificativ creşterea markerului AST.

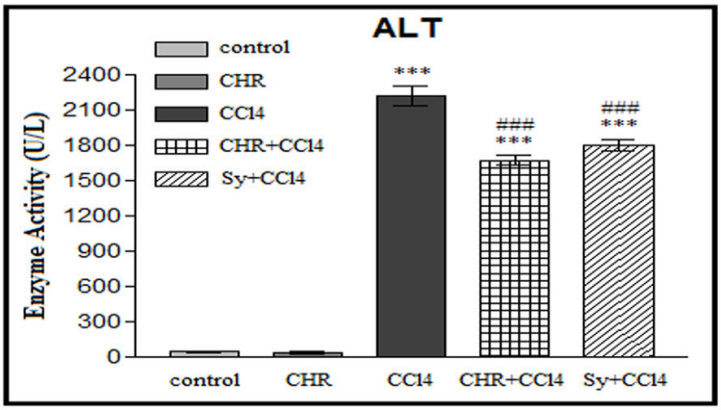


Figura. 11. Efectul protector al dozei de 50 mg/kg de greutate corporală a crisinei în activitatea markerului ALT seric. Valorile sunt exprimate ca medie (±SD)(n=8). *** Semnificaţia statistică la $p<0.001$ comparativ cu valoarea de referinţă. ### Semnificaţia statistică la $p<0.001$ comparativ cu grupul tratat cu CCl_4. După administrarea de CCl_4 s-a constatat o creştere semnificativă a markerului ALT iar pre-tratamentul cu crisină şi silimarină a redus semnificativ creşterea markerului ALT.

4.3.2. Analiza histopatologică

Din analiza a 5 imagini histologice per lot, s-a realizat o cuantificare a ariei necrozate pentru fiecare din variantele experimentale, care a crescut semnificativ statistic pentru grupul intoxicat cu CCl_4 ($p<0.001$) şi s-a redus semnificativ în cazul pretratamentului cu crisină, respectiv silimarină comparativ cu grupul toxic (Fig. 12)

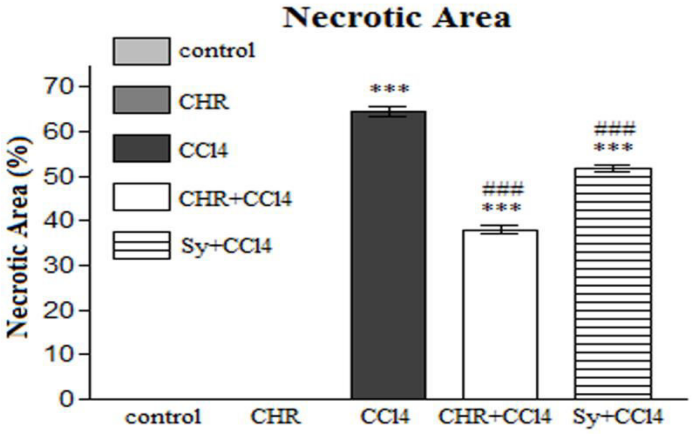


Figura.12. Procentul arei necrozate în ficatul grupurilor experimentale (medie ±SD, N=5). ***Semnificaţia statistică la *p*<0.001 comparativ cu martorul. ### Semnificaţia statistică la *p*<0.001 comparativ cu grupul tratat cu CCl_4.; coloraţie HE; Scară 50 µm.

Din analiza a 5 imagini histologice per lot, s-a realizat o cuantificare a cantităţii de lipide pentru fiecare din variantele experimentale. Am constatat o creştere semnificativ statistică pentru grupul intoxicat cu CCl_4 ($p<0.001$) şi s-a redus semnificativ în cazul pre-tratamentului cu crisină, respectiv silimarină comparativ cu grupul toxic (Fig. 13).

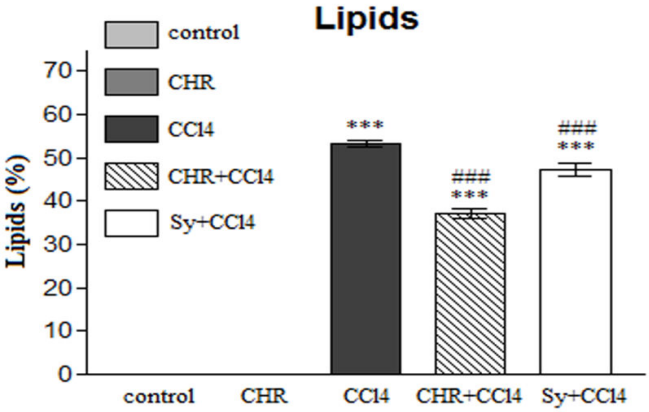


Figura. 13. Procentul de lipide din ficat (medie ± S.D., N = 5). *** Semnificaţia statistică la *p*<0.001 comparativ cu valoarea de referinţă. ### Semnificaţia statistică la *p*<0.001 comparativ cu grupul tratat cu CCl_4.

4.3.3. Analiza imunohistochimică a markerilor de inflamaţie

Analiza cu software ImageJ a imaginilor de IHC, a relevat faptul că expresia TNF-α este seminificativ statistic crescută comparativ cu martorul (p<0.001). Tratamentul preventiv cu ambii flavonoizi a determinat o scădere semnificativă comparativ cu grupul de control (fig. 14).

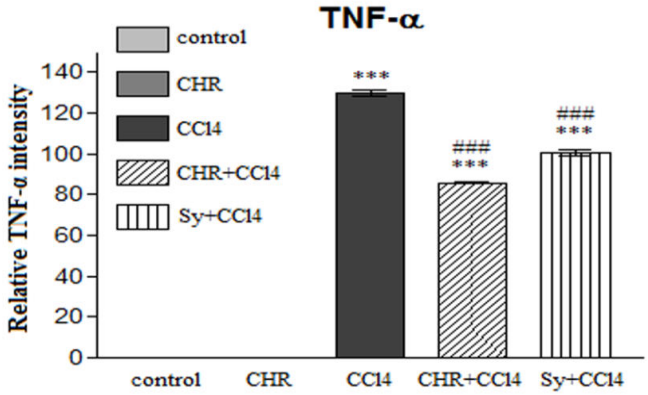


Figura. 14. Determinarea cantitativă a citokinei proinflamatorii TNF-α (medie ± S.D., N = 5). *** Semnificaţia statistică la *p*<0.001 comparativ cu valoarea de referinţă. ### Semnificaţia statistică la *p*<0.001 comparativ cu grupul tratat cu CCl_4. Se observă că tratamentul preventiv cu crisină a prevenit creşterea TNF-α datorată administrării de CCl_4.

La 24 de ore după administrea CCl_4 se constată o expresie semnificativ crescută a α-SMA comparativ cu martorul (fig. 15). Tratamentul preventiv cu crisină, respectiv silimarină a determinat o reducere semnificativ statistică a α-SMA comparativ cu grupul toxic (p<0.001).

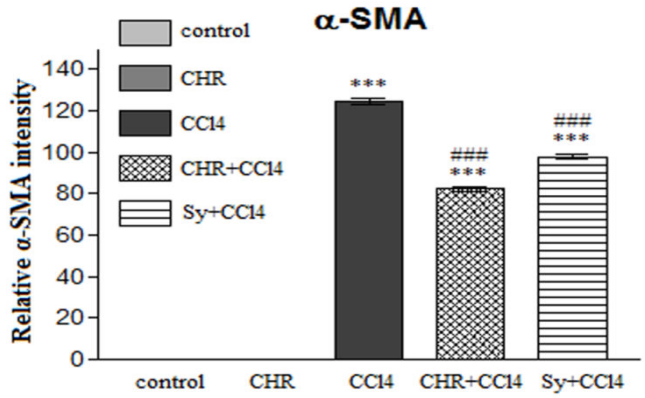


Figura.15. Efectul crisinei asupra expresiei IHC şi distribuţiei specifice a α-SMA în parenchimul hepatic (medie ± S.D., N = 5). *** Semnificaţia statistică la *p*<0.001 comparativ cu valoarea de referinţă. ### Semnificaţia statistică la *p*<0.001 comparativ cu grupul tratat cu CCl_4.

4.3.4. Microscopie electronică

Ultrastructura hepatocitelor a fost normală în grupul de control. Astfel, aspectul nucleilor este normal, profilele de reticul endoplasmatic rugos (rER) sunt regulare și apar doar câteva picături lipidice în citoplasmă (Fig. 16). Hepatocitele din grupul tratat cu CCl_4 au prezentat o acumulare masivă de picături lipidice, degenerarea organitelor și proliferarea veziculelor reticulului endoplasmatic neted (sER) (Fig. 16). Pre-tratamentul cu 50 mg/kg crisină a prevenit semnificativ creșterea în volum și număr a picăturilor lipidice în hepatocite (Fig. 17), asemănător cu grupul pre-tratat cu silimarină (Fig. 18).

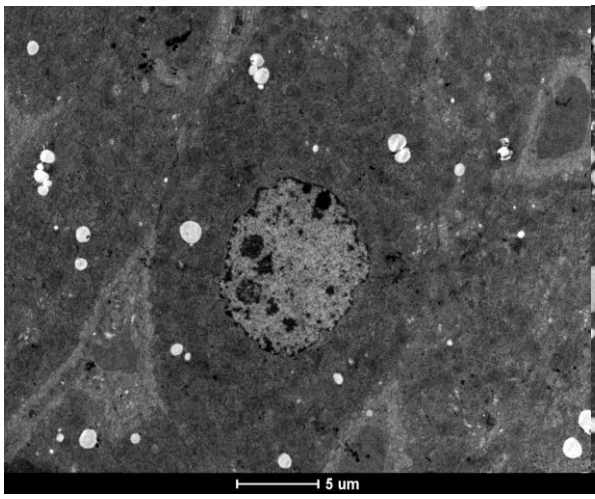


Figura.16. Aspectul ultrastructural al hepatocitelor grupului control

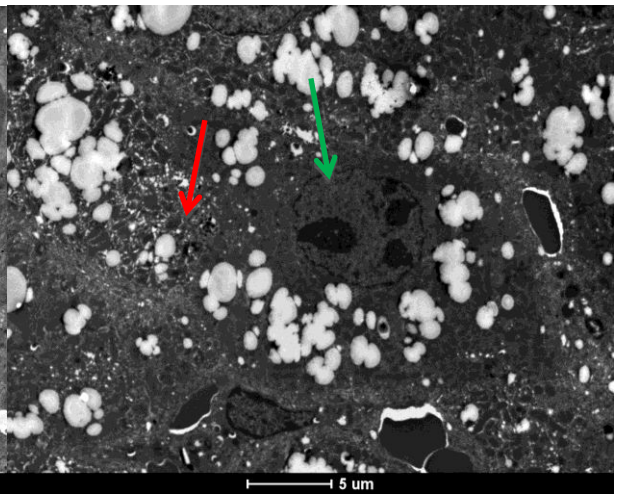


Figura.17. Aspectul ultrastructural al hepatocitelor grupului CCl_4; săgeată rosie – proliferare de lipide; săgeată verde – nucleu.

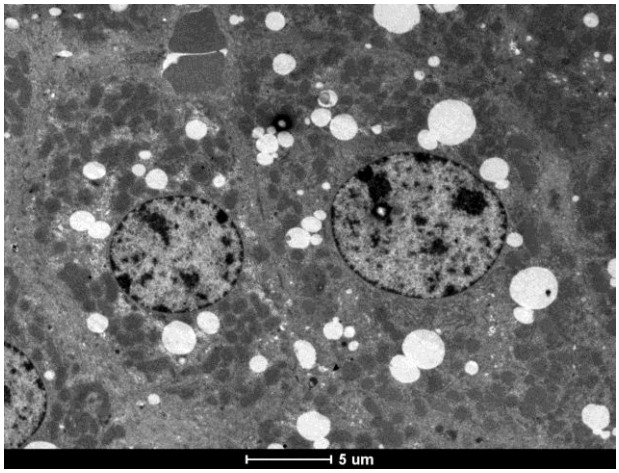


Figura.18. Aspectul ultrastructural al hepatocitelor grupului crisină + CCl_4.

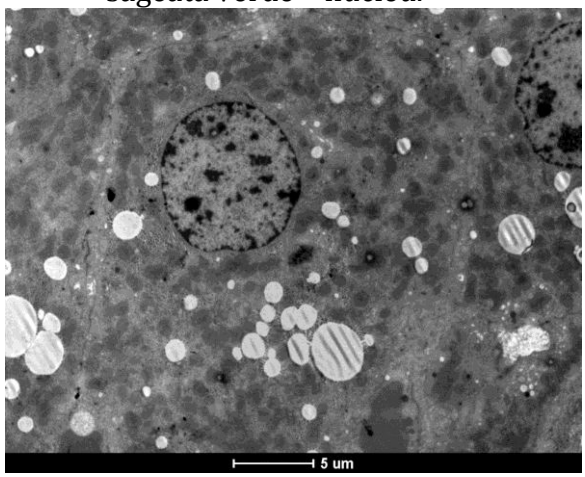


Figura.19. Aspectul ultrastructural al hepatocitelor grupului silimarină + CCl_4.

4.3.5. Studiu de modelare moleculară

Studiul experimental demonstrează clar faptul că acţiunea hepatoprotectoare a crisinei a fost mijlocită de TNF-α. Tratamentul preventiv cu crisină reduce semnificativ creşterea TNF-α datorată administrării de CCl_4. Prin urmare, crisina ar putea avea efectul modulator în procesarea TNF-α prin reducerea formei solubile de TNF-α. TNF-α este sintetizat ca un precursor ancorat în membrană, iar forma solubilă a TNF-α este eliberată în spaţiul extracelular prin proteoliza limitată de o endopeptidază cu zinc, cunoscută ca enzima separatoare TNF-α (TACE sau ADAM17) [347]. TACE este o peptidază multi-domeniu care conţine o regiune extracelulară, un helix transmembranar şi o coadă intracelulară terminală C.

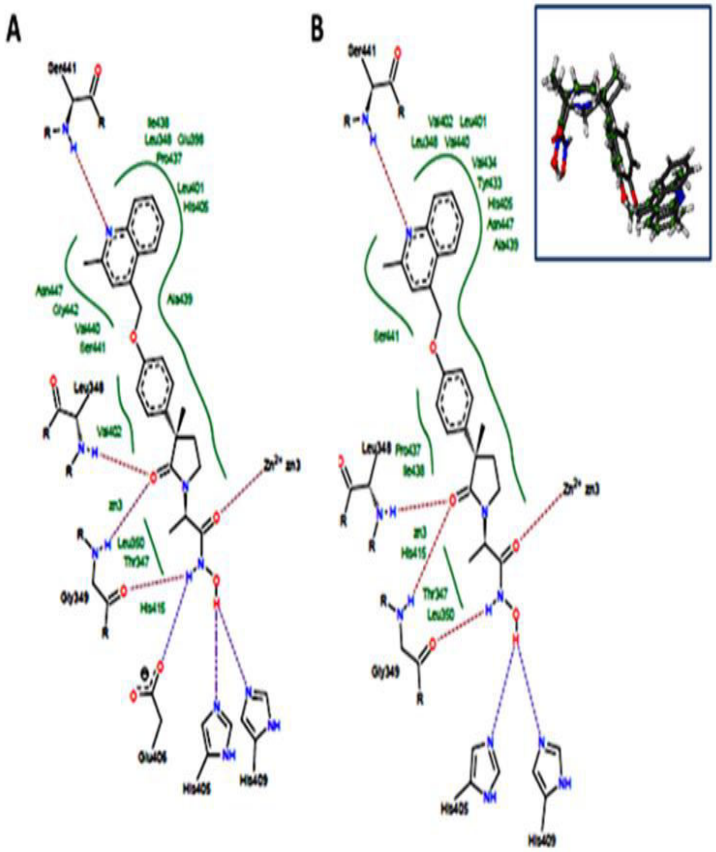


Fig. 20. Validarea protocolului de andocare folosindu-se evaluarea re-andocării unde inhibitorul de legătură IK682 a fost andocat înapoi la structura cristalină respectivă a TACE (Casectinei) (BDP ID: 2FV5). (A) Trăsături farmacofore ale interacţiunii TACE cu inhibitorul de legătură IK682 obţinute prin andocarea FlexX. **(B)** Interacţiunea farmacoforă a inhibitorului TACE conform observării din structura cristalină. Inserţie: Structură suprapusă a inhibitorului, IK682, obţinută din andocarea cu orientarea inhibitorului observată în structura cristalină (BDP ID: 2FV5).

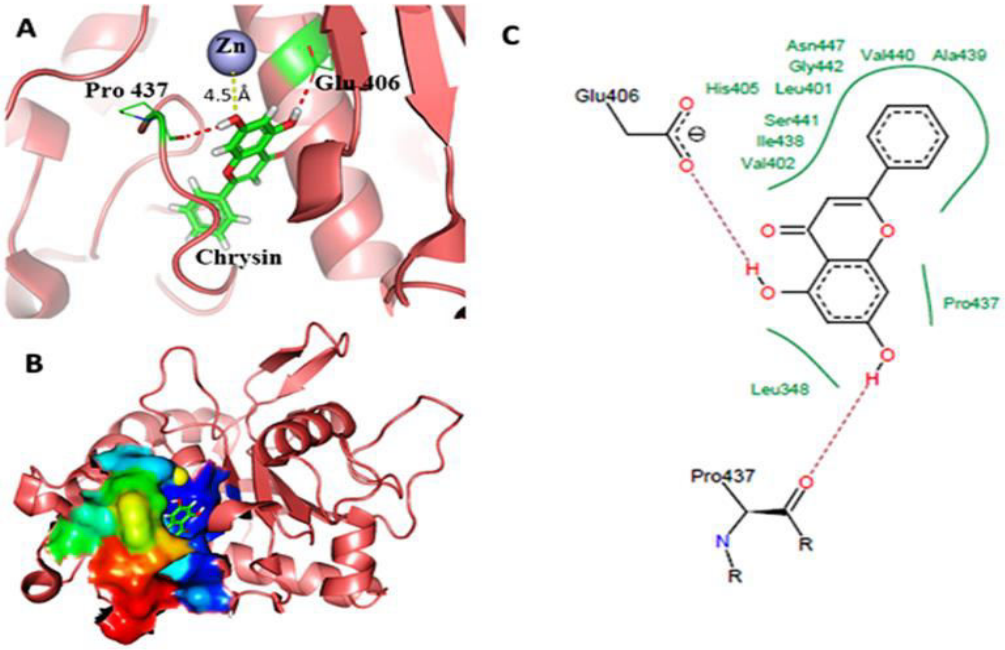


Fig. 21. Structura soluției de andocare cu cea mai scăzută energie a complexului TACE-crizol obținută prin andocarea moleculară. (A) Profilul de interacțiune al crisinei în cadrul zonei de legare a TACE. Crisina este redată prin bastonașe, pe când reziduurile legate de hidrogen sunt reprezentate prin linii. Ionul de Zinc este reprezentat cu albastru în mod CPK, iar proteina este redată printr-o fâșie. **(B)** Orientarea crisinei andocată cu zona activă a TACE. Cavitatea zonei active este reprezentată în mod de suprafață și colorat în conformitate cu factorul-B. Evoluția de la albastru la verde până la culoarea roșie semnifică o flexibilitate crescută a regiunii. **(C)** Interacțiunea farmacoforică esențială a inhibării TACE de către crisină.

4.4. Discuții

Este bine cunoscut faptul că CCl_4, un agent hepatotoxic, este metabolizat într-un radical triclorometil (CCl3-) care interacționează cu oxigenul pentru a forma radicali liberi mai toxici.

Prin urmare, leziunile hepatocitelor alterează permeabilitatea membranei lor, ducând la eliberarea enzimelor hepatice, ceea ce cauzează creșterea transaminazelor serice [324,349]. În studiul nostru am constatat o creștere semnificativă pentru ambele enzime serice din markerii de AST și ALT după administrarea de tetraclorură de carbon. Diminuarea markerilor AST și ALT serici prin administrarea dozei de crisină de 50 mg/kg la șoarecii intoxicați cu CCl_4, indică faptul că acest flavonoid păstrează integritatea structurală a membranei, ceea ce este în concordanță cu alte studii de specialitate [335].

În experimentul nostru, pre-tratamentul cu crisină a prevenit creșterea TNF-α datorat administrării de CCl_4. TNF-α este o citokină proinflamatorie produsă de celulele Kupffer, care apare la un nivel crescut atât în afecțiunile hepatice acute cât și în urma

expunerii la substanţe hepatotoxice, inclusiv leziunile induse de CCl_4 [351]. În acest studiu, modularea manifestării TNF-α de către crisină sugerează rolul său important în atenuarea cascadei inflamatorii induse de CCl_4 în ficat. De asemenea, Ai şi colab. [353] au arătat că flavonele suprimă puternic calea proinflamatorie a TNF-α, ceea ce este în concordanţă cu observaţiile noastre.

Rezultatele noastre au arătat faptul că structura organitelor citoplasmatice au fost protejate pe scară largă împotriva efectelor hepatotoxice ale CCl_4, inclusiv protejarea membranei. Studiul nostru demonstrează că leziunea membranei cauzează modificări ale lipoproteinelor membranare şi acumularea de picături de grăsimi în hepatocite [357]. Acumularea de lipide însoţită de dilatări ale canaliculelor reticlulului endoplasmatic rugos însoţite de alterarea membranelor rER, au fost probabil provocate de leziunile din structura membranei cauzate de peroxidarea lipidică [358]. Alte studii au demonstrat potenţialul protector al flavonelor împotriva peroxidării lipidice datorate acţiunii radicalilor liberi generaţi de biotransformarea xenobioticelor, pe baza masurătorilor hepatice ale malondialdehidei (MDA). Mai mult, crisina pare să posede o acţiune similară cu cea a silimarinei în aceeaşi doză împotriva leziunilor hepatice induse de CCl_4.

4.5. Concluzii

În concluzie, rezultatele noastre sugerează faptul că mecanismele de semnalizareale inflamaţiei au fost activate în patogeneza leziunilor hepatice acute induse de CCl_4 şi contracarate de tratamentul preventiv de şapte zile cu crisină. Rezultatele noastre au demonstrat că acţiunea hepatoprotectoare a crisinei este mijlocită de TNF-α, prin reducerea generaţiei solubile de TNF-α, datorată blocării proteinei de scindare pro-TNF-α (TACE). Crisina pare să fie un agent hepatoprotector puternic, aproape asemănător cu silimarina standard în aceeaşi doză, şi poate fi luată în considerare ca un potenţial candidat pentru producerea de medicamente în viitor cu scopul prevenirii unor leziuni hepatice şi menţinerea unui ficat sănătos.

V. CERCETĂRI *IN VIVO* PRIVIND ACŢIUNEA HEPATOPROTECTOARE A CRISINEI ÎMPOTRIVA HEPATOTOXICITĂŢII INDUSE DE TRATAMENTUL CU MITOXANTRONĂ

5.1. Ipoteză / scop / obiective

Studiul efectelor administrării unor substanţe chimioterapeutice prezintă un interes deosebit la ora actuală, când chimioterapia este utilizată frecvent în tratamentul diferitelor boli cum ar fi: cancerul, alergii, bolii autoimmune, etc. Utilizarea citostaticelor în chimioterapia anticanceroasă, manifestă de cele mai multe ori efecte toxice secundare provocând dereglarea funcţionalităţii metabolismului celular al ţesuturilor şi organelor sănătoase.

Scopul principal al tratamentelor cu agenţi chimioterapici este de a preveni ca celulele canceroase să se multiplice, să invadeze, să metastazeze şi în final să ucidă gazda [1].

Crisina este un compus natural, flavonoid (5,7 - dihidroxyflavone), un inhibitor potent al enzimei CYP1A şi aromataza, unul dintre medicamentele pe bază de plante cel mai utilizat pe scară largă în ţările asiatice.

În prezentul studiu, am cercetat efectele protectoare ale crisinei împotriva leziunii induse de administrarea de mitoxantronă la nivel hepatic şi stabilirea unui posibil mecanism de acţiune protectoare.

5.2. Materiale şi metode

5.2.1. Substanţe chimice

Crisina şi Carboximetilceluloza au fost achiziţionate de la Sigma - Aldrich (St. Louis, MO,USA) şi Mitoxantrona de la Novantrone, USA. Kitul Novocasta pentru imunohistochimie a fost cumpărat de la Leica Microsystems (Germania).

5.2.2. Animale şi Protocol Experimental

S-au folosit şoareci CD1 (n=10/lot) , cu greutate~25g, sex feminin şi masculin, crescuţi în regim şi condiţii standard în Biobaza Universităţii de Vest "Vasile Godiş" din Arad.

Cincizeci de animale au fost folosite în acest experiment, împărţite în 5 loturi (grupul de control, grupul MTX, grupul MTX şi 25 mg/kg corp CHR, grupul MTX şi 50

mg/kg corp CHR şi grupul CHR).

5.2.3. Metode şi tehnici utilizate în investigaţiile structurale

5.2.3.1.Tehnica histologică

Pentru realizarea preparatului permanent au fost parcurse cele 8 etape după cum urmează: recoltarea, fixarea, spălarea, includerea, secţionarea, colorarea, montarea, etichetarea [360].

5.2.3.2. Tehnica imunohistochimică

Secţiunile de ţesut ce au fost integrate în parafină, au fost deparafinate în toluen şi rehidratate în trei băi succesive de etanol (100%, 96% şi 70%). Secţiunile au fost spălate şi detaşarea de antigen a fost realizată cu soluţie de citrat de sodiu tamponată (pH 6.0). Lamele au fost blocate cu ser normal de capră 5% timp de 1 h şi apoi incubate cu anticorpi primari pentru Caspază 3, Bax şi Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology INC) peste noapte la 4 ° C (dil 1: 100). După incubarea de peste noapte, lamele au fost spălate şi apoi incubate cu anticorpi secundari corespunzători diluati 1: 100 în soluţia corespunzătoare de blocare timp de 1 h la temperatura camerei. Colorarea de nuclei fost realizată cu hematoxilină după care lamele au fost spalate în apă distilată.

Preparatele marcate imunohistochimic au fost examinate la microscopul optic Olympus BX43, stocate şi analizate cu software CellSense Dimension.

5.3. Rezultate

9.3.1. Examen histopatologic

Analiza structurală a ţesutului hepatic la microscopul optic a arătat că grupul martor a avut o arhitectură hepatică normală (fig. 22). Lobuli hepatici sunt de diferite mărimi, centraţi de vena centrolobulară spre care converg cordoanele de hepatocite. Hepatocitele prezintă o citoplasmă acidofilă, cu nuclei sferici. Capilarele sinusoide venoase sunt dispuse printre cordoanele de hepatocite, au traect neregulat şi converg, ca şi capilarele spre vena centrolobulară, dar prezentând numeroase ramificaţii şi anastomoze.

Morfologia ficatului la grupul tratat cu crisină este comparabilă cu cea a grupului de control (fig. 23).

Ţesutul hepatic prelevat de la animalele cărora li s-a administrat mitoxantronă este alterat, fiind caracterizat prin zone de necroză centrolobulară (fig. 24) şi o distensie a venulelor centrolobulare şi a sinusoidelor pericentrolobulare (fig. 25). Grupul tratat cu 25 mg/kg corp crisină a inhibat parţial modificarile induse de tratamentul cu Mitoxantronă (fig. 26-27). Grupul tratat cu 50 mg/kg corp Crisină a abolit complet modificările structurale induse de tratamentul cu Mitoxantronă (fig. 28-29).

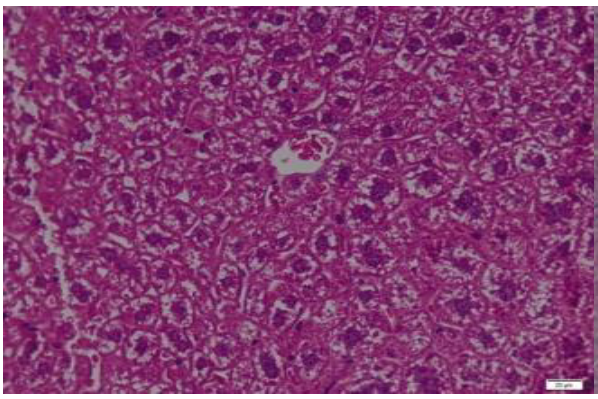


Figura.22.Aspectul histologic normal al ficatului grupului de control; col H.E

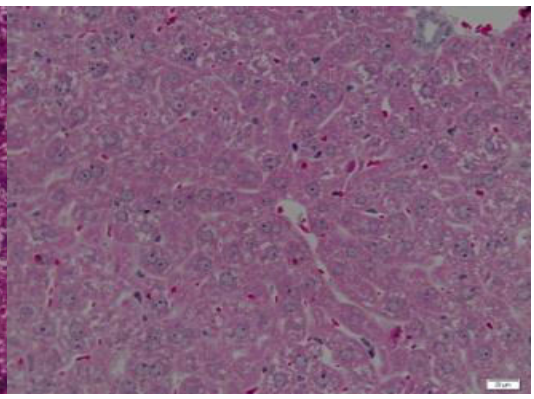


Figura.23.Aspectul histologic al ficatului grupului tratat cu crisină; col H.E.

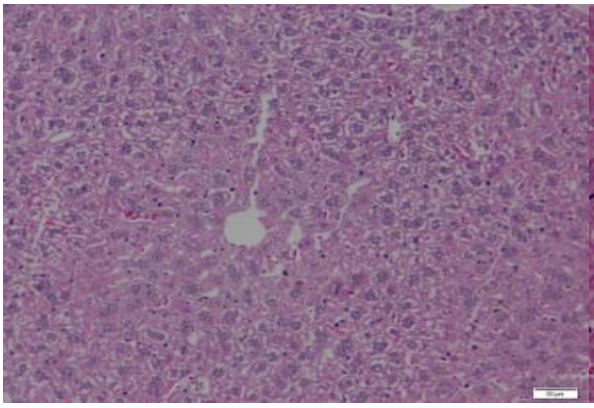


Figura. 24. Aspectul histologic al ficatului grupului cu Mitoxantronă

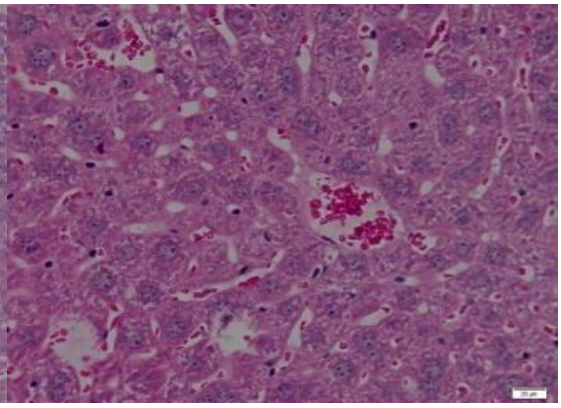


Figura. 25. Aspectul histologic al ficatului grupului cu Mitoxantronă detaliu

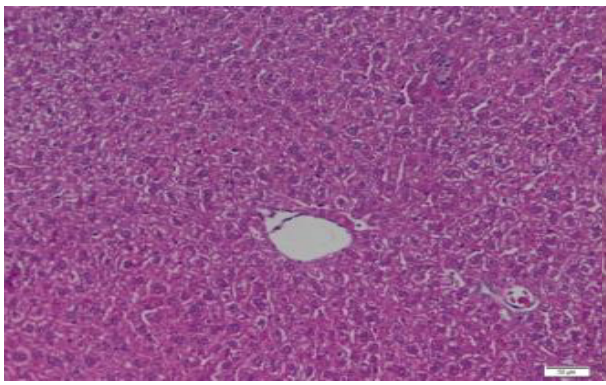


Figura. 26. Aspectul histologic al ficatului grupului cu 25 mg/kg crisină + Mitoxantronă

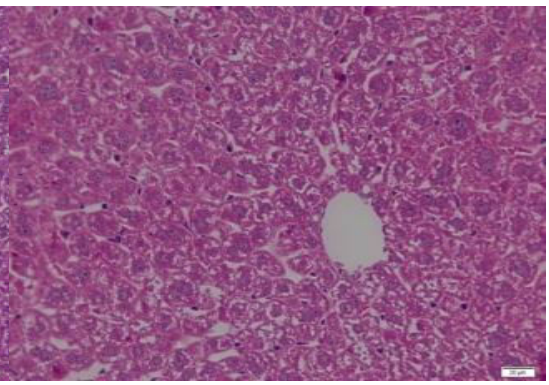
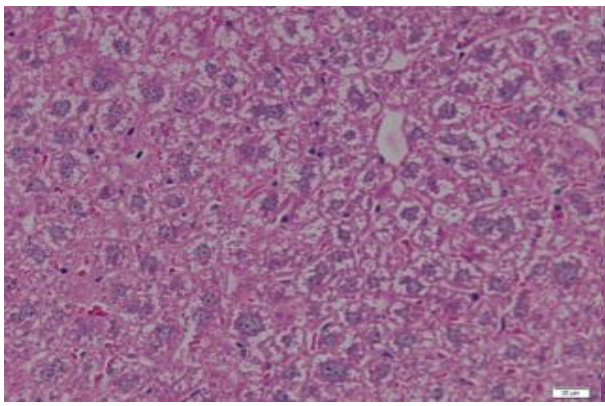


Figura. 27. Aspectul histologic al ficatului grupului cu 25 mg/kg crisină + Mitoxantronă – detaliu



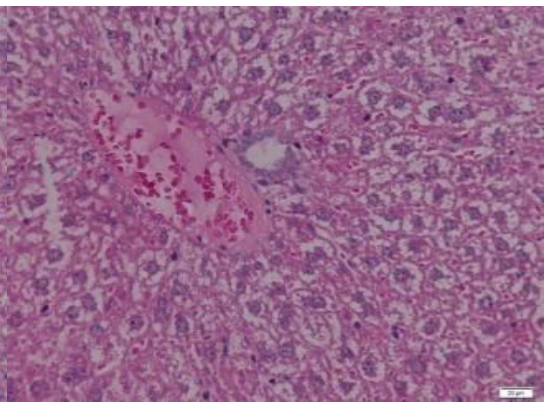
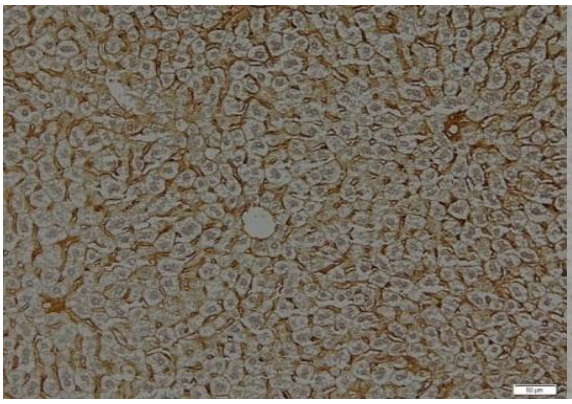


Figura. 28. Aspectul histologic al ficatului grupului cu 50 mg/kg crisină + Mitoxantronă

Figura. 29. Aspectul histologic al ficatului grupului cu 50 mg/kg crisină + Mitoxantronă - detaliu

5.3.2. Analiza imunohistochmică a markerilor de apoptoză

Tratamentul cu Mitoxantronă reduce în mod semnificativ expresia anti-apoptotică a Bcl-2 (Fig. 33) şi măreşte expresia pro-apoptotică Bax şi a caspazei-3 (Fig. 34-35), comparativ cu martorii (Fig. 30-32).Tratamentul cu ambele doze de Crisină a dus la normalizarea activităţilor antiapoptotice mitocondriale Bcl-2 (Fig. 39) şi semnificativ a suprimat creşterea expresiei Bax şi a Caspazei- 3 (Fig. 37-41).



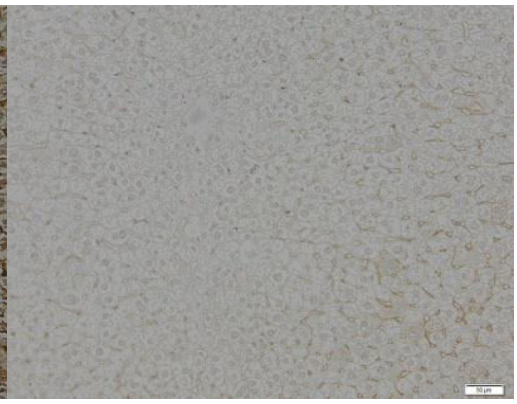


Figura.30. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a Bcl-2 în parenchimul hepatic al lotului martor.

Figura.31.Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a Bax în parenchimul hepatic al lotului martor.

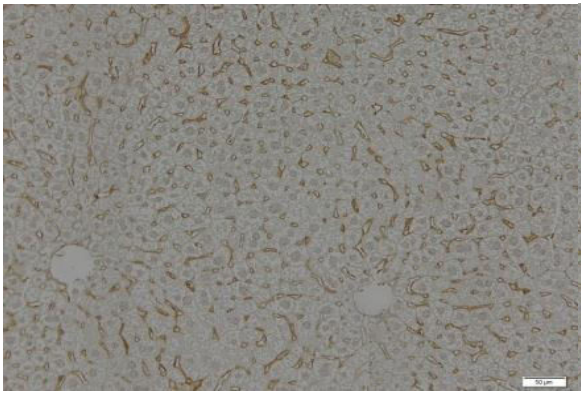


Figura.32. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a caspazei-3 în parenchimul hepatic al lotului. martor

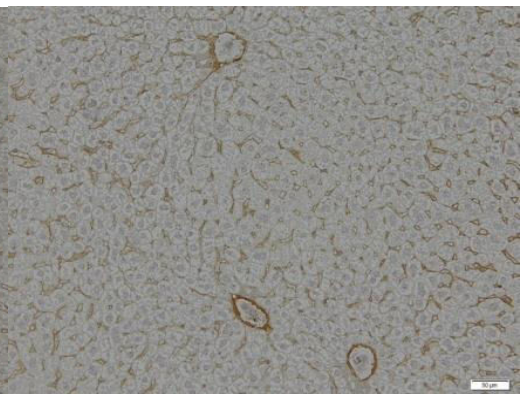


Figura.33. Expresia imunohistochimică şi distributia specifică a Bcl-2 în parenchimul hepatic al lotului Mitoxantronă

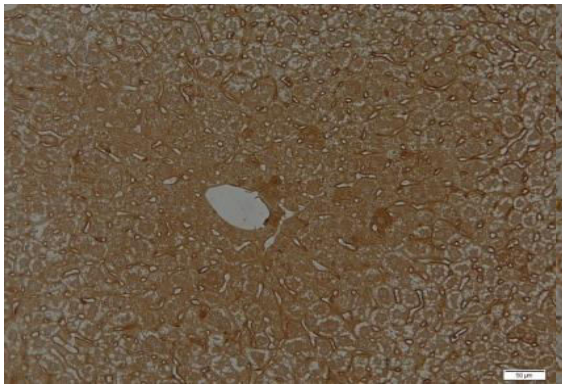


Figura. 34. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a Bax în parenchimul hepatic al lotului Mitoxantronă.

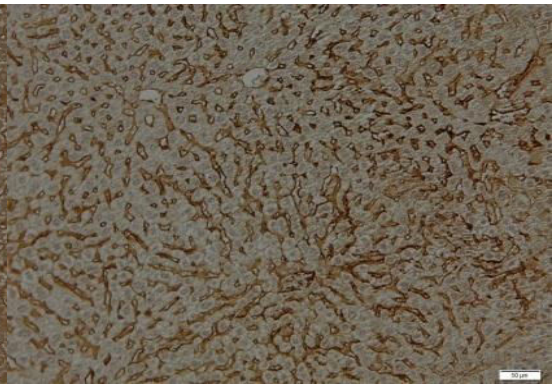


Figura.35. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a caspazei-3 în parenchimul hepatic al lotului Mitoxantronă.

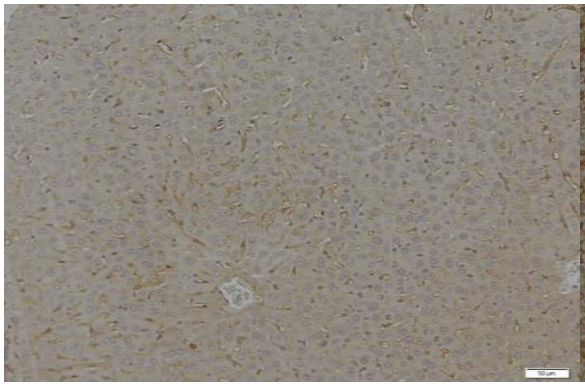


Figura.36. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a Bcl-2 în parenchimul hepatic al lotului 25 mg/kg crisină + Mitoxantronă.

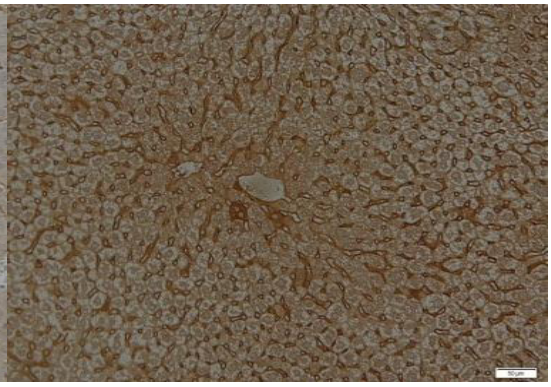


Figura. 37. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a Bax în parenchimul hepatic al lotului 25 mg/kg crisină + Mitoxantronă.

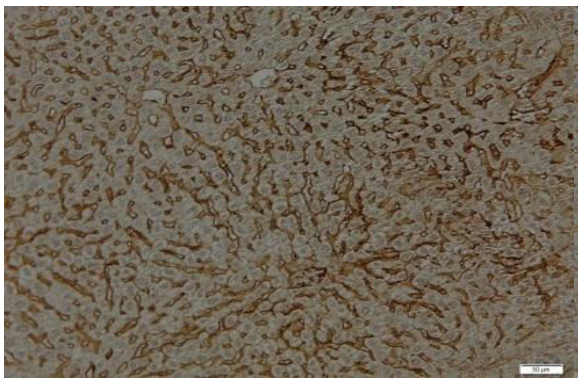


Figura. 38. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a caspazei-3 în parenchimul hepatic al lotului 25 mg/kg crisină + Mitoxantronă

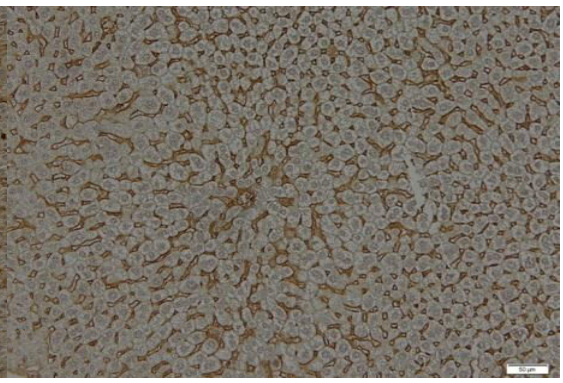


Figura.39. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a Bcl-2 în parenchimul hepatic al lotului 50 mg/kg crisină + Mitoxantronă.

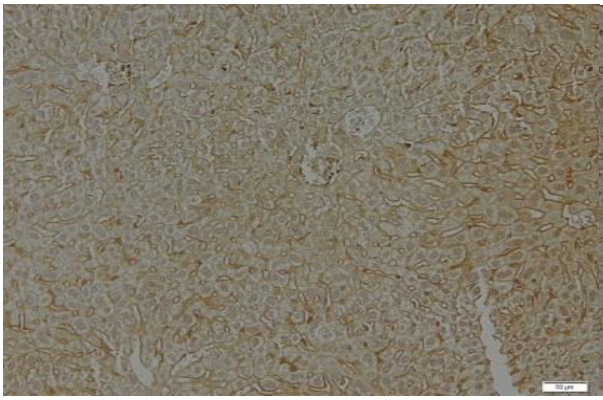


Figura. 40. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a Bax în parenchimul hepatic al lotului 50 mg/kg crisină + Mitoxantronă.

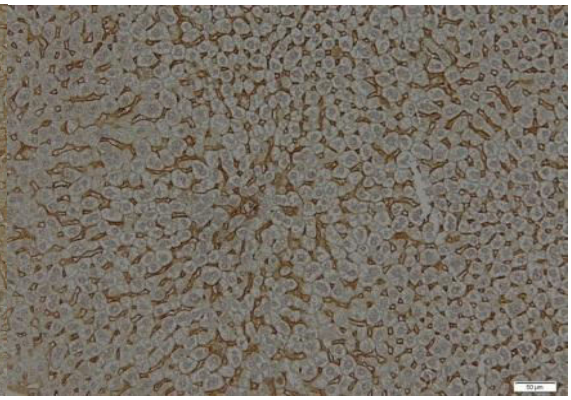


Figura.41. Expresia imunohistochimică şi distribuţia specifică a caspazei-3 în parenchimul hepatic al lotului 50 mg/kg crisină + Mitoxantronă.

5.4. Discuţii

În studiul de faţă, am examinat efectele crisinei asupra familiei de proteine Bcl-2, în ţesutul hepatic al şoarecilor injectaţi cu doze cumulative de 7.5 mg/kgcorp Mitoxantronă.

Rezultatele au arătat ca crisina la doza de 50 mg/kg corp determină atenuarea efectelor pro-apoptotice pe calea activării caspazelor (scăderea expresiei BAX şi a caspazei-3) şi normalizarea activităţilor anti-apoptotice mitocondriale (Bcl-2).

În acest studiu am demonstrat faptul că crisina a atenuat aproape complet activarea caspazei-3 de către tratamentul indus cu Mitoxantronă, sugerând inhibarea căii intrinseci a procesului de apoptoză.

4.5. Concluzii

In doza de 50 mg/kg corp crisina a atenuat toxicitatea hepatică indusă de administrarea mitoxantronei. Rezultatele au noastre au demonstrat faptul că crisina în doză de 50mg/kg corp a determinat atenuarea efectelor pro-apoptotice pe calea activării caspazelor şi normalizarea activităţilor anti-apoptotice mitocondriale.

Concluzii generale

Din ansamblul rezultatelor obţinute şi prezentate în teza de doctorat, conform ipotezelor de lucru, pe baza modelelor experimentale şi a metodelor de analiză aplicate s-au evidenţiat următoarele concluzii pentru studiile efectuate *in vitro* si *in vivo*:

1. Tetraclorura de carbon (CCl_4), un solvent industrial, agent de curăţare şi degresant, este utilizat pe largă pentru inducerea experimentală a unor patologii hepatice la animalele de laborator – de la inflamatie, la steatoză, fibroză şi ciroză hepatică. Totuşi, CCl_4 nu a fost mai fost utilizată anterior pentru inducerea unui stres oxidativ puternic pentru celule hepatice *in vitro*.
2. Favonoizii Quercentin, Rutin şi Hespertin atât ne-formulaţi, cât şi încapsulaţi în ciclodextrine (alpha si beta) au dovedit un efect citoprotector pentru linia celulară Huh-7, împotriva toxicităţii induse de CCl_4 *in vitro,* reprezentând primele rezultate obţinute pe acest model experimental.
3. Dintre cele 3 flavonoide analizate în studiile *in vitro*, quercetina a avut cea mai mare capacitate antioxidată, urmată de hesperetină şi rutină. Extractul formulat bazat pe încapsulare cu β-ciclodextrină s-a dovedit a fi superior formei formulate în α-ciclodextrină, ceea ce-l face un candidat pentru obţinerea unor produse farmaceutice naturale în tratarea unor patologii hepatice.
4. Flavonoidul crisină s-a dovedit a avea o importantă activitate protectoare împotriva toxicităţii hepatice acute induse experimental cu CCl_4 la animalele de laborator. Transaminazele serice au fost semnificativ reduse la tratamentul cu acest flavonoid, ceea ce demonstrează că acest flavonoid are capacitatea de a păstra integritatea structurală a membranei celulei hepatice.
5. Am demonstrat de asemenea pentru prima data că flavonoidul crisină administrat oral timp de o săptămână, are capacitatea de a preveni acumularea de lipide la nivel hepatic, prevenind steatoza micro si macroveziculară, ceea ce indică implicarea în metabolismul normal al lipidelor la nivel hepatic.
6. Analiza histopatologică şi electronomicroscopică a confirmat efectul protector al crisinei *in vivo*, prin reducerea ariilor de necroză centrilobulară si a acumulării de lipide induse de administrarea CCl_4, ceea ce demonstrează protecţia structurală şi ultrastructurală, în special în ceea ce priveşte, structura membranelor reticului endoplasmatic rugos şi protejarea leziunilor din structura membranelor cauzate de peroxidarea lipidică.

7. In intoxicatia acută cu CCl_4, crisina s-a dovedit a avea un efect de inhibare a căilor de semnalizare ale inflamaţiei si a fibrozei hepatice, demonstrat prin scăderea expresiei TNF-α si α-SMA la şoarecii care au fost trataţi preventiv timp de o săptămână cu acest flavonoid.
8. Rezultatele studiului experimental *in vivo*, au demonstat o protecţie similară a flavonoidului crisină cu a silimarinei, împotriva toxicităţii acute induse de CCl_4. Acest rezultat este cu atât mai important, cu cât silimarina este considerat flavonoidul cu cea mai ridicată activitate antioxidată şi hepatoprotectivă demonstrată experimental, până în prezent.
9. In doza de 50 mg/kg corp crisina a atenuat toxicitatea hepatică indusă de administrarea mitoxantronei. Rezultatele au noastre au demonstrat faptul că crisina în doză de 50mg/kg corp a determinat atenuarea efectelor pro-apoptotice pe calea activării caspazelor şi normalizarea activităţilor anti-apoptotice mitocondriale.
În concluzie, crisina pare sa fie un agent hepatoprotector puternic, aproape similar cu silimarina standard în aceeaşi doză şi poate fi luat în considerare pentru medicamentele vizate pe viitor pentru menţinerea unui ficat sănătos şi prevenirea leziunilor hepatice.

În cadrul experimentelor realizate în cadrul acestei teze de doctorat, s-au adus următoarele **elemente de originalitate şi noutate**:

- primul model experimental *in vitro* prin care am indus un stres oxidativ celulelor hepatice prin utilizare CCl_4, care este cunoscut ca agent de inducere experimentală a patologiei hepatice *in vivo*;
- primele rezultate ştiinţifice în care am dovedit efectul protectiv al flavonoidului crisină în toxicitatea hepatică acută indusă experimental *in vivo* cu CCl_4;
- am realizat o analiză complexă histopatologică corelată cu observaţii ultrastructurale privind efectul protectiv al flavonoidului crisină în toxicitatea hepatică acută indusă experimental *in vivo* cu CCl_4;
- prima analiză imunohistochimică prin care am demonstrat efectul anti-apoptotic al flavonoidului crisină la administrarea mitoxantronei, prin inhibarea caspazelor şi normalizarea activităţilor anti-apoptotice mitocondriale.

Bibliografie selectivă

1. Basu A., Sanchez K., Leyva MJ., Wu M., Betts NM., Aston CE., Lyons TJ. Green tea supplementation affects body weight, lipids, and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome. J Am Coll Nutr. 2010; 29(1):31-40.
2. Ratheesh M., Shyni G.L, Sindhu G., Helen A. Protective effects of isolated polyphenolic and alkaloid fractions of Ruta graveolens L. on acute and chronic models of inflammation. Inflammation. 2010; 33(1):18-24.
3. Eberhard S., Katrin S., John Peter K. (2011). The Dutch treatment and social supportsystem for drug users, Recent developments and the example of Amsterdam.
4. Sharma S., Ali A., Ali J., Sahni JK., Baboota S. Rutina: potentialul terapeutic si recentele progrese in livrarea de medicamente Expert Opin Investig Drugs 2013; 22: 1063-1079.
5. Reporter, Daily Mail (9 May 2012). "Chemical found in apples, onions and green tea can help beat blood clots". London: Mail Online. Retrieved 11 May 2012.
6. Na JY., Kim S., Song K., Kwon J. Rutin alleviates prion peptide-induced cell death through inhibiting apoptotic pathway activation in dopaminergic neuronal cells Cell Mol Neurobial 2014.
7. Nieoczym D., Socala K., G Raszewsk.i, Wlaz P.Ameliorating effect of quercetin on acute pentylenetetrazole induced seizures in rats Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014; 54: 50-58.
8. Qu J., Zhou Q., Du Y., Zhang W., Bai M., Zhang Z., Xi Y., Li Z., Miao J. Rutin protects against cognitive deficits and brain damage in rats with chronic cerebral hypoperfusion. Br J Pharmacol. 2014; 171: 3702-3715.
9. Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorld Journal, 2013; 2013: 162750.
10. Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. Proc Biochem. 2004, 39:1033–1046.
11. Shaji J., Iyer S. Novel double loaded quercetin liposomes: evidence of superior therapeutic potency against ccl4 induced hepatotoxicity – a comparative study, Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2012, Vol 5, Issue 2.

12. Khan RA., Khan R and Sahreen S.CCl_4-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat, BMC Complement Altern Med. 2012; 12: 178.
13. Lobo V., Patil A., Phatak A et al: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 4 (2014) 118–126.
14. Balta C., Herman H., Boldura OM et al: Chrysin attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF-b/Smad signaling pathway, Chemico-Biological Interactions 240, 94-101, 2015.
15. Khan MS., Devaraj H and Devaraj N: Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats, Toxicol Appl Pharmacol. 251, 85–94, 2011.
16. Phan TA., Yu XM., Kunnimalaiyaan M et al: Antiproliferative Effect of Chrysin on Anaplastic Thyroid Cancer. J Surg Res. 170, 84-8, 2011.
17. Khan R., Khan AQ., Qamar W et al: Chrysin protects against cisplatin-induced colon toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: Probable role of p38MAPK and p53, Toxicol Appl Pharmacol. 258, 315–329, 2012.
18. Număr total referinţe în text 374.

LISTA DE PUBLICAȚII

A. **Articole științifice publicate / în curs de publicare în reviste ISI**

1. Hermenean A., **Mariaşiu T.**, Navaro-González I., Vegara-Meseguer J., Miuţescu E., Chakraborty S., Pérez-Sánchez H. 2016. Hepatoprotective Activity of Chrysin is Mediated by Inhibition of TNF-α in Chemically Induced Acute Liver Injury: In Vivo Study and Molecular Modelling, *in press* (atasez adeverinta de acceptare), IF=1,28

2. Sasu A., Herman H., **Mariaşiu T.**, Roşu M., Baltă C., Anghel N., Miuţescu E., Cotoraci C., Hermenean A. 2015. Protective effects of silymarin on epirubicin - induced mucosal barrier injury of the gastrointestinal tract, *Drug an Chemical Toxicology*, 38(4): 442-451, IF= 1,098

B. **Articole științifice publicate / în curs de publicare în reviste indexate BDI**

1. **Mariaşiu T.**, A., Herman H., Caruntu S., Hădărugă N., Hermenean A. 2016. Protective effect of α/β-cyclodextrin nanoencapsulated rutin, quercetin and hesperetin against CCl_4-induced damage on the Huh7 cells. *Studia Universitatis "Vasile Goldis" Arad, Life Sciences Series*, 26(3): 380-384.

2. Pilat L., Mihali C.V., Herman H., Popescu C., Turcus V., Ardelean A., Gavril A., **Mariaşiu T.**, Popa C., Hermenean A. 2011. Pharmacology of *Sylibum marianum* and its active constituents. Therapeutic activity – Part 1, *Jurnalul Medical Aradean*, 14(2): 25-33.

3. Herman H., Pilat L., Mihali C., Popescu C., Turcus V., Ardelean A., Gavril A., **Mariaşiu T**., Popa C., Hermenean A. 2011. Pharmacology of *Sylibum marianum* and its active constituents. Therapeutic Activity – Part 2 , *Jurnalul Medical Arădean*, 14(2): 35-40.

C. Lucrări prezentate la conferințe științifice internaționale/naționale

1. Popescu C., Pilat L., Cotoraci C., Mihali C., **Mariaşiu T.,** Hermenean A. Evaluation of epirubicin-indiced toxicity in mice liver and the prevention of

toxicity through sylibum marianannum native oil administration , Congresul Balcanic de Medicina de Laborator, Bucuresti 21-23 sept.2011.

2. **Mariaşiu T.,** Miuţescu E., Acute on chronic hepatic injuries induced with carbon tetrachloride in mice, Arad Academic Days, 2014.

3. **Mariaşiu T**., Miuţescu E., Hermenean A., Evaluation of the protective chrysin effects against induced mitoxantrone hepatotoxicity, Arad Academic Days, 2015.

D. Participare în grupul ţintă ca student doctorand în cadrul proiectului "Dezvoltarea resurselor umane doctoranzi şi postdoctoranzi pentru cercetare de excelenţă în domeniile sănătate şi biotehnologii POSDRU /159/1.5/S/ 141531", proiect confinantat din Fondul Social European prin Programul Operational Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013