

Universitatea de Științele Vieții "Regele Mihai I" din Timișoara

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara



ORĂȘAN ALIC SERGIU AUREL

TEZĂ DE DOCTORAT

**ABORDĂRI FITOTERAPEUTICE ÎN CADRUL ULCERULUI
GASTRIC ȘI A LIPIDOZEI HEPATICE LA ANIMALE - UN
MODEL MURIN**

Conducător științific:

Prof. Dr. CRISTINA ROMEO TEODOR

Timișoara

2024

University of Life Sciences "*King Michael I*" from Timisoara

Faculty of Veterinary Medicine Timișoara



ORĂȘAN ALIC SERGIU AUREL

DOCTORAL THESIS

**PHYTOTHERAPEUTIC APPROACHES IN GASTRIC ULCER
AND HEPATIC LIPIDOSIS IN ANIMALS - A MURINE MODEL**

Scientific advisor:

Prof. CRISTINA ROMEO TEODOR, DVM, PhD.

**Timișoara
2024**

Rezumatul tezei de doctorat

Abordări fitoterapeutice în ulcerul gastric și lipidoza indusă la animale - Un model murin

Prezenta teză conține:

Lista de abrevieri

Rezumatele în limba română și engleză

Partea de cercetări bibliografice: 45

Partea de cercetări proprii: 124

Tabele: 10

Figuri și foto: 81

Surse bibliografice: 345

Anexe

Motivația alegerii temei de doctorat

În fitoterapie, extractele de plante folosite sunt de obicei slab controlate și standardizate. Climatul, calitatea solului, genetica plantelor, timpul de recoltare și tehnica de extracție sunt toate elemente care afectează compoziția activă a plantelor. Proprietățile farmacologice ale plantei sunt atribuite principalilor fito nutrienți secundari ai plantei, compușii polifenolici.

În cele mai multe cazuri, alegerea testului potrivit pentru a fi efectuat depinde de boala care urmează să fie tratată, precum și de informațiile disponibile despre modelul experimental care urmează să fie utilizată. Tratarea ulcerul gastric reprezintă o provocare, atât pentru medicina umană, cât și pentru cea veterinară. Cele mai frecvente cauze ale ulcerului gastric la oameni este infecția cu *Helicobacter pylori*, consumul inadecvat de antiinflamatoare, stresul și fumul de țigară.

În cazul animalelor de companie, ulcerul este cel mai des asociat cu factorii de mediu, consumul de alimente necorespunzător sau necomesibile, administrările de antiinflamatoare necorespunzător.

Astfel, ca testarea anumitor produse bazate pe plante medicinale sau produse naturale, cum ar fi lăptișorul de matcă, reprezintă o bună abordare științifică în a vedea capacitatea acestora de a ameliora ulcerul gastric.

Steatoza hepatică este una dintre cele mai comune afecțiuni întâlnite în medicină, iar găsirea de noi modalități de a aborda această afecțiune, reprezintă o temă de actualitate, având o foarte mare importanță în medicina umană și veterinară.

Prezenta teză de doctorat, propune o abordare etapizată a tratamentului ulcerului gastric și a prevenirii instalării lipidozei hepatice. Fiind folosite plante medicinale și produse biologice, studiate în literatura de specialitate și fiind cunoscute ca având un bun efect antiinflamator, anti oxidant, hepato protector și anti-ulcerogenic.

Importanța și actualitatea temei

Produsele standardizate pe bază de plante și produsele biologice utilizate în această teză de doctorat, au fost bine cercetate, înainte de a fi alese. Acestea sunt de o calitate superioară, iar unele dintre ele sunt sintetizate de laboratoare sau institute de cercetare din străinătate.

Alegerea plantei *Angelica keiskei* K., a reprezentat un element major de noutate pentru mediul științific din România, fiind primele cercetări realizate cu această plantă, care are proveniența pe continentul asiatic.

Alegerea plantei *Curcuma longa* L, nu a fost o alegere grea, această plantă fiind foarte populară în lumea științifică, existând publicate sute de articole, care cercetează proprietățile medicinale ale acestei plante.

Efectele lăptișorului de matcă, în diverse patologii este mai puțin studiat, iar aplicarea acestuia în tratamentul ulcerului gastric, este o temă de cercetare foarte puțin abordată. Un alt element de actualitate al acestei teze de doctorat, este faptul că s-a efectuat o asociere între *C. longa*, *A. keiskei* și lăptișorul de matcă și a fost administrat pentru a vedea potențialul efect sinergic dintre acestea în cazul tratamentului ulcerului gastric.

Lipidoza hepatică reprezintă o afecțiune foarte des întâlnită în cadrul medicinei, iar utilizarea unui model clasic de inducere a hiperlipidemiei prin administrarea unei diete bogate în grăsimi, comparativ cu administrarea unui monozaharid, denumit D(+) galactoză, ar putea reprezenta un element de noutate.

Coenzima Q10 reprezintă o moleculă esențială pentru organism, iar datorită efectului său antioxidant, este folosită în foarte multe cercetări științifice. Efectuarea studiului histologic, bio-molecular și a testelor para-clinice, reprezintă metode de analize moderne și de actualitate.

De asemenea utilizarea unui produs pe bază de orz verde (SOD natural), reprezintă un element de noutate absolut, fiind prima dată când se cercetează potențialul efect asupra acestei patologii, a respectivului supliment.

Locația experimentelor:

- Laboratorul disciplinei Farmacologie / FMV Timișoara
- Laboratorul de Biologie Celulară, Histologie și Embriologie / FMV Timișoara
- Laboratorul de anatomie patologică/ Synevo Vet București
- Laboratorul de biologie moleculă/FMV Timișoara.
- Laboratorul clinic de analizi biochimice/ FMV Timișoara
- Studiile preclinice au fost efectuate în biobaza animală / USVT / Timișoara

Metodologie aplicată

- Examen histopatologic realizat conform tehnicii histologice clasice, metodele de colorare cu hematoxilina-eozină.
- Tehnica paraclinică pentru măsurarea profilului lipidic seric, a activității enzimelor hepatice și a testelor funcției renale a fost măsurată cu un kit enzimatic pe un Randox Daytona folosind un analizor biochimic automat în funcție de metoda colorimetrică (*Randox, UK*).
- Curba de calibrare a fost efectuată cu serul de calibrare Randox nivel 3 (Cat. Nu. CAL 2351), iar diagramele QC pentru materialele de referință au fost create folosind două niveluri de ser de control: Randox Assayed Multisera Level 2 (Cat. Nu. HN 1530) și nivelul 3 (Cat. Nu. HE 1532).
- Cuantificarea expresiei genelor a fost efectuată prin metoda RT-qPCR. Fiecare lot de ADNc a fost analizat în triplu exemplar. A fost inclus un control negativ al șablonului (NTC) pentru fiecare pereche de primeri. Pentru aceste analize au fost utilizate kitul PowerUp SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems, ThermoScientific, Austin, TX, SUA*) și sistemul PCR în timp real 7500 (*Applied Biosystems, Forester, CA, SUA*).

- Analiză statistică: Graph Pad Prism 6.0 și 9.0 pentru Windows a fost utilizat ca software statistic (Graph Pad Software San Diego, SUA). Media \pm SEM (Standard Error of the Mean) a fost pentru a exprima toate datele. Analiza bidirecțională a varianței (ANOVA) cu testele de comparație multiplă ale lui Tukey și corecția Bonferroni.
- Decizia de aprobare a Comisiei de bioetică cu nr. 140/02.11.2022.

Teza este împărțită în două părți majore:

- Stadiul actual al cunoașterii
- Cercetări proprii.

I. Partea generală

Stadiul actual al cunoașterii

Această parte reprezintă 30% din teză, este structurată în **3 capitole** care sunt dedicate prezentării aspectelor legate de:

1. Ulcerul gastric, reprezintă un capitol exhaustiv a informațiilor științifice, din literatura de specialitate, care descrie, prevalența ulcerelor gastrice în rândul animalelor, citoarhitectura și anatomia stomacului la rozătoare, mecanismele pato-fiziologice de la nivelul stomacului, etiologia ulcerelor gastrice la animale, modele murine de cercetare a ulcerului gastric, precum și principale molecule utilizate în combaterea ulcerului gastric.
2. Lipidoza hepatică. În acest capitol se face o introducere în mecanismele pato-fiziologice în cadrul instalării lipidozei, la nivelul ficatului, descrie principalele clase de lipide din organism, precum și mecanismele celulare care conduc la leziuni hepatice și boala ficatului gras non-alcoolic.
3. Tratamentul Fitoterapic și biologic în ulcerul gastric și lipidoza hepatică, reprezintă informații despre plantele și produsele utilizate în partea experimentală, *Curcuma longa L.*, *Angelica keiskei K* și lăptișorul de matcă în cazul tratamentului ulcerului gastric, precum Coenzima Q10 și sucul de orz verde în cadrul prevenirii instalării lipidozei hepatice.

II. Cercetările proprii

Partea a II-a a tezei de doctorat reprezintă 70% din teză. Este structurat pe **5 capitole** și sunt prezentate metodologia experimentală abordată în ulcerul gastric și lipidoza hepatică, tratamentul acestor afecțiuni cu produse standardizate din plante și produse biologice, rezultate studiilor histologice, studiului biomolecular, analize paraclinice, teorii și corelații originale în cazul interpretărilor rezultatelor analizelor efectuate

4. ***Influența suplimentelor de Curcuma longa L., Angelica keiskei K și Lăptișor de matcă, în administrările de aspirină și omeprazol, asupra profilului enzimatic și lipidic - Un model murin***

Scopul studiului a fost de a evalua influența a *Curcuma longa L.*, *Angelica keiskei K.*, lăptișor de matcă și omeprazol, în cazul profilului enzimatic și lipidic hepatic, comparativ cu administrările de aspirină, la șorică din linia Balb/c. De asemenea, a fost efectuată și o mixtură din *A. keiskei*, *C. longa* și lăptișor de matcă, pentru a vedea potențialul de potențare a acestor suplimente alimentare.

Obiective:

- Ameliorarea toxicității antiinflamatoarelor și a efectelor adverse a acestora prin administrarea de produse biologice.
- Menținerea parametrilor enzimatici hepatici și a profilului lipidic, în valori normale de referință.
- Studierea interacțiunii și potențialului efect terapeutic a *A. keiskei*, *C. longa*, lăptișorului de matcă și asocierii dintre acestea în cazul stresului hepatic indus cu aspirină.

Metode utilizate:

Procurarea pudrei de *A. keiskei* s-a făcut de la institutul „Japan Bio Science”, complexul lipozomal de *C. longa* a fost achiziționat de la Lipolife UK, iar lăptișorul de matcă liofilizat a fost achiziționat de la Complex apicol „Veceslav Harnas S.A.”, Bucuresti. Șoriciei incluși în experiment au fost achiziționați de Institutul Militar „Cantacuzino” București.

Ca și molecule medicamentoase au fost utilizate Aspirina, de la compania Bayer și omeprazolul, de la Dr. Reddys. Serul recoltat de la șoriciei, a fost centrifugat și stocat la -4 grade până în momentul prelucrării probelor. Concentrațiile trigliceridelor (TG) colesterolului (CHOL), alaninaminotransferazei (ALT), aspartataminotransferazei (AST) au fost măsurate cu analizorul automat de biochimie Randox Daytona Plus (*Randox, Crumlin, U.K.*), folosind kiturile comerciale corespunzătoare (*Randox, Crumlin, U.K.*).

Calibrarea a fost efectuată cu Randox Calibration Serum Level 3 (Cat. No. CAL 2351), iar diagramele QC pentru materialele de referință au fost create folosind două niveluri de ser de control: Randox Assayed Multisera Level 2 (Cat. Nu. HN 1530) și respectiv nivelul 3 (Cat. No. HE 1532).

Prelucrarea statistică a fost efectuată cu software-ul statistic utilizat a fost Graph Pad Prism 6.0 pentru Windows (*Graph Pad Software, San Diego, SUA*). Valorile au fost exprimate ca medie \pm SEM (Standard Error of Means). Estimarea diferenței dintre grupuri a fost stabilită folosind analiza bidirecțională a varianței (ANOVA) cu teste de comparație multiplă ale lui Tukey. Valorile statistice au fost considerate după cum urmează: *0,01 \leq p < 0,05, semnificative; **0,001 \leq p < 0,01, foarte semnificativ; p < 0,001, semnificativ foarte mare; NS: Nu este semnificativ.

Rezultate:

Administrările de aspirină nu au influențat enzimele hepatice sau profilul lipidic din serul exprimat. Administrarea de *Curcuma longa* L., *Angelica keiskei* K. Lăptișor de matcă și asocierea dintre acestea nu a influențat negativ profilul enzimatic hepatic sau lipidic din serul sanguin. Produsele administrate, ar putea avea un efect hepatoprotector, în cadrul administrărilor pe termen scurt sau lung.

5. Influența suplimentelor de *Curcuma longa*, *Angelica keiskei* și Lăptișor de matcă, în administrările de aspirină și omeprazol, asupra citoarhitecturii stomacului, ficatului, rinichiului și a splinei - Un model murin

Scopul studiului a fost de a găsi tratamente alternative în ulcerul gastric sau de a ameliora evoluția acestuia. Chiar dacă efectul turmericului, în diverse afecțiuni sau patologii a fost foarte studiat, inclusiv în cazul ulcerul gastric, *Angelica keiskei* sau lăptișorul de matcă au fost mai puțin abordate ca și potențiale tratamente în această patologie. Astfel încât, existând pretenții și curiozități științifice pertinente, din cele trei produse s-a efectuat și un amestec. Acest potențial tratament a fost pentru prima dată abordat în domeniul științific și a fost cumva un „pariu”, dar cu o miză și semnificație științifică mai mică, care putea să aibă rezultate științifice sau nu, în cercetare fiind

încurajate noile abordări, chiar dacă acestea nu se finalizează cu rezultate adecvate. Un alt punct important al experimentului a fost de a compara proprietățile anti-ulcer a turmericului, *Angelica keiskei* și a lăptișorului de matcă comparativ cu un medicament de elecție în medicină.

Obiectivele experimentului:

- Găsirea unor rute alternative de ameliorare sau tratament în cazul ulcerului gastric.
- Cercetarea influenței a *C. longa* K., *A. keiskei* L. și lăptișorului de matcă în cazul ulcerului gastric.
- Potențialul de ameliorare a efectelor adverse ale acidului acetic salicilic, prin adăugarea în componența acestuia anumiți constiuenți fitochimici.
- Maparea modificărilor cito-histologice în cazul administrărilor de aspirină, precum și în urma aplicării de tratament fitoterapic.
- Îmbogățirea cunoștințelor din domeniu, în ceea ce privește mecanismele patologice implicate în ulcerul gastric

Metode utilizate:

Procurarea pudrei de *A. keiskei* s-a făcut de la institutul „Japan Bio Science”, complexul lipozomal de *C. longa* a fost achiziționat de la compania Lipolife UK, iar lăptișorul de matcă liofilizat a fost achiziționat de la Complex apicol „Veceslav Harnas S.A.”, Bucuresti, Romania. Șoriceii incluși în experiment au fost achiziționați de Institutul Militar „Cantacuzino” din București. Ca și molecule medicamentoase au fost utilizate Aspirina, de la compania Bayer și omeprazolul, de la Dr. Reddys.

Șoriceii au fost aneștizați conform actelor normative naționale și europene și le-au fost recoltate, pentru efectuarea studiului histologic următoarele organe: stomac, ficat, rinichi și splină. Fragmentele de stomac, ficat, rinichi și splină au fost fixate în alcool etilic 80 la sută, pentru minim 7 zile, după care au fost spălate, deshidratate și incluse în parafină. Secțiunile astfel pregătite au fost prelucrate pentru studiul histologic prin colorația Hematoxilină–Eozină.

Imaginile histologice au fost captate utilizând programul software al microscopului Olympus CX41 (*Olympus, Hamburg, Germania*).

Rezultate:

În urma analizării secțiunilor histologice la nivelul stomacului cele mai bune rezultate sunt prezentate în tabelul de mai jos:

T1 (7 zile)	Modificări histologice	T 2 (14 zile)	Modificări histologice
Omeprazol	Zone ușoare de eroziune Infiltrat inflamator	<i>C. longa</i> / Omeprazol	Edem peritubular (omeprazol)
Curcuma <i>longa</i>	Ușoare Zone de eroziune Vasodilatație a vaselor de sânge		Epiteliu monostratificat ușor discontinuu (<i>C. longa</i>)
Mixt	Ușoare Zone de eroziune Infiltrat inflamator	Mixt	Edem peritubular Infiltrat inflamator
Aspirină/ <i>A. keiskei</i>	Vasodilatație a vaselor de sânge (doar în cazul AK) Edem peritubular Zona de eroziune Infiltrat inflamator	Aspirină	Epiteliu monostratificat ușor discontinuu Edem peritubular Infiltrat inflamator
		<i>A keiskei</i>	Zona de eroziune Infiltrat inflamator
Lăptișor de matcă	Vasodilatație a vaselor de sânge Edem peritubular Zona de eroziune moderate	Lăptișor matcă	Zone de eroziune severă. Infiltrat inflamator abundant, Edem peritubular sever

Secțiunile histologice de la nivelul ficatului, au arătat în mare un aspect normal. La nivelul secțiunilor efectuate din rinichi, Loturile tratate cu *Angelica keiskei* la 14 zile și lotul tratat cu lăptișor de matcă la 7 respectiv 14 zile, a arăta prezența unui infiltrat leucocitar plasmocitar la nivelul glomerulului renal. La nivelul secțiunilor efectuate din splină, citoarhitectura acesteia a arătat normal.

6. Influența suplimentelor de *Curcuma longa*, *Angelica keiskei* și Lăptișor de matcă în inflamație- studiu biomolecular.

Metode utilizate: procurarea materialelor a fost menționată anterior.

Reacțiile qPCR pentru evaluarea expresiei genice a fost efectuată prin metoda RT-qPCR.

Fiecare lot de ADNc a fost analizat în triplu exemplar. A fost inclus un control negativ al șablonului (NTC) pentru fiecare pereche de primeri. Pentru aceste analize au fost utilizate kitul PowerUp SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems, ThermoScientific, Austin, TX, SUA*) și sistemul PCR în timp real 7500 (*Applied Biosystems, Forester City, CA, SUA*).

Primerii utilizați în acest studiu au fost obținute din Primer Bank pentru *Mus musculus* (șoarece) (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>).

Primerii au fost sintetizați de Eurogentec (*Senraig, Belgia*). GAPDH a servit ca genă de referință pentru normalizarea reacțiilor RT-qPCR.

Prelucrarea statistică a fost efectuată cu software-ul statistic utilizat a fost Graph Pad Prism 6.0 pentru Windows (*Graph Pad Software, San Diego, SUA*).

Rezultate:

Administrarea de *Curcuma longa L.* și omeprazol, reglează pozitiv expresile genice în cazul moleculelor evaluate în acest experiment.

Asocierea dintre *C. longa*, *A. keiskei* și lăptișorul de matcă, are un potențial antioxidant, deoarece are o expresie genică foarte ridicată.

Reglarea expresiei genice a COX 1 și COX 2, a arătat cele mai promițătoare rezultate în cazul *C. longa* și Omeprazol.

În cazul NF-kB-p65, cea mai ridicată valoare genică se găsește în cazul lotului tratat cu *A. keiskei* timp de 14 zile, acest lucru arătând prezența procesului proliferativ. Cele mai ridicate valori ale citokinelor inflamatorii IL-6 și TNF-alpha se regăsesc în cazul loturilor tratate cu lăptișor de matcă și în cazul lotului Mixt.

7. Corelații și ipoteze în ceea ce privește morfologia organelor, profilului biomolecular în inflamație și a testelor para-clinice în cazul administrării de *Curcuma longa L.*, *Angelica keiskei K.*, Lăptișor de matcă și asocierii dintre acestea în gastrita indusă, în cazul modelului murin.

Scopul și obiectivele: acestui studiu sunt de a corela rezultatele cercetării efectuate în primele 3 experimente și de a încerca a veni în lumea științifică cu un nou mecanism/fenomen foarte puțin descris în literatura de specialitate, referitor la rolul și implicarea adipocitelor, în cadrul ulcerului gastric. Interpretarea științifică a rezultatelor.

Rezultate:

Propunerea unei teorii originale despre rolul adipocitelor implicate în procesul inflamator în cazul ulcerului gastric. rezența țesutului adipos în cazul proceselor de vindecare în inflamație, ar putea arăta, că aceste adipocite sunt influențate de către citokinele inflamatorii.

8. Inducerea lipidozei hepatice, doze administrate și model experimental- Influența sucului de orz verde (SOD natural) și a Coenzimei Q10 asupra lipidozei induse într-un model murin - Aspecte histologice

Scopul studiului: de a evalua eficacitatea unei diete bogate în grăsime și a D (+) galactozei de inducere a lipidozei hepatice și influența acestora asupra altor organe, cum ar fi rinichiul și intestinal.

Obiectivele studiului:

De a vedea potențialele efecte de ameliorare a lipidozei hepatice prin intermediul administrării de Q10 și HFD din punct de vedere histologic. În studiu au fost incluși 56 de șobolani din linia Wistar alb, masculi și female, achiziționați de la Institutul Militar Cantacuzino București, clinic sanatoși, cu greutatea uniformă (140-160 g), cu vârsta de 10 săptămâni.

Hrana bogată în grăsimi a fost preparată în manual, respectând rețetele care se regăsesc în literatura de specialitate, dar a fost ușor modificată. Conținutul de grăsime, proteină, cenușă și umiditatea au fost analizate de laboratorul internațional JS Hamilton, în Polonia.

Coenzima Q10 a fost achiziționată de la LipoLife Oradea, Romania, sub denumirea comercială de LLQ10 (*Drakes Lane Industrial Estate, Boreham, UK*) (lot: UELE 1707). În concentrația de 4% substanța activă (unde 5 ml de extract, conține 200 mg coenzima Q10)

Sucul natural de orz verde, supliment alimentar antioxidant, achiziționat de la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militar „Cantacuzino” București, lot 22-43 (control 22060215), o cutie conținând 10 fiole a 5 ml.

D(+) galactoza, a fost achiziționată de la (*Vita-World, Taurusstein, Germania*), lot 65232. Puritya produsului fiind de 99.6%.

Țesuturile au fost fixate în formol tamponat neutru 10% pentru 48 ore, procesate automat prin includere la parafină și secționare ulterior cu o grosime de 2 μm. Secțiunile au fost colorate cu hematoxilina-eozină (*ST Infinity H & E Staining kit, Leica Biosystems, Richmond, IL, USA*), folosind un aparat automat de colorare (*Gemini AS, Eprexia, Runcorn, UK*).

Colorația Gomori Methenamine Silver modificată (*kit GMS II, Ventana Medical Systems, Tucson, SUA*) pentru evidențierea organismelor fungice a fost efectuată folosind un aparat automat de colorare (*BenchMark Special Stains, Ventana Medical Systems, Tucson, SUA*).

Obținerea imaginilor digitale s-a realizat prin scanarea integrală a lamelor histologice prin utilizarea scannerului IntelliSite Ultra Fast Scanner (*Philips, Best, The Netherlands*).

Preparatele histologice au fost prelucrate în cadrul Synevo Vet București, de către departamentul de anatomie patologică.

Rezultatele în examinările macroscopice a organelor:

Cele mai multe semne ale efectelor HFD au fost observate asupra ficatului, pe lângă prezența unei cantități mari de grăsime, care a fost observată clar în cavitatea abdominală care înconjură toate organele, în special intestinul.

Examinarea brută a ficatului a arătat o colorație galbenă, prezența petelor galbene pe suprafața ficatului, o creștere a dimensiunii ficatului și semne de inflamație au fost observate în comparație cu cea a grupului de control normal. Semnele au fost mai severe după 16 săptămâni de tratament.

În probele prelucrate în cadrul grupului de control, evaluarea histologică a ficatului prin colorarea H&E, a arătat arhitectură hepatocelulară normală și hepatocite normale fără semne de deteriorare.

Rezultatele în examinările histologice

În cazul lotului control, hepatocitele normale sunt dispuse radial în cordonul hepatic în jurul venelor centrale. Hepatocitele, au aspect poligonal. Nu au fost identificate semne de afectare hepatocelulară după perioada în care a fost desfășurat experimentul.

În cazul lotului D(+) galactoză și D(+) galactoză + SOD, secțiunile histologice au arătat, glicogenoză moderată centrolobulară, cu prezența inflamației periferice mononucleară moderată, Instalarea unei lipidoze micro și macrovacuolară periportală. Prezența de infiltrat leucocitar și plasmocitar discret periportal, glicogenoză redusă, mai ales periportal, fără semne de instalare a steatozei hepatice.

Ultima parte a lucrării de doctorat este dedicată **Concluziilor finale** și relevării aspectelor de originalitate/noutate precum și a îndrumărilor pentru practicienii din teren.

Cele mai importante aspecte de noutate care au reieșit din cercetările noastre au fost:

- *Studiu molecular inedit, efectuat pe un număr complex de gene și asocieri (COX 1 și 2, Il 2- 6, TNF-alpha, NF-kb- p65 și p50, SOD).*
- *Studiul privind efectele Angelica keiskei K. în ulcerul gastric indus pe model murin.*
- *Studii inovative privind influențele asocierilor dintre Curcuma longa L., Angelica keiskei K. și lăptișorul de matcă în ulcerul gastric indus pe model murin*
- *Identificarea unui nou mecanism posibil implicat în procesul de vindecare al ulcerului pe model murin.*
- *Administrarea de D(+) galactozei, ca model de inducere a lipidozei hepatice în modelul murin.*
- *Conceperea și prepararea unei diete HFD (High Fat Diet) proprii pentru modelul murin.*

Summary of the doctoral thesis

Phytotherapeutic approaches in gastric ulcer and lipidosis induced in animals - A murine model

This thesis contains:

List of abbreviations

Summary in Romanian and English

Bibliographic research part: 45

Own research part: 124

Tables: 10

Figures and photo: 81

Bibliographic sources 345

Annexes

Motivation for choosing the doctoral theme

In phytotherapy, the plant extracts used are usually poorly controlled and standardized. Climate, soil quality, plant genetics, harvest time, and extraction technique are all elements that affect the active composition of plants. The pharmacological properties of the plant are attributed to the main secondary phytonutrients of the plant, polyphenolic compounds.

In most cases, choosing the right test to perform depends on the disease to be treated, as well as the available information about the experimental model to be used. Treating gastric ulcers is a challenge for both human and veterinary medicine. The most common causes of gastric ulcers in humans are *Helicobacter pylori* infection, inadequate consumption of anti-inflammatories, stress and cigarette smoke. In the case of pets, ulcers are most often associated with environmental factors, inadequate or inedible food consumption, inadequate administration of anti-inflammatories.

Thus, testing certain herbal products or natural products, such as royal jelly, is a good scientific approach in seeing their ability to relieve gastric ulcers.

Hepatic steatosis is one of the most common conditions encountered in medicine, and finding new ways to approach this condition is a topical topic, having a great importance in human and veterinary medicine.

This doctoral thesis proposes a phased approach to the treatment of gastric ulcers and the prevention of hepatic lipidosis. Medicinal plants and biological products are used, studied in the literature and are known to have a good anti-inflammatory, anti-oxidant, hepatoprotective and anti-ulcerogenic effect.

The importance and timeliness of the theme

The standardized herbal products and biological products used in this doctoral thesis were well researched before being chosen. They are of high quality, and some of them are synthesized by laboratories or research institutes abroad. The choice of the *Angelica keiskei* K. plant was a major novelty for the scientific environment in Romania, being the first research carried out with this plant, which originates on the Asian continent.

The choice of the plant *Curcuma longa* L was not a difficult choice, this plant being very popular in the scientific world, there are hundreds of articles published that research the medicinal properties of this plant.

The effects of royal jelly in various pathologies is less studied, and its application in the treatment of gastric ulcers is a very little approached research topic. Another topical element of this doctoral thesis is the fact that an association was made between *C. longa*, *A. keiskei* and royal jelly and was administered to see the potential synergistic effect between them in the case of gastric ulcer treatment.

Hepatic lipodosis is a very common condition in medicine, and the use of a classic model of hyperlipidemia induction by taking a high-fat diet, compared to the administration of a monosaccharide, called D(+) galactose, could represent a novelty.

Coenzyme Q10 is an essential molecule for the body, and due to its antioxidant effect, it is used in a lot of scientific research. Histological, bio-molecular and para-clinical tests are modern and up-to-date methods of analysis.

Also, the use of a product based on green barley (natural SOD) is an absolute novelty, being the first time that the potential effect of that supplement on this pathology is investigated.

Location of the experiments:

- Pharmacology Laboratory / FVM Timișoara
- Laboratory of Cell Biology, Histology and Embryology / FVM Timișoara
- Pathological Anatomy Laboratory/ Synevo Vet Bucharest
- Molecular Biology Laboratory/FVM Timișoara.
- Clinical Laboratory of Biochemical Analysis/ F V MTimișoara
- Preclinical studies were carried out in the animal biobase / ULST / Timisoara

Applied methodology

- Histopathological examination performed according to the classical histological technique, hematoxylin-eosin staining methods.
- The paraclinical technique for measuring serum lipid profile, liver enzyme activity and renal function tests was measured with an enzyme kit on a Randox Daytona using an automatic colorimetric method biochemistry analyzer (*Randox, UK*).
- The calibration curve was performed with the Randox level 3 calibration serum (Cat. Not. CAL 2351), and QC charts for reference materials were created using two levels of control serum: Randox Assayed Multisera Level 2 (Cat. Not. HN 1530) and level 3 (Cat. Not. HE 1532).
- The quantification of gene expression was performed by the RT-qPCR method. Each batch of cDNA was analyzed in triplicate. A negative template control (NTC) has been included for each pair of primers. For these analyses, the PowerUp SYBR Green Master Mix kit (Applied Biosystems, ThermoScientific, Austin, TX, USA) and the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Forester, CA, USA) were used.
- Statistical analysis: Graph Pad Prism 6.0 and 9.0 for Windows was used as statistical software (Graph Pad Software San Diego, USA). Media \pm SEM (Standard Error of the Mean) was used to express all data. Bidirectional analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison tests and Bonferroni correction.
- The decision of approval of the Bioethics Commission no. 140/02.11.2022.

The thesis is divided into two major parts:

- Current state of knowledge
- Own research.

General part

Current state of knowledge

This part represents 30% of the thesis, it is structured in 3 chapters that are dedicated to the presentation of aspects related to:

- Gastric ulcer is an exhaustive chapter of scientific information, from specialized literature, which describes the prevalence of gastric ulcers among animals, the cytoarchitecture and anatomy of the stomach in rodents, the patho-physiological mechanisms in the stomach, the etiology of gastric ulcers in animals, murine models of gastric ulcer research, as well as the main molecules used to combat gastric ulcers.
- Hepatic lipidosis. This chapter introduces the pathophysiological mechanisms of lipidosis in the liver, describes the main classes of lipids in the body, as well as the cellular mechanisms that lead to liver damage and non-alcoholic fatty liver disease.
- Phytotherapeutic and biological treatment in gastric ulcer and hepatic lipidosis is information about the plants and products used in the experimental part, Curcuma longa L., Angelica keiskei K and royal jelly in the case of gastric ulcer treatment, such as Coenzyme Q10 and green barley sunshine in the prevention of hepatic lipidosis.

I. Own research

The second part of the doctoral thesis represents 70% of the thesis. It is structured on 5 chapters and the experimental methodology approached in gastric ulcer and hepatic lipidosis, the treatment of these diseases with standardized plant products and biological products, the results of histological studies, biomolecular study, paraclinical analyses and original theories and correlations in the case of interpretations of the results of the analyzes performed are presented.

4. Influence of Curcuma longa L., Angelica keiskei K and Royal Jelly supplements, in the administration of aspirin and omeprazole, on the enzymatic and lipid profile - A murine model.

- The aim of the study was to evaluate the influence of Curcuma longa L, Angelica keiskei K., royal jelly and omeprazole, in the case of hepatic enzyme and lipid profile, compared to aspirin administrations, in mice of the Balb/c line. A mixture of A. keiskei, C. longa and royal jelly was also carried out to see the potentiation potential of these dietary supplements.

Objectives:

- Alleviating the toxicity of anti-inflammatories and their adverse effects by administering biological products.
- Maintenance of liver enzyme parameters and lipid profile within normal reference values.
- To study the interaction and potential therapeutic effect of A. keiskei, C. longa, royal jelly and their association in the case of aspirin-induced liver stress.

Methods used:

The purchase of the A. keiskei powder was made from the "Japan Bio Science" institute, the liposomal complex of C. longa was purchased from Lipolife UK, and the freeze-dried royal jelly was purchased from the "Veceslav Harnas S.A." beekeeping complex, Bucharest. The mice included in the experiment were purchased by the "Cantacuzino" Military Institute in Bucharest.

Aspirin, from the Bayer company, and omeprazole, from Dr. Reddys, were used as drug molecules. The serum collected from the mice was centrifuged and stored at -4 degrees until the samples were processed. The concentrations of triglycerides (TG), cholesterol (CHOL), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were measured with the Randox Daytona Plus automatic biochemistry analyzer (Randox, Crumlin, U.K.), using the appropriate commercial kits (Randox, Crumlin, U.K.).

Calibration was performed with Randox Calibration Serum Level 3 (Cat. No. CAL 2351), and QC charts for reference materials were created using two levels of control serum: Randox Assayed Multisera Level 2 (Cat. Not. HN 1530) and respectively level 3 (Cat. No. HE 1532).

The statistical processing was performed with the statistical software used was Graph Pad Prism 6.0 for Windows (*Graph Pad Software, San Diego, USA*). The values were expressed as an average \pm SEM (*Standard Error of Means*). The estimation of the difference between the groups was established using bidirectional analysis of variance (*ANOVA*) with Tukey's multiple comparison tests. The statistical values were considered as follows: $*0.01 \leq p < 0.05$, significant; $**0.001 \leq p < 0.01$, very significant; $p < 0.001$, significantly very high; NS: It's not significant.

Results:

Aspirin administrations did not influence liver enzymes or the lipid profile in the expressed serum. The administration of Curcuma longa L., Angelica keiskei K. Royal jelly and the association between them did not negatively influence the hepatic or lipid enzyme profile in the blood serum. The administered products could have a hepatoprotective effect, within the framework of short or long-term administrations.

5. Influence of Curcuma longa, Angelica keiskei and Royal Jelly supplements, in the administration of aspirin and omeprazole, on the cytoarchitecture of the stomach, liver, kidney and spleen - A murine model

The aim of the study was to find alternative treatments in gastric ulcers or to improve its progression. Even though the effect of turmeric in various conditions or pathologies has been widely studied, including gastric ulcers, Angelica keiskei or royal jelly have been less approached as potential treatments in this pathology.

So, as there are pertinent scientific claims and curiosities, a mixture of the three products was also made. This potential treatment was approached for the first time in the scientific field and was somehow a "bet", but with a lower stake and scientific significance, which could have scientific results or not, new approaches being encouraged in research, even if they do not end up with adequate results.

Another important point of the experiment was to compare the anti-ulcer properties of turmeric, Angelica keiskei and royal jelly compared to a drug of choice in medicine.

Objectives of the experiment:

- Finding alternative routes of relief or treatment in the case of gastric ulcers.
- Research of the influence of C. longa L., A. keiskei L. and royal jelly in the case of gastric ulcers.
- The potential to alleviate the adverse effects of acetylsalicylic acid, by adding certain phytochemical constituents to its composition.
- Mapping of cytohistological changes in the case of aspirin administration, as well as following the application of phytotherapeutic treatment.

- Enrichment of knowledge in the field, regarding the pathological mechanisms involved in gastric ulcer

Methods used:

The purchase of the *A. keiskei* powder was made from the "Japan Bio Science" institute, the liposomal complex of *C. longa* was purchased from the company Lipolife UK, and the freeze-dried royal jelly was purchased from the beekeeping complex "*Veceslav Harnas S.A.*", Bucharest, Romania.

The mice included in the experiment were purchased by the "Cantacuzino" Military Institute in Bucharest. Aspirin, from the Bayer company, and omeprazole, from Dr. Reddys, were used as drug molecules.

The mice were anesthetized according to national and European normative acts and the following organs were harvested for histological study: stomach, liver, kidneys and spleen. The fragments of stomach, liver, kidneys and spleen were fixed in 80 percent ethyl alcohol for at least 7 days, after which they were washed, dehydrated and included in paraffin. The sections thus prepared were processed for histological study by Hematoxylin-Eosin staining.

Histological images were captured using the Olympus CX41 microscope software.

Results:

Following the analysis of the histological sections at the level of the stomach, the best results are presented in the table below:

T1 (7 days)	Histological changes	T 2 (14 days)	Histological changes
<i>Omeprazole</i>	<i>Slight areas of erosion Inflammatory infiltrate</i>	<i>Curcuma longa /Omeprazole</i>	<i>Peritubular edema (omeprazole)</i>
<i>Curcuma longa</i>	<i>Mild Erosion Areas Vasodilation of blood vessels</i>		<i>Slightly discontinuous monostratified epithelium (Curcuma longa)</i>
<i>Mixed</i>	<i>Mild Erosion Zones Inflammatory Infiltrate</i>	<i>Mixed</i>	<i>Peritubular edema Inflammatory infiltrate</i>
<i>Aspirin/ A. keiskei</i>	<i>Vasodilation of blood vessels (AK only) Peritubular edema Erosion area Inflammatory infiltrate</i>	<i>Aspirin</i>	<i>Monostratified epithelium slightly discontinuous Peritubular edema Inflammatory infiltrate</i>
		<i>A keiskei</i>	<i>Erosion zone Inflammatory infiltrate</i>
<i>6. Royal jelly</i>	<i>Vasodilation of blood vessels Peritubular edema Moderate erosion zone</i>	<i>6. Royal jelly</i>	<i>Areas of severe erosion. Abundant inflammatory infiltrate Severe peritubular edema</i>

The histological sections of the liver showed a mostly normal appearance. At the level of the sections performed from the kidneys, the batches treated with *Angelica keiskei* at 14 days and the batch treated with royal jelly at 7 and 14 days, respectively, showed the presence of a plasma cell leukocyte infiltrate at the level of the renal glomerulus. At the level of the sections made from the spleen, its cytoarchitecture looked normal.

6. Influence of *Curcuma longa*, *Angelica keiskei* and Royal Jelly supplements on inflammation - biomolecular study.

Methods used: the procurement of materials was mentioned earlier.

qPCR reactions for the evaluation of gene expression were performed by the RT-qPCR method.

Each batch of cDNA was analyzed in triplicate. A negative template control (NTC) has been included for each pair of primers. For these analyses, the PowerUp SYBR Green Master Mix kit (*Applied Biosystems, ThermoScientific, Austin, TX, USA*) and the 7500 real-time PCR system (*Applied Biosystems, Forester City, CA, USA*) were used.

The primers used in this study were obtained from the Primer Bank for *Mus musculus* (mouse) (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>).

The primers were synthesized by Eurogentec (*Senraig, Belgium*). GAPDH served as the reference gene for normalization of RT-qPCR reactions.

The statistical processing was performed with the statistical software used was Graph Pad Prism 6.0 for Windows (*Graph Pad Software, San Diego, USA*).

Results:

The administration of *Curcuma longa* L. and omeprazole positively regulates gene expressions in the molecules evaluated in this experiment.

The association between *C. longa*, *A. keiskei* and royal jelly, has an antioxidant potential, as it has a very high gene expression.

Regulation of gene expression of COX 1 and COX 2 showed the most promising results for *C. longa* and Omeprazole.

In the case of NF- κ B-p65, the highest gene value is found in the group treated with *A. keiskei* for 14 days, which shows the presence of the proliferative process. The highest values of the inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α are found in the batches treated with royal jelly and in the case of the Mixed batch.

7. Correlations and hypotheses regarding organ morphology, biomolecular profile in inflammation and para-clinical tests in the case of administration of *Curcuma longa* L., *Angelica keiskei* K., Royal jelly and the association between them in induced gastritis, in the case of the murine model.

Purpose and objectives: of this study are to correlate the results of the research carried out in the first 3 experiments and to try to come to the scientific world with a new mechanism/phenomenon very little described in the literature, regarding the role and involvement of adipocytes in gastric ulcers. Scientific interpretation of the results.

Results:

To propose an original theory about the role of adipocytes involved in the inflammatory process in the case of gastric ulcers. The resistance of adipose tissue in the case of healing processes in inflammation could show that these adipocytes are influenced by inflammatory cytokines.

8. Induction of hepatic lipidosis, administered doses and experimental model - Influence of green barley juice (natural SOD) and Coenzyme Q10 on induced lipidosis in a murine model - Histological aspects

Purpose of the study: to evaluate the efficacy of a high-fat diet and hepatic lipodose-inducing D(+) galactose and their influence on other organs such as the kidney and intestine.

Obiectivele studiului:

To see the potential effects of improving hepatic lipidosis through the administration of Q10 and HFD from a histological point of view. The study included 56 male and female white Wistar rats purchased from the Cantacuzino Military Institute in Bucharest, clinically healthy, with uniform weight (140-160 g), at the age of 10 weeks.

The high-fat diet was prepared by hand, following the recipes found in the literature, but it was slightly modified. The fat, protein, ash and moisture content were analyzed by the international laboratory JS Hamilton, in Poland.

Coenzyme Q10 was purchased from LipoLife Oradea, Romania, under the trade name LLQ10 (*Drakes Lane Industrial Estate, Boreham, UK*) (lot UELE 1707). In the concentration of 4% active substance (where 5 ml of extract contains 200 mg of coenzyme Q10)

Natural green barley juice, antioxidant food supplement, purchased from the National Institute for Medical-Military Research and Development "Cantacuzino" Bucharest, lot 22-43 (22060215 control), a box containing 10 ampoules of 5 ml.

D(+) galactose, was purchased from (*Vita-World, Taunusstein, Germany*), lot 65232. The purity of the product is 99.6%.

The tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin for 48 hours, automatically processed by paraffin inclusion and subsequently sectioned with a thickness of 2 μ m. The sections were stained with hematoxylin-eosin (*ST Infinity H&E Staining kit, Leica Biosystems, Richmond, IL, USA*), using an automatic staining machine (*Gemini AS, Eprexia, Runcorn, UK*).

Modified Gomori Methenamine Silver staining (GMS II kit, Ventana Medical Systems, Tucson, USA) for highlighting fungal organisms was performed using an automatic staining machine (*BenchMark Special Stains, Ventana Medical Systems, Tucson, USA*).

The digital images were obtained by fully scanning the histological slides using the IntelliSite Ultra Fast Scanner (*Philips, Best, The Netherlands*).

The histological preparations were processed within Synevo Vet Bucharest, by the department of pathological anatomy.

Results in macroscopic examinations of organs:

Most signs of the effects of HFD were observed on the liver, in addition to the presence of a large amount of fat, which was clearly observed in the abdominal cavity surrounding all the organs, especially the intestine. Crude examination of the liver showed a yellow discoloration, the presence of yellow spots on the surface of the liver, an increase in liver size, and signs of inflammation were observed compared to that of the normal control group.

The signs were more severe after 16 weeks of treatment. In samples processed in the control group, histological evaluation of the liver by H&E staining showed normal hepatocellular architecture and normal hepatocytes with no signs of damage.

Results in histological examinations:

In the control group, normal hepatocytes are arranged radially in the hepatic cord around the central veins. Hepatocytes have a polygonal appearance. No signs of hepatocellular damage were identified after the period in which the experiment was conducted.

In the case of the D(+) galactose and D(+) galactose + SOD batch, histological sections showed, moderate centrilobular glycogenosis, with the presence of moderate mononuclear peripheral inflammation, installation of a periportal micro and macrovacuolar lipidosi.

Presence of leukocyte and plasma cell infiltrate discreet periportal, reduced glycogenosis, especially periportal, without signs of hepatic steatosis.

The last part of the doctoral thesis is dedicated to the **Final Conclusions** and to revealing the aspects of originality/novelty as well as the guidelines for practitioners in the field.

The most important novelty aspects that emerged from our research were:

- *Novel molecular study, performed on a complex number of genes and associations (COX 1 and 2, IL 2 and 6, TNF-alpha, NF-kb- p65 and p50, SOD).*
- *Study on the effects of Angelica keiskei K. in murine induced gastric ulcer.*
- *Innovative studies on the influences of associations between Curcuma longa L., Angelica keiskei K. and royal jelly in murine induced gastric ulcer*
- *Identification of a new possible mechanism involved in the healing process of murine ulcers.*
- *Administration of D(+) galactose, as a model of hepatic lipidose induction in the murine model.*
- *Design and preparation of a proprietary HFD (High Fat Diet) for the mouse model.*