

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „IULIU HAȚIEGANU”**

**CLUJ-NAPOCA**

**TEZĂ DE ABILITARE**

**FIZIOLOGIE APLICATĂ: MODELE EXPERIMENTALE PENTRU STUDIUL  
UNOR MECANISME DE ACȚIUNE ȘI A EFECTELOR PROTECTOARE ALE  
UNOR COMPUȘI NATURALI ȘI DE SINTEZĂ**

**Prof. Dr. SIMONA CLICHICI**

**2017**

## REZUMAT

În cadrul tezei de abilitare sunt prezentate sintetic cele mai importante realizări științifice, didactice și profesionale ale Prof. Dr. Simona Clichici, obținute după susținerea tezei de doctorat.

Teza de Doctorat „Efectele excesului de glucocorticoizi asupra dezvoltării sistemului nervos”, realizată sub conducerea Prof. Dr. Mircea Dorofteiu, a fost susținută în anul 2004, și a obținut distincția *Cum laudae*. În perioada realizării tezei, am inițiat colaborări extrem de valoroase cu colective de vârf din alte institute și universități, colaborarea și multidisciplinaritatea cercetării fiind pilonii pe care a fost construită întreaga activitate științifică ulterioară. De asemenea, încă din acea perioadă rezultatele obținute au fost publicate în reviste din străinătate, dorința de validare a rezultatelor cercetării în reviste de prestigiu din străinătate fiind un alt obiectiv urmărit în întreaga activitate.

Dezvoltarea activității de cercetare postdoctorală s-a realizat prin implicarea în 9 proiecte de cercetare câștigate în competițiile naționale, dar mai ales prin coordonarea în calitate de Director de Proiect a 2 granturi PNCDI2 (42-112/2008: “Evaluarea și modularea biodistribuției și citotoxicității nanotuburilor de carbon cu aplicații biomedicale”; 12-131/2008: “Sistem expert de prognoză neinvazivă a evoluției hepatopatiilor cronice prin analiza parametrilor biologici și de hemodinamică portală”). Activitatea de cercetare desfășurată în cadrul proiectelor de cercetare și publicarea împreună cu membrii acestora a facilitat stabilirea unor colaborări fructuoase cu colective de cercetători din universități și institute de cercetare din țară și străinătate și continuarea colaborărilor deja existente. Am dobândit experiență în conceperea și validarea de modele experimentale *in vivo* pentru studiul mecanismelor patogenetice implicate în diferite condiții patologice, pentru evaluarea citotoxicității și a stresului oxidativ, a efectelor nanomaterialelor asupra organismelor vii, a terapiei fotodinamice și carcinogeneză, dar și ale efectelor protectoare ale diferiților compuși naturali. Începând din 2007, am dezvoltat și coordonat activitatea de cercetare în cadrul Laboratorului de experimente *in vivo* al Disciplinei de Fiziologie.

Pornind de la temele de cercetare ale celor 2 proiecte pe care le-am coordonat am dezvoltat 2 linii de cercetare majore, una legată de fibroza hepatică, iar cea de a doua urmărind efectele biologice ale diferitelor nanostructuri. Examinările pe care le-am făcut în cadrul cercetărilor au fost realizate în cadrul Laboratorului de Stres Oxidativ al Disciplinei Fiziologie, prin colaborare cu USAMV Cluj-Napoca și INCDTIM Cluj-Napoca, precum și cu Facultăți din cadrul UBB Cluj-Napoca.

Pentru inducerea hepatopatiilor cronice am validat modele experimentale prin administrare de toxic hepatic și prin ligatură de căi biliare.

Unul dintre primele obiective propuse pentru modelul experimental de fibroză hepatică folosind  $\text{CCl}_4$  a fost stabilirea în dinamică a momentului apariției modificărilor la nivel hepatic în corelație cu anumiți parametri plasmatici, neinvazivi. Aceste cercetări s-au încadrat în eforturile realizate în ultimii ani pe plan național și internațional de elaborare a unor noi proceduri care să înlocuiască biopsia hepatică și de găsire a unor markeri neinvazivi de cuantificare a modificărilor incipiente de fibroză hepatică, a evoluției acesteia, dar și de evaluare a efectelor terapiei antifibrotice. Am pus în evidență corelarea nivelului plasmatic al malondialdehidei (MDA), parametru de stres oxidativ, cu apariția și progresia fibrozei hepatice, iar proteinele carbonilate și capacitatea donatorilor de hidrogen au fost identificate ca posibili markeri neinvazivi ai inflamației hepatice. Pe acest model validat am studiat efectul antifibrogenetic al unor compuși naturali (de exemplu Silimarina) în stadiile incipiente și avansate de fibroză hepatică. Am demonstrat că doza uzuală de Silimarină administrată în stadiile incipiente ale modificărilor fibrotice hepatice este în măsură să inhibe mecanismul fibrogenezei și progresiunea fibrozei hepatice, chiar dacă efectul antifibrotic nu reprezintă ținta primară a acestei terapii. De asemenea, am investigat capacitatea Silimarinei de a accelera reversia fibrozei moderate după întreruperea administrării hepatotoxicului, mecanismele fibrogenetice țintite și doza de Silimarină care are cel mai bun efect. Am demonstrat că Silimarina este un candidat important pentru terapia antifibrotică, având capacitatea de a îmbunătăți evoluția fibrozei hepatice și a modificărilor apărute după agresiunea hepatocitelor și care poate interfera cu mecanismele implicate în progresia fibrozei hepatice, dozele mai mari decât cele terapeutice dovedindu-se mai benefice decât cele uzuale.

Pentru ligatura de căi biliare (BDL), în primul rând am pus la punct și validat un astfel de model și am evaluat în dinamică modificările apărute la nivel hepatic. Am demonstrat că BDL determină stres oxidativ sever la 6 zile de la ligatură, iar Chitosanul s-a dovedit foarte eficient în protejarea hepatocitelor față de stresul oxidativ, constatare susținută de modificările histologice.

Un pas foarte important în cercetarea pe care am realizat-o a fost reprezentat de evaluarea ultrasonografică a modificărilor apărute ca urmare a colestazei extrahepatice experimentale, precum și de urmărirea efectelor protectoare ale unor compuși naturali sau de sinteză asupra colestazei experimentale. Am urmărit investigarea efectelor sistemice ale rosuvastatinei (Ro) pe model experimental de colestază la șobolani, prin efectele asupra parametrilor de stres oxidativ în plasmă, ficat, rinichi și creier. Pentru țesutul hepatic, am corelat parametrii stresului oxidativ cu modificările incipiente de inflamație, necroză, fibroză, proliferarea celulelor ductale. Am considerat acest studiu ca fiind un pas crucial în stabilirea potențialului de utilizare terapeutică a Ro în bolile hepatice ce evoluează cu colestază. Am demonstrat că administrarea Ro în stadiile incipiente ale colestazei are efecte benefice, prin scăderea  $\alpha$ -SMA, efect dependent de doza administrată. În același timp, Ro nu a determinat stres oxidativ sistemic și a scăzut parametrii de colestază. Totuși, Ro a crescut hepatocitoliza, stresul oxidativ și inflamația în ficat, menținând un nivel crescut al citokinei profibrotice TGF- $\beta$ 1, ca și un număr crescut de celule proliferate în ducte și parenchim. Ca o particularitate, am demonstrat că Ro inhibă inducerea și activarea NF-kB, rezultat care ar putea fi benefic.

Continuând evaluarea ultrasonografică a modificărilor obținute în hepatopatiile experimentale, am realizat elastografie în timp real pentru evaluarea modificărilor apărute în condițiile colestazei extrahepatice prin ligatura de cale biliară la animale de experiență, un rezultat de pionierat în cercetarea experimentală. De asemenea, am inițiat un program de modelare matematică a unor parametrii neinvazivi de prognostic a evoluției hepatopatiilor cronice.

A doua direcție a cercetărilor realizate s-a axat pe modele experimentale pentru studiul interacțiunii organismului viu cu anumite nanostructuri, metale, produși naturali sau combinații ale acestora. Cercetările realizate s-au concentrat în primul rând asupra

nanotuburilor de carbon, urmărind o abordare integrată a evaluării citotoxicității și biodistribuției acestora. Am testat și modulat multipli parametri cu impact potențial ai nanotuburilor de carbon cu unul (SWCNT) sau mai mulți pereți (MWCNT) la nivel celular, molecular și macro-organic: puritate, spectru de diametre, doză, concentrație, respectiv imunocompetența organismului țintă. Parametrii menționați au fost evaluați *in vitro*, și ulterior *in vivo* din punct de vedere al stresului oxidativ, reacției inflamatorii, modificărilor histologice și viabilității celulare. Rezultatele obținute au arătat faptul că administrarea ip de ss-DNA-SWCNTs determină producerea de stres oxidativ tranzitor, precum și modificări inflamatorii tranzitorii. Am acordat un interes deosebit impactului pe care nanotuburile de carbon, administrate intraperitoneal, îl au asupra splinei și într-o anumită măsură asupra sistemului imun. Studiile realizate au evidențiat acumularea progresivă a MWCNT la nivel splenic, cu un vârf de concentrație la 48 de ore după administrare. Vehicularea ss-ADN-MWCNT spre splină se realizează prin circulația sanguină sau direct prin capsula organului la nivelul hilului splenic. Principala modificare histologică a fost hiperplazia limfoidă, marcată în special de hiperplazia centrilor germinativi foliculari. De asemenea, administrarea intraperitoneală a ss-ADN-MWCNT a crescut numărul de celule ce intră în apoptoză la nivel splenic, aspect însă acoperit de intensificarea paralelă a activității mitotice la nivelul pulpei albe.

Rezultatele cercetărilor au fost publicate în extenso în reviste indexate ISI sau BDI (67), dintre care 18 ISI ca autor principal și 30 ca și coautor de la susținerea doctoratului, în volumele unor manifestări internaționale și naționale (33) sau în reviste de circulație națională recunoscute. Am coordonat 16 lucrări de licență. Am mentorat 2 studenți și 3 cadre didactice în cadrul proiectelor interne de cercetare ale Universității, proiecte ce au dus la dezvoltarea studiilor pe organ izolat, a liniei de teste comportamentale și s-au finalizat cu publicații în reviste ISI. Am publicat 4 cărți, 4 capitole în volume colective, din care 3 la o editură internațională, am depus și obținut trei brevete OSIM și am obținut numeroase premii la manifestări științifice naționale și internaționale (27). Sunt membru fondator și vicepreședinte al ASOM - Asociația Stresul Oxidativ în Medicină și BIOCOM - Centru de Cercetare în Domeniul Biocompatibilității Produsilor Naturali și de Sinteză și în 2008 – 2012 secretar general al Societății Române de Fiziologie – Physiology.

Factorul de impact cumulativ ca autor principal este de 32,969 iar indicele Hirsch în ISI Web Core Collection este 11 (16 în Google academic), cu un număr total de citări ISI + BDI de 633. Dintre articolele publicate ca autor principal, 4 sunt în cuartila Q1, iar 5 în Q2.

Pe baza experienței științifice pe care am acumulat-o în ultimii ani, voi dezvolta câteva direcții principale în activitatea de cercetare viitoare. Voi continua studiile în domeniul fibrozei hepatice și a dezvoltării de strategii antifibrotice, precum și pentru utilizarea produșilor naturali și a nanomaterialelor, în special pentru dezvoltarea de terapii preventive, posibil țintite spre inhibarea celulelor stelate hepatice. Coordonarea de echipe de cercetare multidisciplinare, în care tinerii cercetători să fie angrenați și formați va fi unul dintre obiectivele cheie, ce va contribui la dezvoltarea Departamentului de Științe Funcționale. În activitatea didactică, voi contribui la dezvoltarea unui învățământ modern de fiziologie, orientat spre cerințele practicii medicale, care să răspundă nevoilor studenților, dar și ale masteranzilor și doctoranzilor, ducând la integrarea fiziologiei în dezvoltarea competențelor clinice ale viitorilor medici.

## SUMMARY

Within the habilitation thesis, the most important scientific, didactic and professional achievements of Prof. Dr. Simona Clichici, which are obtained after defending the doctoral thesis, are synthetically presented.

The Ph.D. Thesis "The effects of the glucocorticoid excess on the nervous system development", conducted under the leadership of Prof. Dr. Mircea Dorofteiu, was defended in 2004 and obtained the distinction *Cum laudae*. During the elaboration of the thesis, the author initiated extremely valuable collaborations with leading collectives from other institutes and universities, the collaboration and the multidisciplinary of the research being the pillars on which all the subsequent scientific activity was built. Also, since that time, the obtained results have been published in foreign journals, the desire to validate the results of the research in prestigious journals from abroad being another objective pursued throughout the whole activity. The development of the postdoctoral research activity was accomplished through the involvement in 9 research projects won in the national competitions, but mainly through the coordination as Project Manager of 2 grants PNCDI2 (42-112/2008: "The evaluation and modulation of the biodistribution and the cytotoxicity of carbon nanotubes with biomedical applications ", 12-131/2008:" Expert system of non-invasive prognosis in the evolution of chronic hepatopathies through the analysis of the biological parameters and portal hemodynamics "). The research activity carried out within the research projects and the publication together with their members facilitated the establishment of fruitful collaborations with collectives of researchers from universities and research institutes in the country and abroad and the continuation of the already existing collaborations. I have gained experience in the design and validation of *in vivo* experimental models for the study of pathogenetic mechanisms involved in various pathological conditions, for the evaluation of cytotoxicity and of oxidative stress, of the effects of nanomaterials on the living organisms, of photodynamic therapy and carcinogenesis, but also of the protective effects of various natural compounds. Since 2007, I have developed and coordinated the research activity within the *in vivo* Experiment laboratory of the Physiology Discipline.

Starting from the research themes of the two projects I coordinated, I developed 2 major research lines, one related to hepatic fibrosis, and the second one looking at the biological

effects of different nanostructures. The examinations I made in the research were carried out within the Oxidative Stress Laboratory of the Physiology Discipline, in collaboration with USAMV Cluj-Napoca and INCDTIM Cluj-Napoca, as well as with faculties within UBB Cluj-Napoca.

For the induction of chronic hepatopathies I validated experimental models by administering a hepatotoxic substance and by the bile duct ligation.

One of the first objectives I proposed for the experimental model of hepatic fibrosis using CCl<sub>4</sub> was the determination in dynamics of the moment when the changes appeared in the liver in correlation with certain non-invasive plasma parameters. This research was part of the efforts made in recent years to develop new procedures, meant to replace liver biopsy and to find non-invasive markers to quantify the early changes in fibrosis, its evolution, and to evaluate the effects of antifibrotic therapy. I highlighted the correlation of the plasmatic level of malondialdehyde (MDA), an oxidative stress parameter with the appearance and progression of hepatic fibrosis, and the carbonylated proteins and the capacity of hydrogen donors were identified as potential non-invasive markers of hepatic inflammation. On this validated model I studied the antifibrogenic effect of some natural compounds (for example Silimarin) in early and advanced stages of hepatic fibrosis. I proved that the usual dose of Silimarin administered at the early stages of hepatic fibrotic changes is able to inhibit the mechanism of fibrogenesis and the progression of hepatic fibrosis, even if the antifibrotic effect is not the primary target of this therapy. I also investigated the ability of Silimarin to accelerate the reversion of moderate fibrosis after the interruption of the hepatotoxin administration, targeted fibrogenic mechanisms and the Silimarin dose that has the best effect. I proved that Silimarin is an important candidate for the antifibrotic therapy, having the ability to improve the evolution of hepatic fibrosis and the changes appeared after the aggression of hepatocytes, and may interfere with the mechanisms involved in the progression of hepatic fibrosis, the higher doses than the therapeutic ones proving to be more beneficial than the usual ones.

For the bile duct ligation (BDL) I first developed and I validated such a model and I evaluated in dynamics the changes appeared in the liver. I demonstrated that BDL causes severe oxidative stress 6 days after the ligation and the Chitosan proved highly effective in



protecting the hepatocytes from the oxidative stress, an ascertainment sustained by the histological changes.

A very important step in the research I conducted was the ultrasonographic evaluation of the changes resulting from the experimental extrahepatic cholestasis, as well as the monitoring of the protective effects of some natural or synthetic compounds on the experimental cholestasis. I followed the investigation of the systemic effects of rosuvastatin (Ro) on the experimental cholestatic model in rats, by the effects on oxidative stress parameters in plasma, liver, kidney and brain. For the hepatic tissue, I correlated the parameters of oxidative stress with the incipient modifications in inflammation, necrosis, fibrosis, ductal cell proliferation. I consider this study as being a crucial step in establishing the potential of the therapeutic use of Ro in liver diseases that evolve with cholestasis. I have proven that administering Ro in the early stages of cholestasis has beneficial effects by lowering  $\alpha$ -SMA, an effect dependent on the administered dose. At the same time, Ro did not cause systemic oxidative stress and decreased the cholestasis parameters. However, Ro increased the hepatocytolysis, the oxidative stress and the inflammation in the liver, maintaining an increased level of TGF- $\beta$ 1 profibrotic cytokine, as well as an increased number of cells proliferated in ducts and parenchyma. As a peculiarity, I have demonstrated that Ro inhibits the induction and the activation of NF- $\kappa$ B, which may have a beneficial effect.

Continuing the ultrasonographic evaluation of the changes obtained in experimental hepatopathies, I performed real-time elastography for the evaluation of the changes appeared under the extrahepatic cholestasis through the bile duct ligation in experimental animals, a pioneering result in experimental research. I also initiated a mathematical modeling program of some non-invasive prognostic parameters of the evolution of chronic hepatopathies.

The second direction of the research focused on experimental models for the study of the interaction of the living organism with certain nanostructures, metals, natural products or combinations of these. The research carried out focused primarily on carbon nanotubes, pursuing an integrated approach to assessing the cytotoxicity and biodistribution of carbon nanotubes. I tested and modulated multiple parameters with potential impact of carbon nanotubes with one (SWCNT) or more walls (MWCNT) at the cellular, molecular and macro-organic level: purity, diameter spectrum, dose, concentration, respectively the

immunocompetence of the target organism. The mentioned parameters were evaluated *in vitro* and subsequently *in vivo* from the point of view of oxidative stress, inflammatory response, histological changes and cell viability. The results obtained show that ip administration of ss-DNA-SWCNTs determines the production of transient oxidative stress as well as transient inflammatory changes. I have been particularly interested in the impact that the carbon nanotubes, intraperitoneally administered, have on the spleen and to some extent on the immune system. The studies carried out showed the progressive accumulation of MWCNT at the splenic level, with a peak concentration 48 hours after the administration. The transport of ss-DNA-MWCNT to the spleen is achieved through blood circulation or directly through the capsule of the organ at the level of the splenic hilum. The main histological modification was the lymphoid hyperplasia, marked especially by the hyperplasia of the follicular germinal centers. Also, the intraperitoneal administration of ss-DNA-MWCNT increased the number of cells entering apoptosis at the splenic level, but this aspect was covered by the parallel intensification of the mitotic activity at the level of the white pulp.

The results of the research have been published in extenso in ISI or BDI indexed journals (68), out of which 18 ISI as lead author and 44 as co-author since defending the Ph.D. thesis, in the volumes of some international and national conferences (33) or in prestigious national journals. I coordinated 16 graduation theses. I mentored 2 students and 3 teaching staff within the internal research projects of the University, projects that led to the development of the studies on the isolated organ, of the behavioural testing line and finalized with publications in ISI journals. I published 4 books, 4 chapters in collective volumes, 3 of which in an international publishing house, I handed in three patents at OSIM and I obtained numerous national and international awards. I am a founding member and vice-president of ASOM - Oxidative Stress Association in Medicine and BIOCROM - Research Center in the Biocompatibility of the Natural and Synthetic Products and between 2008 - 2012 I was general secretary of the Romanian Society of Physiology.

The factor of cumulative impact as lead author is 32,969 and the Hirsch index in the ISI Web Core Collection is 11 (16 in Google Academic), with a total number of ISI + BDI of

630 citations. Of the articles published as lead author, 4 are in Q1 quartile and 5 in Q2 quartile.

Based on the scientific experience accumulated in recent years, the development of the scientific career will be oriented towards the continuation of the studies in the field of hepatic fibrosis and the development of antifibrotic strategies, as well as towards the use of natural products and nanomaterials, especially for the development of preventive therapies, possibly aimed at inhibiting hepatic stellate cells. The coordination of multidisciplinary research teams, in which young researchers will be involved and trained, will be one of the key objectives that will contribute to the development of the Department of Functional Sciences. In the didactic activity, the development of a modern education in physiology, dedicated to students, but also to master and Ph.D. students, will contribute to the integration of physiology in the development of the clinical skills of the future doctors.