

Raport științific și tehnic

Etapa de execuție nr. 2 / 2023

Contract nr.: 649PED/2022

Etapa nr. II/2023: Testarea metodei BIOHIS pe fibroblaste, animale de laborator și subiecți umani

Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2021-2146

Titlul proiectului: Metoda combinată bazată pe imagistică hiperspectrală și investigații biologice de evaluare a efectelor unor factori naturali terapeutici în afecțiuni din sfera patologiei Neuro-Mio-Artro-Kinetice (BIOHIS)

- Descrierea științifică cu punerea în evidență a rezultatelor etapei anuale și gradul de realizare a obiectivelor;

Metoda BIOHIS, dezvoltată în cadrul etapei 1 a proiectului, este o metoda dedicată evaluării eficacității terapeutice a unor factori terapeutici naturali (ex. nămolul sau apele minerale sulfuroase naturale) asupra diferitelor patologii Neuro-/Myo-/Artro-/Kinetice (NMAK).

Etapa 2 din cadrul proiectului BIOHIS are ca obiectiv principal testarea metodei BIOHIS pe culturi de celule - fibroblaste, animale de laborator și subiecți umani pentru a ne asigura că: (i) rezultatele sunt fezabile și utile din punct de vedere medical. Rezultatele așteptate sunt: 1) date biologice la nivel celular, molecular și sistemic pe animale de laborator și subiecți umani privind efectele nămolului și apelor minerale sulfuroase, având în acest fel argumente științifice pentru utilizarea medicală a acestora; 2) metodologia inducerii experimentale de patologii NMAK la animale de laborator.

Pentru realizarea acestui obiectiv, Liderul și Partenerul 2 au desfășurat studii la nivel celular, animale de laborator și subiecți umani, iar Partenerul P1 a efectuat studii privind modificările structurale și de compoziție chimică induse de factorii terapeutici naturali la nivel celular, tisular și de organ utilizând tehnica de imagistică hiperspectrală. În acest scop, au fost achiziționate imagini hiperspectrale în condiții de laborator (celule și animale de laborator) și în aplicații clinice (subiecți umani). Imaginile hiperspectrale au fost ulterior procesate pentru eliminarea zgomotului din datele experimentale și analizate utilizând metode de tip „machine learning” și modele analitice.

Raportul științific abordează studiile de farmacologie pre-clinice pentru cercetarea și verificarea efectului terapeutic al nămolului și al apei lacului Techirghiol, cu o atenție particulară acordată justificării cercetării în acest domeniu.

În ultimele decenii, medicina contemporană a reevaluat și a integrat resurse naturale tradiționale în tratamentele moderne, într-o încercare de a combina cele două orientări: inovații tehnologice și terapeutice bazate pe dovezi, împreună cu abordări naturiste și holistice. Această sinteză are potențialul de a oferi soluții mai eficiente și mai puțin invazive pentru o varietate de afecțiuni. În acest context, nămolul terapeutic, cunoscut și sub denumirea de peloid, a captat atenția cercetătorilor și practicienilor datorită proprietăților sale unice și a aplicațiilor sale diverse în medicina balneară.

Nămolul terapeutic, sau peloidul, este o substanță naturală formată dintr-un amestec de apă minerală și materiale solide (de exemplu, argilă, turba sau materie organică). Acesta se formează în mod natural în diferite medii, de la izvoare minerale la lacuri sărate și mlaștini. Caracteristica distinctivă a nămolului este compoziția sa bogată în minerale, oligoelemente, compuși organici și, uneori, microorganisme, toate având potențiale efecte terapeutice.

Tradițional, nămolul a fost utilizat în numeroase culturi, încă din antichitate, pentru proprietățile sale antiinflamatorii, analgezice și de îmbunătățire a circulației sanguine. În medicina balneară, aplicațiile externe ale nămolului au fost folosite pentru a trata afecțiuni ale pielii, boli reumatice și diverse alte afecțiuni musculo-scheletice. Acesta a fost, de asemenea, recunoscut pentru efectele sale de relaxare și de îmbunătățire a stării generale de bine.

Deși utilizările tradiționale ale nămolului terapeutic sunt bine stabilite, există un potențial semnificativ neexplorat în aplicațiile sale în medicina modernă. Studiile recente încep să dezvăluie modul în care compușii bioactivi din nămol pot interacționa la nivel celular și molecular, oferind

noi perspective asupra mecanismelor prin care nămolul exercită efectele sale terapeutice.

O abordare riguroasă, științifică, este esențială pentru a valida și extinde aplicațiile nămolului în medicina contemporană. Studiile preclinice și clinice pot oferi dovezi robuste privind eficacitatea și siguranța utilizării nămolului, precum și pentru a identifica noi aplicații terapeutice. Acesta include, de exemplu, explorarea potențialului său în ameliorarea simptomelor afecțiunilor cronice, în îmbunătățirea funcțiilor imune și în promovarea regenerării țesuturilor.

Pe măsură ce cercetările progresează, există oportunități semnificative de a integra nămolul în abordări terapeutice mai largi. Acest lucru ar putea include utilizarea sa ca adjuvant în tratamentele convenționale, în programe de recuperare și reabilitare, sau ca parte a unor strategii de wellness și prevenție.

Prin urmare, nămolul terapeutic reprezintă un exemplu elocvent al modului în care resursele naturale pot fi reevaluate și integrate în medicina modernă, oferind oportunități unice pentru tratamente inovatoare și îmbunătățirea calității vieții pacienților. Această reevaluare nu doar că aduce în prim-plan valoarea terapeutică a nămolului, dar contribuie și la un dialog mai larg despre rolul și importanța medicinei naturiste în cadrul sistemului de sănătate contemporan.

S-au urmărit efectele biologice ale apei și nămolului asupra animalelor experimentale atât prin analiza **probelor biologice de sânge și de urină**, cât și asupra **fibroblastelor** obținute din organismul animal prin realizarea de culturi celulare. De asemenea au fost analizate și observate periodic semnele vizibile de toxicitate (modificarea aspectului, funcțiilor vitale, a comportamentului, modificări de piele, blană, mucoase, tulburări respiratorii, tulburări de mers, postură sau răspuns, convulsii tonice sau clonice) sau mortalitatea.

1. Selectarea grupelor experimentale și organizarea activităților experimentale.

Experimentele au fost efectuate pe animale experimentale din loturile de șobolani Wistar crescute în condiții standard (Figura 1), în Biobază, în conformitate cu legislația în vigoare, după cum urmează:

- în cuști, în grupe de câte 6 animale, astfel încât să fie posibilă observarea fiecărui animal;
- temperatura 21- 22°C;
- umiditate: minim 30 % - maxim 70%;
- ciclu circadian de 12 ore lumina și 12 ore întuneric;
- dieta convențională sau specificată pentru lot.

Au fost selectate animale de laborator (un număr egal de masculi și femele) de aceeași vârstă inițială (~20 săptămâni), cu o greutate medie de $\sim 150 \pm 10\%$:

- 42 șobolani Wistar (tineret), din care:
 - ✓ 10 pui șobolani Wistar (varsta maxim 4 zile)
 - ✓ Cazare și întreținere 20 șobolani Wistar pentru maxim 14 zile
- Aplicare 1 baie/zi pentru 20 șobolani
- Recoltare probe de sânge de la 20 șobolani

Experimentele au fost efectuate pe animale experimentale din loturile de șobolani Wistar crescute în condiții standard de biobază.

Vor fi selectate 32 animale de laborator (un număr egal de masculi și femele) de aceeași vârstă inițială, cu o greutate medie de $\sim 150 \pm 10\%$.

Obiectivul serviciilor: testare in vitro și in vivo a unor extracte de namol și ape minerale sulfuroase utilizate în balneoterapie.

Activitate de testare in vitro și in vivo se va realiza în prezența unui cercetător din partea beneficiarului. Protocolul experimental propus este conceput pentru a testa efectele in vitro și in vivo ale unor extracte de namol și ape minerale sulfuroase utilizate în balneoterapie.

Experimentele vor fi efectuate pe 20 de șobolani Wistar, împărțiți în două grupuri: un grup de control și un grup experimental. Protocolul constă în următoarele etape:

Selectarea animalelor:

4 șobolani din lotul selectat vor fi desemnați ca grup de control.

16 șobolani vor constitui grupul experimental astfel:

- 8 șobolani - Lot îmbaiere ape minerale – 15 minute zilnic.
- 8 șobolani - Lot tratament cu namol – împachetare timp de 15 minute zilnic cu namol.

Monitorizarea animalelor: Greutatea și starea generală a șobolanilor vor fi monitorizate în mod regulat pe durata experimentului.



Desfășurarea tratamentelor cu apa minerala și namol din lacul Techirghiol
Baie de namol



Baie cu apa de lac / apa simpla



Figura 1. Loturile de animale experimentale – Wistar rats

2. Analiza parametrilor de sânge

La toate loturile de animale experimentale funcțiile vitale au fost în limite normale. Nu s-au observat diferențe de comportament, modificări ale tegumentului etc. Nu au fost înregistrate cazuri de mortalitate.

După terminarea tratamentului cu apă, pentru prelevarea probelor de sânge, animalele au fost sacrificate pentru recoltarea probelor biologice. Sângele integral a fost recoltat în condiții optime și corespunzătoare dozării parametrilor de biochimie în eprubete de biochimie (dop rosu, pe clot activator)



Figura 2. Etape ale activității experimentale

Din ser au fost dozați următorii parametrii biochimici: Creatinina, Glucoza, Colesterol, HDL Colesterol, LDL Colesterol, Trigliceride, Proteine totale

Fiziologia celulară își are fundamentul în exprimarea proteinelor celulare și astfel este motivată încercarea de a stabili modul în care această arhitectură este schimbată prin tratamentul celulelor cu noile produse. Potrivirea profilului electroforetic aduce un argument puternic că o cultură de celule tratate într-un anumit mod, are condiții vitale similare și implică procese fiziologice de același nivel (15).

Electroforeza este o metodă analitică și preparativă de separare a particulelor și agregatelor de particule încărcate electric sub acțiunea unui câmp electric uniform aplicat din exterior. Metoda se bazează pe fenomenul fizico-chimic de deplasare sau migrare diferențială a diferitelor particule într-un câmp electric (Popescu, 1990).

Testul MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) este un test de viabilitate celulară care se bazează pe capacitatea mitocondriilor celulelor vii de a reduce sărurile de tetrazoliu în compuși de formazan de culoare albastru-închis. Această reacție se produce numai în celule vii, astfel că intensitatea colorării este direct proporțională cu numărul de celule viabile.

Pentru a efectua acest test în cultura de fibroblaste primare, sunt urmați acești pași:

Însămânțarea celulelor: Însămânțați celulele în plăci de 48 de godeuri, cu 10.000 de celule per godeu, în mediu DMEM F12/HAM complet.

Inocularea celulelor: Lăsați celulele să crească în incubator până ating o confluință de aproximativ 80%.

Adăugarea MTT: Adăugați soluția MTT în mediul de cultură (de obicei la o concentrație finală de 0.5 mg/ml) și lăsați celulele în incubator pentru 2-4 ore. În timpul acestui timp, MTT-ul va fi redus de celulele vii în formazan.

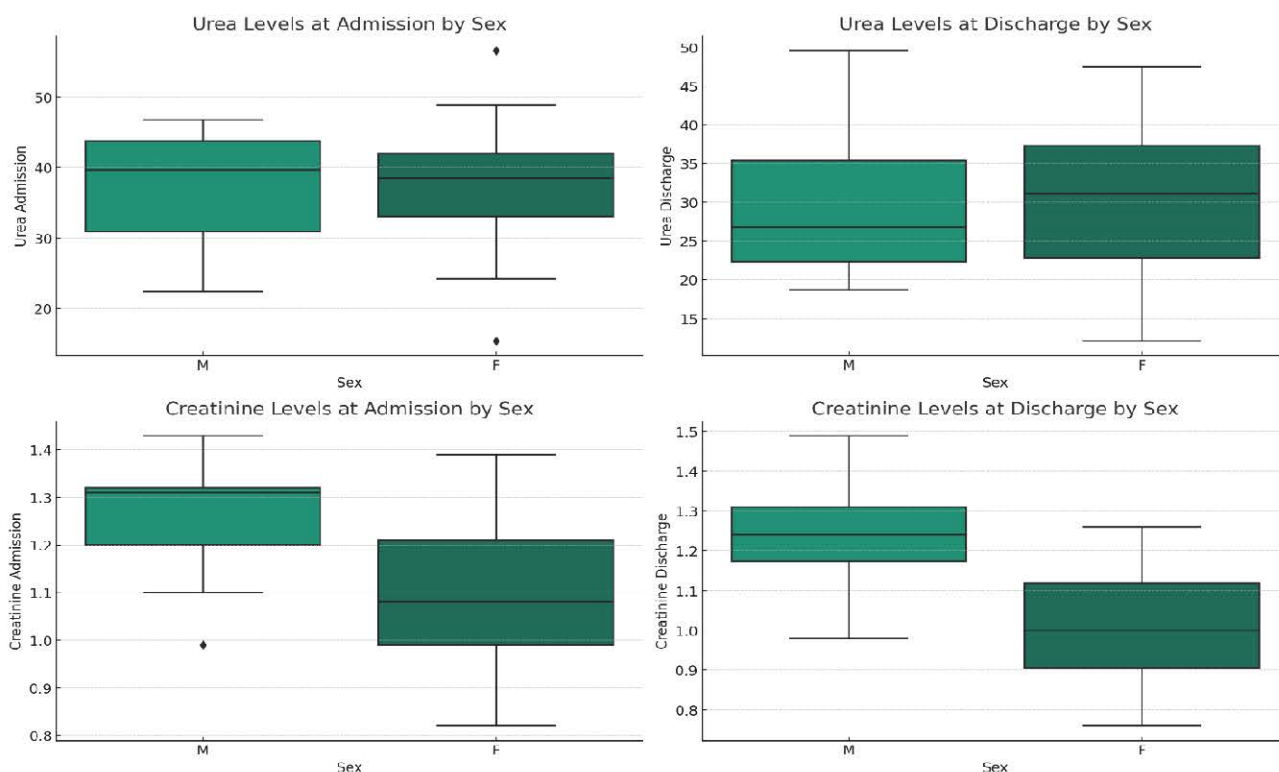
Dizolvarea formazanului: Îndepărtați soluția MTT de pe celule și adăugați un solvent (de obicei DMSO sau etanol) pentru a dizolva cristalele de formazan.

Măsurarea absorbției: Folosiți un spectofotometru pentru a măsura absorbția la o lungime de undă de 570 nm. Intensitatea culorii va fi direct proporțională cu numărul de celule viabile.

Acest test este simplu de realizat și oferă rezultate rapid. Cu toate acestea, este important să rețineți că el măsoară numai celulele vii și nu poate distinge între celulele în diferite stadii ale morții celulare (necroză sau apoptoză).

		LOMBARA CU RADICULOP L5 STG, SPONDILARTR OZA CERV								
--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--

Analize Grafice



1. Nivelurile de Uree la Internare și Externare în Funcție de Sex: Aceste diagrame arată distribuția nivelurilor de uree la internare și externare pentru bărbați și femei.
2. Nivelurile de Creatinină la Internare și Externare în Funcție de Sex: Diagramele prezintă distribuția nivelurilor de creatinină pentru bărbați și femei.

Concluzii și Recomandări

Datele clinice reflectă o populație de pacienți cu boli articulare degenerative legate de vârstă, gestionată cu o combinație de medicație, terapie fizică și monitorizarea markerilor biochimici cheie. Recomandările includ monitorizarea regulată a funcțiilor renale și hepatice, planuri de tratament personalizate și modificări ale stilului de viață.

- ✓ Site-ul web al proiectului : <https://biohis.projects.umfiasi.ro/>

Indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor

Rezultatele preliminare obținute în cadrul acestei faze a proiectului au fost diseminate prin: 3 articole științifice cotate ISI și 4 prezentări orale / poster la conferințe:

- Articol ISI:

1.	Munteanu C., Onose G., Turnea M. A., Rotariu, M. Cellular and Molecular Homeostatic Microenvironmental imbalances in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. Balneo and PRM Research Journal, DOI: 10.12680/balneo.2023.564, IF: 1.5, http://bioclima.ro/Balneo564.pdf
2.	Munteanu, C.; Călin, M.A.; Manea, D.; Popescu, C.; Iliescu, M., Stanciu, L.; Minea, M.; Oprea, C.; Oprea, D.; Rotariu, M.; Onose, G. - Current data regarding homeostasis of tissues oxygenation in pathophysiological and therapeutic circumstances. Balneo and PRM Research Journal, DOI: 10.12680/balneo.2023.565, IF: 1.5, http://bioclima.ro/Balneo565.pdf
3.	Munteanu C. - Hydrogen Sulfide and Oxygen Homeostasis in Atherosclerosis: A Systematic Review from Molecular Biology to Therapeutic Perspectives. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(9):8376. https://doi.org/10.3390/ijms24098376 , Impact Factor: 6.208

- Prezentări orale și postere la conferințe

1	Munteanu Constantin - „Hydrogen sulfide (H ₂ S) - therapeutic relevance in Diabetes and Obesity” - SICEM2023_PF0098;	2023	Poster	SICEM 2023
2	Munteanu Constantin - „Cellular stress investigations and homeostasis mechanisms on fibroblast cultures regarding Hydrogen sulfide (H ₂ S) used as a natural therapeutic factor in the Neuro-Myo-Arthro-Kinetic (NMAK) pathology.” - P-T11L-0059	2023	Poster	FA OPS 2023
3	Călin Mihaela Antonina - Spectral characterization and detection of skin tumors based on hyperspectral imaging	2023	Prezentare Orale	RAP 2023
4	Manea Dragoș - Mapping the melanin concentration distribution in common nevus using hyperspectral imaging as prognostic diagnosis	2023	Prezentare Orale	RAP 2023

- Rezumat executiv al activităților realizate în perioada de implementare.

Etapă 2 - Testarea metodei BIOHIS pe celule fibroblaste, animale de laborator și subiecți umani pentru a se asigura că rezultatele sunt fezabile și utile din punct de vedere medical.	Rezultatele așteptate: 1) date biologice la nivel celular, molecular și sistemic asupra animalelor de laborator și subiecților umani privind efectele nămolului și apelor minerale sulfuroase, având în acest fel argumente științifice pentru utilizarea medicală a acestora; 2) metodologia indusă experimental de patologii neuro-/mio-/artro-/cinetice la animale de laborator. WP2 va fi axat pe realizarea de culturi celulare, inducerea patologiilor animale, necesare pentru testarea metodei, constituirea grupelor de studiu, prepararea soluțiilor factorilor de mediu, aplicarea metodelor biologice de analiză, achiziția de imagini hiperspectrale ale celulelor și animalelor expuse la diverși factori terapeutici de mediu și stocarea lor într-o bază de date, prelucrarea și analiza corespunzătoare a imaginilor hiperspectrale pentru a evidenția efectele factorilor de mediu la nivel celular și tisular, și evaluarea rezultatelor din perspectivă biologică și medicală.
Act 2.1 - Testarea metodei BIOHIS pe culturi de fibroblaste primare.	
Act 2.2 - Testarea metodei BIOHIS privind efectele fiziologice și fiziopatologice ale nămolului terapeutic și apelor minerale sulfuroase asupra animalelor de laborator.	
Act 2.3 - Testarea metodei BIOHIS atât pe voluntari sănătoși, cât și pe pacienți cu patologie Neuro-/Myo-/Arthro-/Kinetică	

Livrabilele etapei 2

- *Culturi celulare - raport științific al datelor biologice metoda BIOHIS (D2.1)*
- *Culturi celulare Raport de testare HSI (D2.2)*
- *Animale de laborator - Raport științific de date biologice metoda BIOHIS (D2.3)*
- *Raport de testare HSI pe animale de laborator (D2.4)*
- *Subiecți umani - raport clinic metoda BIOHIS (D2.5)*
- *Subiecți umani metoda BIOHIS Raport de testare HSI (D2.6)*

Prin activitățile realizate și livrabilele elaborate în cadrul acestei etape a proiectului s-a atins stadiul planificat (pana la aceasta data) de realizare a obiectivului specific acestei etape, ceea ce va permite în continuare atingerea obiectivelor specifice ale acestui proiect, așa cum sunt menționate în proiectul inițial.

Director de proiect
Dr. Constantin Munteanu

