

ȘCOALA DOCTORALĂ

---

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

# Nanomateriale cu efect protector pentru modificările locale și sistemice din fibroza hepatică experimentală

---

Doctorand **Dalina Diana Zugravu (Pop)**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Simona Valeria Clichici**

---



## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>17</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>19</b>
<b>Capitolul 1: Fibroza hepatică</b>	<b>21</b>
1.1 Definiție și clasificare	21
1.2 Epidemiologia fibrozei hepatice	21
1.3 Etiologia și factorii de risc	22
1.4 Patogeneza fibrozei hepatice	22
1.5 Diagnosticul fibrozei hepatice	22
1.5.1 Metode invazive	29
1.5.2 Biomarkeri și imagistică medicală	30
1.6 Tratatamentul fibrozei hepatice	32
1.6.1 Tratamente farmacologice	32
1.6.2 Terapii experimentale și inovative	34
<b>Capitolul 2: Nanomateriale în medicină</b>	<b>37</b>
2.1 Introducere	37
2.1. Definiție, clasificare și proprietăți	37
2.2 Aplicații ale Nanomaterialelor în Medicină	38
2.2.1 Livrarea Controlată a Medicamentelor	39
2.2.2 Terapii Genice și Celulare	40
<b>Capitolul 3: Nanomaterialele și fibroza hepatică</b>	<b>43</b>
3.1 Livrarea medicamentelor	43
3.1.1 Modificări la nivel celular și molecular	43
3.1.2 Efectele asupra inflamației și regenerării tisulare	43
3.2 Studii preclinice și clinice privind utilizarea nanomaterialelor	44
3.2.1 Modele experimentale de fibroză hepatică	44
3.2.2 Eficacitatea și siguranța nanomaterialelor	45
3.3 Avantajele și limitările utilizării nanomaterialelor	45
3.3.1 Biodistribuție și biocompatibilitate	45
3.3.2 Toxicitatea și efectele adverse	46
3.4 Perspective viitoare și direcții de cercetare	46
3.4.1 Dezvoltarea nanomaterialelor de generație nouă	46
3.4.2 Integrarea cu alte terapii și tehnologii avansate	46
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>49</b>
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	<b>51</b>
<b>2. Studiul 1. Nanoparticule de aur fitoreduse cu compuși naturali: comportamentul în tractul gastrointestinal.</b>	<b>53</b>
2.1 Introducere	53
2.2 Obiective	57
2.3 Material și metode	58
2.4 Rezultate	60
2.5 Discuții	67
2.6 Concluzii	71
<b>3. Studiul 2. Modificări hepatice în urma unei diete bogate în grăsimi: efectele Cornus mas și ale nanoparticulelor de aur fitoreduse cu Cornus mas asupra stresului oxidativ, inflamației și leziunilor histologice</b>	<b>73</b>
3.1. Introducere	73
3.2 Obiective	75

3.3 Material și metode	76
3.4 Rezultate	79
3.5. Discuții	97
3.6. Concluzii	101
<b>4. Studiul 3. Efectele Protectoare și Regenerative ale Nanoparticulelor de Aur Fitoreduse cu Cornus mas și ale Silimarinei asupra Leziunilor Hepatice Induse de Tioacetamidă: Evaluarea Potențialului Terapeutic</b>	<b>103</b>
4.1. Introducere	103
4.2 Obiective	108
4.3 Materiale și metode	108
4.4 Rezultate	110
4.5 Discuții	123
4.6 Concluzii	130
<b>5. Concluzii generale</b>	<b>131</b>
<b>6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>133</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>135</b>

**Cuvinte cheie:** *Fibroza hepatică experimentală, Nanoparticule de aur, Cornus mas, Sambucus Nigra, Silimarina*

## INTRODUCERE

Cercetarea prezentată în această teză explorează efectele protectoare ale nanomaterialelor, în special ale nanoparticulelor de aur (AuNPs) fitoreduse cu *Cornus mas* (CM), asupra modificărilor hepatice induse de factori nocivi precum o dietă bogată în grăsimi și substanțe toxice. Această investigație cuprinde evaluarea stresului oxidativ, a inflamației și a leziunilor histologice, identificând potențialul terapeutic al acestor nanoparticule. Demersul se bazează pe analiza stadiului actual al cunoașterii în domeniul nanomaterialelor, cu accent pe utilizarea acestora ca agenți protectori și regenerativi în tratamentul leziunilor hepatice. Lucrarea este structurată în 2 părți, o I parte denumită *Stadiul actual al cunoașterii* unde se prezintă date teoretice de actualitate despre fibroza hepatică, cauze care conduc la apariția acesteia, precum și mecanismele care stau la baza ei. Se pune accentul pe nanoparticule, în mod special pe cele metalice, de aur sintetizate cu compuși naturali cum ar fi *Sambucus nigra* și *Cornus Mas*. Cea de-a II-a parte a lucrării prezintă *Contribuția personală*, și este structurată în 3 studii distincte, fiecare contribuind la o mai bună înțelegere a modului în care compușii naturali și AuNPs fitoreduse cu compușii naturali pot influența și ameliora leziunile hepatice.

Studiile au fost realizate în cadrul Disciplinei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, unde s-au desfășurat atât elaborarea modelelor experimentale, cât și determinarea parametrilor biochimici și a markerilor de stres oxidativ. Sinteza și caracterizarea AuNPs și a celor fitoreduse cu compuși naturali au fost efectuate în cadrul Catedrei de Chimie a Universității Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, sub coordonarea doamnei profesor Luminița David. Evaluarea histologică a fost realizată cu sprijinul domnului profesor Flaviu Tabaran și al domnului profesor Andras Nagy de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, asigurând o analiză detaliată și precisă a rezultatelor obținute.

Fibroza hepatică, o patologie complexă și des întâlnită, reprezintă o provocare majoră în practica medicală, în special din cauza limitărilor terapiei existente. În acest context, teza de doctorat intitulată „Nanomateriale cu efect protector pentru modificările locale și sistemice din fibroza hepatică experimentală” își propune să investigheze utilizarea inovatoare a nanoparticulelor de aur fitoreduse cu compuși naturali, inclusiv *Cornus mas* și *Sambucus nigra*, ca agenți terapeutici potențiali pentru prevenirea și tratamentul leziunilor hepatice. Această abordare explorează aplicabilitatea nanomaterialelor nu doar ca protecție împotriva afectării ficatului, dar și ca agenți cu efecte regenerative. Teza este structurată în două părți: o sinteză teoretică a fibrozei hepatice și a nanoparticulelor, urmată de contribuțiile experimentale originale ale autoarei.

### **Prima parte: Stadiul actual al cunoașterii**

În cadrul primei secțiuni, lucrarea oferă o analiză detaliată a fibrozei hepatice, incluzând factorii cauzali și mecanismele fiziopatologice asociate, subliniind deficiențele terapiei convenționale și necesitatea unor alternative inovatoare. Nanoparticulele de aur fitoreduse, selectate pentru biocompatibilitatea și capacitatea lor de acțiune țintită, sunt discutate extensiv, iar lucrarea se concentrează pe extractele naturale din *Cornus mas* și *Sambucus nigra*, utilizate pentru a stabili și spori eficiența acestor nanomateriale. Prin analizarea stabilității în medii digestive simulate și a potențialului antioxidant, această parte a lucrării oferă o fundamentare teoretică pentru aplicarea lor ulterioară în studii experimentale.

## A doua parte: Contribuțiile personale

### 1. Ipoteza de lucru/obiective

Nanoparticulele de aur (AuNPs) fitoreduse cu extracte naturale reprezintă o abordare inovatoare în dezvoltarea unor soluții terapeutice pentru tratamentul leziunilor hepatice cauzate de diverse agresiuni, precum dieta hiperlipidică și expunerea la toxine. Aceste nanoparticule se remarcă prin capacitatea lor de a interacționa la nivel celular, având potențialul de a modula răspunsurile oxidative și inflamatorii care joacă un rol central în patogeneza leziunilor hepatice. Prin fitoreducerea cu extracte naturale, AuNPs dobândesc proprietăți unice care le permit nu doar să reducă stresul oxidativ, dar și să interfereze cu căile inflamatorii, astfel limitând progresia către fibroza hepatică și alte complicații severe. Această sinergie între nanotehnologie și fitoterapie oferă o platformă promițătoare pentru intervenții terapeutice mai specifice și mai puțin invazive, care să contribuie la protecția ficatului.

În plus, caracteristicile acestor nanoparticule le conferă un avantaj distinct în regenerarea țesutului hepatic afectat. Proprietățile antiinflamatorii și antioxidante ale compușilor naturali, potențate de prezența AuNPs, sugerează o capacitate sporită de a promova vindecarea și regenerarea celulară. Această abordare este deosebit de relevantă în contextul afecțiunilor hepatice cronice, unde intervențiile tradiționale sunt adesea insuficiente pentru a preveni progresia bolii. Nanoparticulele fitoreduse pot, așadar, să ofere o dublă protecție: prevenind deteriorarea suplimentară a ficatului și stimulând regenerarea acestuia. Prin urmare, explorarea acestor nanoparticule ca opțiuni terapeutice deschide noi perspective în gestionarea eficientă a bolilor hepatice, contribuind la îmbunătățirea calității vieții pacienților.

#### Obiective:

Studierea comportamentului nanoparticulelor de aur fitoreduse cu compuși naturali în tractul gastrointestinal, folosind fluide simulate. Evaluarea nanoparticulelor de aur fitoreduse cu *Cornus mas* și *Sambucus nigra* în fazele orale, gastrice și intestinale, precum și capacitatea lor antioxidantă și conținutul fenolic după digestie, in vitro.

Explorarea modificărilor hepatice induse de o dietă bogată în grăsimi, comparativ cu o dietă normală, și evaluarea efectelor benefice ale soluțiilor de *CM* și AuNPs fitoreduse cu *CM* asupra stresului oxidativ, markerilor de inflamație și leziunilor histologice cauzate de dieta bogată în grăsimi.

Evaluarea efectelor antiinflamatorii și antifibrotice ale AuNPs fitoreduse cu *CM* și ale silimarinei asupra ficatului afectat de tioacetamidă, comparativ cu un grup de control, analizând markerii de stres oxidativ și enzimele hepatice pentru a determina capacitatea acestor compuși de a restabili echilibrul redox și de a proteja celulele hepatice, investigând modificările histologice și comparând eficiența acestora în prevenirea și tratamentul leziunilor hepatice.

### 1. Studiul 1 : Nanoparticule de aur fitoreduse cu compuși naturali: comportamentul în tractul gastrointestinal.

În acest prim studiu, s-a evaluat stabilitatea și comportamentul fizico-chimic al nanoparticulelor de aur fitoreduse în diferitele etape ale digestiei (orală, gastrică și intestinală), folosind fluide simulate care reproduc condițiile tractului gastrointestinal. Au fost monitorizate atât stabilitatea, cât și capacitatea antioxidantă a nanoparticulelor de aur sintetizate cu extracte de *Cornus mas* și *Sambucus nigra*, observându-se o rezistență bună în aceste medii și o capacitate antioxidantă semnificativă. Rezultatele au indicat un potențial terapeutic notabil pentru administrarea orală, deschizând perspective pentru utilizarea nanomaterialelor fitoreduse în tratamente destinate afecțiunilor hepatice.

## **2. Studiul 2 : Modificări hepatice în urma unei diete bogate în grăsimi: efectele *Cornus mas* și ale nanoparticulelor de aur fitoreduse cu *Cornus mas* asupra stresului oxidativ, inflamației și leziunilor histologice.**

Al doilea studiu a avut drept scop investigarea efectelor unei diete hiperlipidice asupra ficatului și evaluarea eficienței nanoparticulelor fitoreduse și a soluțiilor de *Cornus mas* în reducerea leziunilor hepatice induse de o alimentație dezechilibrată. Studiul s-a realizat pe un model animal, unde dieta bogată în grăsimi a fost administrată pentru a induce modificări hepatice specifice, precum stresul oxidativ și inflamația. Tratamentul cu *Cornus mas* și nanoparticulele fitoreduse s-a dovedit eficient în reducerea peroxidării lipidice și în creșterea potențialului antioxidant hepatic, deși anumite rezultate statistice nu au fost semnificative. Studiul sugerează beneficiile compușilor naturali și ale nanomaterialelor în prevenirea leziunilor hepatice asociate dietei bogate în grăsimi.

## **3. Studiul 3 : Efectele Protectoare și Regenerative ale Nanoparticulelor de Aur Fitoreduse cu *Cornus mas* și ale Silimarinei asupra Leziunilor Hepatice Induse de Tioacetamidă: Evaluarea Potențialului Terapeutic**

În cadrul celui de-al treilea studiu, s-a realizat o evaluare comparativă a efectelor protectoare și regenerative ale nanoparticulelor fitoreduse și ale silimarinei asupra leziunilor hepatice induse de tetraclorura de carbon, un agent toxic frecvent utilizat în studiile de fibroza hepatică. Rezultatele experimentale au arătat că, deși ambele tratamente au contribuit la reducerea nivelurilor enzimelor hepatice și la ameliorarea inflamației, recuperarea completă a funcției hepatice nu a fost realizată, subliniind astfel importanța cercetărilor suplimentare pentru optimizarea acestor tratamente.

### **Concluzii generale**

Nanoparticulele de aur fitoreduse cu compuși naturali au demonstrat un potențial important în protejarea și regenerarea țesutului hepatic afectat de agresori, precum dieta bogată în grăsimi și toxine. Acestea, obținute cu extracte naturale precum *Cornus mas* și *Sambucus nigra*, au prezentat stabilitate ridicată în condiții simulate de digestie, recomandându-le pentru terapiile orale hepatoprotectoare. *Sambucus nigra*, bogată în compuși fenolici, reprezintă o sursă valoroasă de antioxidanți, contribuind la dezvoltarea tratamentelor inovatoare bazate pe nanoparticule și compuși naturali.

Administrarea de soluții de *Cornus mas* și de AuNPs fitoreduse a demonstrat reducerea stresului oxidativ generat de o dietă dezechilibrată, subliniind potențialul terapeutic în leziunile hepatice. Comparativ, Silimarina a arătat efecte superioare în scăderea hepatocitolizei și a stresului oxidativ, ambele având efecte hepatoprotectoare notabile. În plus, nanoparticulele și Silimarina au redus inflamația și fibroza hepatică indusă de toxine.

Aceste nanomateriale ar putea deveni componente esențiale în terapiile inovatoare pentru prevenția și tratamentul fibrozei hepatice, deși sunt necesare studii aprofundate pentru înțelegerea mecanismelor de acțiune. Utilizarea compușilor naturali împreună cu nanoparticulele de aur oferă o abordare eficientă și sustenabilă, fiind necesare cercetări suplimentare pentru optimizarea acestor strategii, în beneficiul pacienților.

### **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Această teză se remarcă prin abordarea complexă și multidimensională a utilizării nanomaterialelor, în special a nanoparticulelor de aur fitoreduse cu compuși naturali, pentru tratamentul leziunilor hepatice. Prin integrarea extractelor de *Cornus mas* și *Sambucus nigra* în sinteza nanoparticulelor, cercetarea investighează în detaliu comportamentul acestor nanomateriale în diverse etape ale digestiei. Astfel, sunt oferite perspective noi asupra stabilității și potențialului antioxidant al acestor nanoparticule în condiții simulate in vitro, contribuind la înțelegerea capacităților lor protectoare în mediul digestiv.

O caracteristică esențială a originalității lucrării o reprezintă analiza comparativă a efectelor protective și regenerative ale nanoparticulelor în contexte patologice variate, cum ar fi dieta hiperlipidică și expunerea la tioacetamidă, un model clasic pentru studierea fibrozei hepatice. Lucrarea aduce dovezi semnificative privind influența AuNPs asupra markerilor de stres oxidativ, inflamației și leziunilor histologice, consolidând astfel potențialul lor terapeutic.

Contribuția inovativă a tezei se reflectă și prin metodologia riguroasă și modelele experimentale bine structurate, care permit o evaluare precisă a efectelor acestor nanoparticule asupra ficatului afectat. Rezultatele sugerează nu doar o utilizare promițătoare a AuNPs în tratamentele hepatice, ci și deschiderea unor direcții viitoare de cercetare care ar putea conduce la dezvoltarea unor terapii mai eficiente și personalizate pe baza nanotehnologiei. Prin urmare, lucrarea se poziționează ca o contribuție semnificativă în domeniul medicinei regenerative și al terapiilor bazate pe nanomateriale.

### **Limitele și direcțiile viitoare de cercetare**

În ciuda contribuțiilor valoroase ale acestei teze la domeniul nanomaterialelor în tratamentul leziunilor hepatice, este esențială recunoașterea unor limitări. Durata relativ scurtă a tratamentelor și dimensiunea redusă a eșantioanelor experimentale pot influența robustețea rezultatelor și limitează generalizarea acestora. În plus, studiile s-au concentrat pe modele animale specifice, ceea ce ridică provocări legate de aplicabilitatea directă a rezultatelor în practica clinică umană.

Deși nanoparticulele fitoreduse cu compuși naturali au demonstrat efecte protectoare și regenerative, aceste efecte nu au fost suficiente pentru restabilirea completă a funcției hepatice normale. Acest lucru sugerează necesitatea continuării cercetării pentru optimizarea dozei și a regimului de administrare, precum și explorarea unor combinații terapeutice care ar putea spori eficacitatea tratamentelor.

Pentru viitor, direcțiile de cercetare ar trebui să includă studii de lungă durată care să evalueze efectele pe termen lung ale acestor tratamente. De asemenea, este necesară extinderea cercetării pe alte modele animale și inițierea de studii clinice umane, pentru a valida aplicabilitatea acestor terapii în context medical real. Investigarea mecanismelor moleculare de interacțiune ale AuNPs cu celulele hepatice ar putea furniza informații critice pentru dezvoltarea unor tratamente mai eficiente și personalizate. În plus, integrarea altor compuși naturali sau a unor nanomateriale complementare deschide noi oportunități de cercetare în prevenirea și tratarea afecțiunilor hepatice.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

---

SUMMARY OF PHD THESIS

# Protective Nanomaterials for Local and Systemic Changes in Experimental Liver Fibrosis

---

PHD Student **Dalina Diana Zugravu (Pop)**

---

Scientific Coordinator Prof.dr. **Simona Valeria Clichici**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	<b>19</b>
<b>Chapter 1: Liver Fibrosis</b>	<b>21</b>
1.1 Definition and classification	21
1.2 Epidemiology of liver fibrosis	21
1.3 Etiology and risk factors	22
1.4 Pathogenesis of liver fibrosis	22
1.5 Diagnosis of liver fibrosis	22
1.5.1 Invasive methods	29
1.5.2 Biomarkers and medical imaging	30
1.6 Treatment of liver fibrosis	32
1.6.1 Pharmacological treatments	32
1.6.2 Experimental and innovative treatments	34
<b>Chapter 2: Nanomaterials in medicine</b>	<b>37</b>
2.1 Introduction	37
2.1.1 Definition, classification and properties	37
2.2 Application of Nanomaterials in Medicine	38
2.2.1 Controlled drug delivery	39
2.2.2 Gene and Cell Therapies	40
<b>Chapter 3: Nanomaterials and liver fibrosis</b>	<b>43</b>
3.1 Drug delivery	43
3.1.1 Cellular and molecular modifications	43
3.1.2 Effects on inflammation and tissue regeneration	43
3.2 Preclinical and clinical studies on the use of Nanomaterials	44
3.2.1 Experimental models of liver fibrosis	44
3.2.2 Efficacy and safety of Nanomaterials	45
3.3 Advantages and limitations of Nanomaterials use	45
3.3.1 Biodistribution and biocompatibility	45
3.3.2 Toxicity and side effects	46
3.4 Future perspectives and Research directions	46
3.4.1 Development of next generation Nanomaterials	46
3.4.2 Integration with other therapies and advanced technologies	46
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>49</b>
<b>1. Working Hypothesis/Objectives</b>	<b>51</b>
<b>2. Study 1. Gold nanoparticles reduced with Natural Compounds: behaviour in the gastrointestinal tract</b>	<b>53</b>
2.1 Introduction	53
2.2 Objectives	57
2.3 Materials and Methods	58
2.4 Results	60
2.5 Discussions	67
2.6 Conclusions	71

<b>3. Study 2. Hepatic changes due to a High-Fat Diet: Effects of <i>Cornus mas</i> an Gold Nanoparticles reduced with <i>Cornus mas</i> on Oxidative Stress, Inflammation and Histological lessions</b>	<b>73</b>
3.1. Introduction	73
3.2 Objectives	75
3.3 Material and Methods	76
3.4 Results	79
3.5. Discussions	97
3.6. Conclusions	101
<b>4. Study 3. Protective and Regenerative effects of Gold Nanoparticles reduced with <i>Cornus mas</i> and Silymarin on Thioacetamide induced liver fibrosis: Therapeutic Potential Evaluation</b>	<b>103</b>
4.1. Introduction	103
4.2 Objectives	108
4.3 Materials and methods	108
4.4 Results	110
4.5 Discussions	123
4.6 Conclusions	130
<b>5. General conclusions</b>	<b>131</b>
<b>6. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>133</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>135</b>

**Keywords:** *Experimental liver fibrosis, Gold nanoparticles, Cornus mas, Sambucus nigra, Silymarin*

## INTRODUCTION

The research presented in this thesis explores the protective effects of nanomaterials, particularly gold nanoparticles reduced with *Cornus mas* (CM), on liver alterations induced by harmful factors such as a high-fat diet and toxic substances. This investigation includes the evaluation of oxidative stress, inflammation, and histological lesions, identifying the therapeutic potential of these nanoparticles. The approach is based on an analysis of the current state of knowledge in the field of nanomaterials, with an emphasis on their use as protective and regenerative agents in the treatment of liver injuries.

The thesis is structured in two parts. The first part, titled *Current State of Knowledge*, presents up-to-date theoretical data on liver fibrosis, its causes, and underlying mechanisms. This section emphasizes nanoparticles, particularly gold nanoparticles synthesized with natural compounds such as *Sambucus nigra* and *Cornus mas*. The second part of the thesis, *Personal Contributions*, is organized into three distinct studies, each contributing to a better understanding of how natural compounds and AuNPs reduced with these compounds can influence and ameliorate liver injuries.

The studies were conducted at the Department of Physiology, "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, where both the development of experimental models and the determination of biochemical parameters and oxidative stress markers took place. The synthesis and characterization of AuNPs and those reduced with natural compounds were carried out at the Department of Chemistry, Babeș-Bolyai University, Cluj-Napoca, under the supervision of Professor Luminița David. Histological evaluation was conducted with the support of Professor Flaviu Tabaran and Professor Andras Nagy from the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine in Cluj-Napoca, ensuring a detailed and precise analysis of the results.

**Liver fibrosis**, a complex and frequently encountered pathology, represents a major challenge in medical practice, especially due to the limitations of existing therapies. In this context, the doctoral thesis titled "*Protective Effects of Nanomaterials for Local and Systemic Changes in Experimental Liver Fibrosis*" aims to investigate the innovative use of gold nanoparticles reduced with natural compounds, including *Cornus mas* and *Sambucus nigra*, as potential therapeutic agents for the prevention and treatment of liver injuries. This approach explores the applicability of nanomaterials not only as protection against liver damage but also as agents with regenerative effects. The thesis is structured in two parts: a theoretical synthesis of liver fibrosis and nanoparticles, followed by the author's original experimental contributions.

### **Part One: Current State of Knowledge**

In the first section, the thesis provides a detailed analysis of liver fibrosis, including causative factors and associated pathophysiological mechanisms, highlighting the deficiencies of conventional therapies and the need for innovative alternatives. Gold nanoparticles reduced with natural compounds, chosen for their biocompatibility and ability to target specific organs, are discussed in detail. The thesis focuses on natural extracts from *Cornus mas* and *Sambucus nigra*, used to stabilize and enhance the efficacy of these nanomaterials. By analyzing their stability in simulated digestive environments and their antioxidant potential, this part of the thesis offers a theoretical foundation for their subsequent application in experimental studies.

## Part Two: Personal Contributions

### 1. Working Hypothesis/Objectives

Gold nanoparticles reduced with natural extracts represent an innovative approach in developing therapeutic solutions for liver injuries caused by various aggressors, such as a high-fat diet and exposure to toxins. These nanoparticles stand out due to their ability to interact at the cellular level, with the potential to modulate oxidative and inflammatory responses, which play a central role in the pathogenesis of liver injuries. Through reduction with natural extracts, gold nanoparticles acquire unique properties that enable them not only to reduce oxidative stress but also to interfere with inflammatory pathways, thereby limiting progression to liver fibrosis and other severe complications. This synergy between nanotechnology and phytotherapy offers a promising platform for more targeted and less invasive therapeutic interventions that contribute to liver protection.

Moreover, these nanoparticles have distinct advantages in regenerating damaged liver tissue. The anti-inflammatory and antioxidant properties of natural compounds, enhanced by the presence of gold nanoparticles, suggest an increased capacity to promote healing and cellular regeneration. This approach is particularly relevant in the context of chronic liver diseases, where traditional interventions are often insufficient to prevent disease progression. Thus, reduced nanoparticles may offer dual protection by preventing further liver damage and stimulating regeneration. Exploring these nanoparticles as therapeutic options opens new perspectives in effectively managing liver diseases, contributing to improved patient quality of life.

#### Objectives

Study the behavior of gold nanoparticles reduced with natural compounds in the gastrointestinal tract using simulated fluids. Evaluate the antioxidant capacity and phenolic content of gold nanoparticles reduced with *Cornus mas* and *Sambucus nigra* after in vitro digestion in the oral, gastric, and intestinal phases.

Investigate liver alterations induced by a high-fat diet compared to a normal diet and evaluate the beneficial effects of *CM* solutions and gold nanoparticles reduced with *CM* on oxidative stress, inflammation markers, and histological lesions caused by a high-fat diet.

Assess the anti-inflammatory and antifibrotic effects of gold nanoparticles reduced with *CM* and silymarin on thioacetamide-induced liver fibrosis, compared to a control group, by analyzing oxidative stress markers and liver enzymes to determine the capacity of these compounds to restore redox balance and protect liver cells, investigating histological changes and comparing their efficacy in the prevention and treatment of liver injuries.

#### Study 1: Gold Nanoparticles Reduced with Natural Compounds: Behavior in the Gastrointestinal Tract

In this initial study, the stability and physicochemical behavior of gold nanoparticles reduced with natural compounds were evaluated in various stages of digestion (oral, gastric, and intestinal), using simulated fluids that mimic gastrointestinal conditions. Both the stability and antioxidant capacity of gold nanoparticles synthesized with *Cornus mas* and *Sambucus nigra* extracts were monitored, demonstrating good resistance in these environments and a significant antioxidant capacity. Results indicated a notable therapeutic potential for oral administration, opening perspectives for the use of reduced nanomaterials in treatments aimed at liver conditions.

#### Study 2: Liver Changes Following a High-Fat Diet: Effects of *Cornus mas* and Gold Nanoparticles Reduced with *Cornus mas* on Oxidative Stress, Inflammation, and Histological Lesions

The second study aimed to investigate the effects of a high-fat diet on the liver and evaluate the efficacy of reduced nanoparticles and *Cornus mas* solutions in mitigating liver damage caused by an unbalanced diet. The study was conducted on an animal model, where a high-fat diet was administered to induce specific liver changes, such as oxidative stress and inflammation. Treatment with *Cornus mas* and reduced nanoparticles proved effective in reducing lipid peroxidation and increasing hepatic antioxidant potential, although certain statistical results were not significant. The study suggests the benefits of natural compounds and nanomaterials in preventing liver damage associated with a high-fat diet.

### **Study 3: Protective and Regenerative Effects of Gold Nanoparticles Reduced with *Cornus mas* and Silymarin on Thioacetamide-Induced Liver Damage: Therapeutic Potential Evaluation**

In this third study, a comparative evaluation of the protective and regenerative effects of reduced nanoparticles and silymarin on thioacetamide-induced liver damage was conducted. This toxic agent is commonly used in liver fibrosis studies. Experimental results showed that, although both treatments contributed to reducing liver enzyme levels and alleviating inflammation, complete recovery of liver function was not achieved, emphasizing the need for further research to optimize these treatments.

#### **General conclusions**

Phytoreduced gold nanoparticles with natural compounds have shown significant potential in protecting and regenerating liver tissue damaged by various aggressors, such as high-fat diets and toxins. These nanoparticles, synthesized with natural extracts like *Cornus mas* and *Sambucus nigra*, have demonstrated high stability under simulated digestion conditions, making them suitable for oral hepatoprotective therapies. *Sambucus nigra*, rich in phenolic compounds, is a valuable source of antioxidants, contributing to the development of innovative treatments based on gold nanoparticles and natural compounds.

The administration of *Cornus mas* solutions and phytoreduced AuNPs has shown a reduction in oxidative stress caused by an imbalanced diet, emphasizing their therapeutic potential in liver damage. In comparison, silymarin has exhibited superior effects in decreasing hepatocytolysis and oxidative stress, with both demonstrating notable hepatoprotective properties. Furthermore, the nanoparticles and silymarin reduced liver inflammation and fibrosis induced by toxins.

These nanomaterials could become essential components of innovative therapies for the prevention and treatment of hepatic fibrosis, though further studies are needed to understand their mechanisms of action. The use of natural compounds in combination with gold nanoparticles offers an efficient and sustainable approach, and additional research is required to optimize these strategies for the benefit of patients.

#### **Originality and Innovative Contributions of the Thesis**

This thesis stands out due to its complex, multidimensional approach to using nanomaterials, especially gold nanoparticles reduced with natural compounds, in treating liver injuries. By integrating *Cornus mas* and *Sambucus nigra* extracts in the synthesis of nanoparticles, the research investigates in detail the behavior of these nanomaterials during various stages of digestion, offering new insights into their stability and antioxidant potential under *in vitro* simulated conditions, contributing to an understanding of their protective capabilities in the digestive environment.

An essential feature of the work's originality lies in the comparative analysis of the protective and regenerative effects of these nanoparticles in varied pathological contexts, such as a high-fat diet and thioacetamide exposure, a classic model for studying liver fibrosis. The thesis provides significant evidence regarding the influence of gold nanoparticles on oxidative stress markers, inflammation, and histological lesions, thus reinforcing their therapeutic potential.

The thesis' innovative contribution is also reflected in its rigorous methodology and well-defined experimental models, which allow for a precise evaluation of these nanoparticles' effects on affected liver tissue. The results suggest not only a promising use of gold nanoparticles in liver treatments but also open future research directions that could lead to the development of more effective and personalized therapies based on nanotechnology. Therefore, this thesis represents a significant contribution to regenerative medicine and nanomaterial-based therapies.

### **Limitations and Future Research Directions**

Despite the valuable contributions of this thesis to the field of nanomaterials in treating liver injuries, certain limitations must be acknowledged. The relatively short duration of treatments and the small sample size may affect the robustness of the results and limit their generalization. Additionally, the studies focused on specific animal models, raising challenges regarding the direct applicability of these results to clinical practice in humans.

Although nanoparticles reduced with natural compounds have demonstrated protective and regenerative effects, these effects were not sufficient to fully restore normal liver function. This indicates the need for further research to optimize dosage and administration regimens and explore therapeutic combinations that could enhance treatment efficacy.

Future research directions should include long-term studies to evaluate the effects of these treatments over time. Furthermore, extending research to other animal models and initiating human clinical studies are necessary to validate the applicability of these therapies in a real medical context. Investigating the molecular mechanisms through which gold nanoparticles interact with liver cells could provide critical information for developing more efficient and personalized treatments. Additionally, integrating other natural compounds or complementary nanomaterials opens new research opportunities.