
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Dezvoltarea de noi produse în terapia bolilor digestive cronice

Doctorand **Irina Mihaela Matran**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Dan Lucian Dumitrașcu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	21
1. Refluxul gastroesofagian	21
1.1. Cauzele apariției refluxului gastroesofagian	21
1.2. Modele experimentale de tratament al refluxului gastroesofagian	22
1.3. Tratamente alternative și farmacologice pentru RGE	24
1.4. Reacții adverse, supradozaj și atenționări/ interacțiuni cu alimentele a tratamentelor farmacologice pentru RGE	29
2. CONSTIPAȚIA	31
2.1. Cauzele apariției constipației	31
2.2. Metode experimentale de constipație	33
2.3. Tratamente alternative pentru constipație și fisuri anale	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Metodologie generală	45
3. Studiul 1. Dezvoltarea unui supliment alimentar pentru reducerea refluxului gastroesofagian	46
3.1. Introducere	46
3.2. Ipoteza de lucru	46
3.3. Material și metodă	47
3.4. Rezultate	50
3.5. Discuții	54
3.6. Concluzii	58
4. Studiul 2. Dezvoltarea unui cictarizant pentru fisuri anale	60
4.1. Introducere	60
4.2. Ipoteza de lucru	60
4.3. Material și metodă	61

4.4. Rezultate	72
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	77
5. Studiul 3. Determinarea eficacității sericinei în tratarea constipației provocată de opiacee	78
5.1. Introducere	78
5.2. Ipoteza de lucru	79
5.3. Materiale și metode	80
5.4. Rezultate	82
5.5. Discuții	84
5.6. Concluzii	86
6. Concluzii generale (sinteză)	88
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	92
REFERINȚE	96

Cuvinte cheie: BRGE, constipație, fisuri anale, cicatrizant, supliment alimentar, sericină.

INTRODUCERE

Calitatea vieții este elementul fundamental al lumii contemporane. Indiferent de domeniu, dezvoltarea și performanța au la bază calitatea, care nu se poate realiza decât prin schimbare constantă și sănătatea populației. Începând cu secolul XX, schimbarea reprezintă elementul esențial al tuturor companiilor care sunt obligate să reacționeze la presiunile pieții. Abordarea schimbării de către companii, obligă angajații la adoptarea rapidă a schimbării, bazată pe capital de cunoștințe, reactualizate și verificate în practică, constant. Organizațiile au nevoie de activul cel mai important al acestora – resursele umane, în deplinătatea performanțelor sale, sănătate, dăruire, atașament și creativitate.

Concomitent cu dezvoltarea și performanța, pentru o parte importantă a populației, presiunea schimbării aduce schimbarea stilului de viață și apariția bolilor digestive cronice. Acestea nu apar numai în rândul adulților, ci și la copii, datorită schimbării unității familiei, cauzată atât de egalitatea de șanse între femei și bărbați, precum și a dezvoltării culturale, sociale și psihologice a părinților.

Două dintre bolile digestive cronice întâlnite atât la copii, cât și la adulți, sunt refluxul gastroesofagian și constipația însoțită, sau nu de fisuri anale. Accesul la informații, precum și reacțiile adverse provocate de anumite medicamente, fac ca cercetarea – dezvoltarea tratamentelor să fie în continuă dezvoltare.

Teza de Doctorat a vizat trei obiective:

1. Dezvoltarea unui supliment alimentar pentru refluxul gastroesofagian și brevetarea acestuia;
2. Dezvoltarea unui cicatrizant natural pentru fisuri anale;
3. Determinarea eficacității sericinei în tratarea constipației provocată de opiacee și depunerea dosarului la Comisia Europeană în vederea obținerii Avizului științific favorabil pentru introducerea sericinei ca ingredient alimentar nou.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a Tezei, intitulată *Stadiul actual al cunoașterii*, sintetizează cele mai importante date din literatura de specialitate referitoare la afecțiunile digestive funcționale stabilite în obiectivele acesteia – refluxul gastroesofagian și constipația. Au fost prezentate definiția și clasificarea refluxului gastroesofagian și constipației, cauzele apariției acestora, modelele experimentale și tratamentele alternative (inclusiv cele brevetate) și farmacologice care la momentul cercetării doctorale dețineau autorizație de punere pe piață. De asemenea, au fost prezentate reacțiile adverse, supradozajul și atenționările/ interacțiunile cu alimentele a tratamentelor farmacologice pentru refluxul gastroesofagian și constipație.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Cea de-a doua parte a Tezei, intitulată *Contribuții personale*, prezintă ipotezele de lucru, metodologia generală, materialele și metodele care au stat la baza dezvoltării noilor produse pentru terapia bolilor digestive cronice – refluxul gastroesofagian, constipația și fisurile anale.

Metodologia generală care a stat la baza dezvoltării celor două noi produse pentru tratamentul bolilor digestive cronice a cuprins noțiuni fundamentale de gastroenterologie aplicabile bolii de reflux gastroesofagian și fisuri anale, farmacologie generală și terapeutică, chimie farmaceutică, farmacognozie, tehnică farmaceutică, controlul medicamentelor și farmacovigilență.

Verificarea existenței/ lipsei unor formule apropiate cu cele dezvoltate în cadrul cercetării doctorale a fost realizată cu ajutorul internetului și a bazelor de date OSIM și Espacenet.

Pentru evaluarea clinică a eficacității celor două produse pentru tratamentul refluxului gastroesofagian și fisurilor anale, metodologia generală a cuprins și legislația națională aplicabilă studiilor clinice, referitoare la aprobarea Ghidului privind formularul cererii și documentația care trebuie trimise comisiei de etică în vederea obținerii opiniei acesteia asupra desfășurării unui studiu clinic cu medicamente de uz uman în România și Regulamentul comisiei de etică a cercetării științifice a UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj – Napoca.

Au fost obținute Avizele favorabile ale Comisiei de Etică din cadrul UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj – Napoca și toți pacienții incluși în studiu clinic au îndeplinit criteriile de includere și au semnat Formularul de informare și Formularul de acceptare.

Pe lângă stadiul cunoașterii și Regulamentul comisiei de etică a cercetării științifice a UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj – Napoca, metodologia generală a determinării eficacității sericinei în tratarea constipației provocată de opiacee la rozătoare și depunerea dosarului la Comisia Europeană în vederea obținerii Avizului științific favorabil pentru introducerea sericinei ca ingredient alimentar nou, a avut la bază aplicarea legislației naționale privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și a Normelor și protocoalelor analitice, farmacotoxicologice și clinice referitoare la testarea medicamentelor, Regulamentul nr.2283 din 25 noiembrie 2015 privind alimentele noi, de modificare a Regulamentului (UE) nr.1169/2011 al Parlamentului European și al Consiliului și de abrogare a Regulamentului (CE) nr.258/97 al Parlamentului European și al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr.1852/2001 al Comisiei.

Studiul 1. Dezvoltarea unui supliment alimentar pentru reducerea refluxului gastroesofagian

Pentru pacienții care suferă de reflux gastroesofagian există o gamă mare de medicamente și suplimente alimentare care reduc hiperaciditatea gastrică, sau

refluxului gastroesofagian, precum și metode alternative. La toate acestea se adaugă schimbarea stilului de viață.

Deoarece eroziunile dentare reprezintă o patologie considerată comorbiditate în boala de reflux gastroesofagian, este necesar a fi abordată această complicație extraesofagiană a bolii care se manifestă prin pierderi tisulare care determină modificarea morfologiei și a dimensiunii coroanelor dentare, avansând în cazurile grave până la deschiderea camerei pulpare și pierderea vitalității pulpare. Frecvența medie a eroziunilor dentare la pacienții cu RGE este 48,8% conform datelor din literatură. Calitatea vieții pacienților cu aceste leziuni este grav afectată de dureri dentare și tulburări funcționale estetice, masticatorii. Nicio soluție din cele identificate în bazele de date OSIM și Espacenet, nu tratează creșterea pH-ului din cavitatea bucală și nu previne sau stagnează evoluția eroziunilor dentare, leziuni des întâlnit în cazul bolii de reflux gastroesofagian și provocată de atacul acid al secrețiilor gastrice refluante în cavitatea orală, asupra dinților.

Au fost identificate materiile prime de origine vegetală cu acțiune antihistaminică, prostaglandină, protecție gastrointestinală, protecție hepatică, protecție capilară, acțiune analgezică, acțiune antimicrobiană – anti Gram + și anti Gram. A fost identificată materia primă care poate conferi protecție dentară, prin peliculele care se formează și a fost prezentat modul de preparare a suplimentului alimentar pentru reducerea refluxului gastroesofagian. Noul produs dezvoltat este natural și oferă o soluție alternativă pentru tratamentul bolii de RGE. Comparativ cu produsele pentru reducerea refluxului gastroesofagian, existente pe piață, noul produs (supliment alimentar) rezultă în urma cercetării – dezvoltării și studiat clinic, prezintă următoarele avantaje: efect sinergic atât asupra cavității bucale, cât și asupra stomacului; acțiune sistemică; protecția dentară, prin peliculele care se formează datorită lipidelor (untului de cacao); remineralizarea smalțului dentar și stimularea absorbției antihistaminicelor H2 naturale, datorită bicarbonatului de sodiu care crește pH-ul din cavitatea bucală; este ușor de administrat; nu conține conservanți, gluten, lactoză, sau alte substanțe de sinteză; nu a prezentat reacții adverse; se reduce numărul total de episoade de reflux 24 ore, numărului episoadelor de reflux peste 5 minute și timpul refluxului cel mai lung. Verificarea eficacității suplimentului alimentar pentru reducerea refluxului gastroesofagian a fost realizată cu ajutorul unui trial clinic prospectiv, randomizat, dublu orb randomizat versus placebo, în Clinica Medicală II Cluj – Napoca, în care au fost incluși 28 de pacienți.

Produsul a fost brevetat și publicat în Web of Science.

Studiul 2. Dezvoltarea unui cicatrizant pentru fisuri anale

Deși pe piață există medicamente și produse alternative pentru tratamentul fisurilor anale, studiul nostru a avut ca obiectiv dezvoltarea unui nou cicatrizant pentru

fisuri anale, 100% natural, de tipul unui unguent diadermic, având ca excipienți Butirum cacao (untul de cacao) ecologic.

Au fost identificate materiile prime cu următoarele semnificație clinică potențială: reducerea disconfortului care apare la nivelul pielii, a venelor hemoroidale și mucoasei anale, stimulare a creșterii permeabilității membranelor, flexibilitatea membranelor celulare, antivirală, antifungică, antibacteriană, antioxidantă, antiinflamatoare, emolientă, antiseptică, cicatrizantă, stimularea producției de elastină, calmantă, anticanceroasă, regeneratoare a celulelor epiteliale, antialergică, combaterea riscului de sângerare.

De asemenea, am prezentat fluxul tehnologic de obținere a noul cicatrizant pentru fisuri anale, precum și analizele realizate pentru parametri senzoriali și parametri fizico – chimici și farmacologici (tixotropie, capacitatea de întindere, stabilitate, pH).

În prezent, trialul clinic dublu orb randomizat versus placebo este în desfășurare, rezultatele urmând să fie interpretate și prezentate după finalizarea acestuia.

Studiul 3. Determinarea eficacității sericinei în tratarea constipației provocată de opiacee.

În ultimii ani, sericina rezultată prin extracție din deșeurile industriei textile, pentru obținerea firelor de mătase, a fost tot mai mult cercetată, atât în domeniul medicinei – antidiabet, repararea celulelor nervoase în urma accidentului vascular cerebral ischemic, ca regenerator tisular, antioxidant, anticoagulant, inhibarea celulelor canceroase, farmaceutic, cosmetică și cel al industriei alimentare.

Obiectivul principal a fost determinarea eficacității sericinei în ameliorarea constipației provocată de morfină, în vederea cercetării și dezvoltării unui nou produs alimentar care să prevină/ amelioreze constipația.

Cercetarea experimentală a fost desfășurată pe șobolani Wistar, femele și masculi, sănătoși. Aceștia au fost împărțiți în trei loturi, fiecare lot având 12 capete (martor, sericină, lactoferină bovină) iar la începutul cercetării, șobolani au fost cântăriți și introduși în cuști individuale marcate. Studiul preclinic s-a realizat în condiții controlate de microclimat, în funcție de specificul speciei. Pe toată perioada cercetării fundamentale s-a monitorizat consumul de hrană și apă, fiecare cușcă, având hrănitore și adăpători individuale. Au fost folosite două tipuri de cuști metabolice: cuști metabolice standard și cuști metabolice concepute și realizate de către Ing. Eugen Boțan.

S-au administrat 20 g/ animal/ zi nutreț combinat achiziționat de la Institutul Național de Cercetare "Cantacuzino"-România, sericina a fost cumpărată de la Xi'An Zhongyun Biotechnology CO., LTD, China, iar lactoferina bovină marca "Vivinal Lactoferrin TD" a fost furnizată de compania KUK România, producător FrieslandCampina DMV B.V, Olanda.

Doza de lactoferină și sericină s-a calculat având în vedere nivelul maxim de utilizare a lactoferinei în produsele alimentare pentru scopuri medicale speciale de maxim 3 g/ zi. (Decizia de punere în aplicare 2012/727/UE a Comisiei de autorizare a introducerii pe piață a lactoferinei bovine ca ingredient alimentar nou în temeiul Regulamentului (CE) nr. 258/97 al Parlamentului European și al Consiliului (FrieslandCampina)) – pentru consum uman. Astfel, cantitatea de sericină, respectiv lactoferină bovină administrată/ animal/ zi a fost 13 mg.

Cercetarea realizată pe șobolanii Wistar hrăniți cu sericină și lactoferină bovină, în cantitate de 13 mg/ cap/ zi oferă primele rezultate privitoare la: plasticitatea fecalelor, conținutul de glucide a fecalelor prin metoda refractometrică, analiza biochimică a urinei șobolanilor, utilizarea sericinei la doza echivalentă a 3 g/ zi pentru consum uman, ameliorarea constipației provocată de opiacee, necesitatea utilizării noului tip de cuști metabolice într-o astfel de cercetare experimentală și menținerea alcalinității fecalelor.

CONCLUZII GENERALE

- Suplimentul alimentar pentru reducerea refluxului gastroesofagian cu efect sinergic atât asupra cavității bucale, cât și asupra stomacului, reprezintă un adjuvant natural și ușor de administrat, în cazul episoadelor de reflux gastroesofagian și/ sau pirozis. Acesta reprezintă o alternativă pentru pacienții care sunt sub tratament de lungă durată cu IPP-uri.

- Deoarece suplimentul alimentar nu conține conservanți, gluten, lactoză, sau alte substanțe de sinteză, poate fi administrat și de către persoane care au intoleranță la lactoză sau gluten și au reflux gastroesofagian, sau pirozis.

- Comparativ cu produsele pentru reducerea refluxului gastroesofagian, existente pe piață, suplimentul alimentar rezultat în urma cercetării – dezvoltării și studiat clinic, prezintă următoarele avantaje: protecția dentară, prin peliculele care se formează datorită lipidelor (untului de cacao); remineralizarea smalțului dentar și stimularea absorbției antihistaminicelor H₂ naturale, datorită bicarbonatului de sodiu care crește pH-ul din cavitatea bucală; este ușor de administrat; nu a prezentat reacții adverse; se reduce numărul total de episoade de reflux 24 ore, numărului episoadelor de reflux peste 5 minute și timpul refluxului cel mai lung; efectul terapeutic al suplimentului alimentar pentru reducerea refluxului gastroesofagian este datorat acțiunii antihistaminică, prostaglandinelor, protecției gastrointestinale, protecției hepatice, protecției capilare, acțiunii analgezice, acțiunii antimicrobiană – anti Gram + și anti Gram -; complexul fitoterapeutic din invenție, este unic; suplimentul alimentar are efecte pozitive (reducerea numărul total de episoade de reflux 24 ore, numărul episoadelor de reflux peste 5 minute și timpul refluxului cel mai lung, reducerea episoadelor de pirozis) în cazul pacienților care sufereau de esofagită clasa A Los

Angeles, esofagită clasa B Los Angeles, boala de reflux gastroesofagian neerozivă, boala de reflux gastroesofagian erozivă, pirozis persistent, gastrită reactivă; datorită modului de ambalare, suplimentul alimentar pentru reducerea refluxului alimentar supus invenției este ușor de administrat și poate fi luat atât la birou, cât și în mașină, putând fi administrat ori de câte ori este nevoie pentru reducerea refluxului gastroesofagian și a simptomelor acestuia; suplimentul alimentar, reprezintă o alternativă naturală la reducerea refluxului, fără reacții adverse, și este adjuvant în prevenirea eroziunilor dentare; în urma studiului clinic dublu orb randomizat versus placebo pentru verificarea eficacității suplimentului alimentar pentru reducerea RGE, formularea acestuia este protejată la OSIM, prin Brevetul de invenție RO132472-A0; ulterior obținerii Brevetului de invenție, suplimentul alimentar va fi avizat în cadrul Institutului de Bioresurse Alimentare.

- Noul cicatrizant este un unguent hidrofob, diadermic și stimulează producerea elastinei și regenerarea celulelor epiteliale, ceea ce conduce la accelerarea procesului de vindecare a pacienților care suferă de fisuri anale; cicatrizantul prezintă caracteristici (aspect, miros, tixotropie, capacitatea de întindere, stabilitatea, pH-ul) corespunzătoare; acest produs este natural, 100% și nu conține substanțe de sinteză; rezultatele "Studiului clinic dublu randomizat prospectiv de evaluare a eficacității cicatrizantului pentru fisuri anale versus placebo pe 50 de pacienți" vor fi interpretate și prezentate după finalizarea studiului clinic.

- Din cele două glicoproteine analizate, sericina a avut cea mai bună eficacitate în ameliorarea constipației provocată de morfină. În urma analizei biochimice a urinei, nu s-au constatat modificări ale sistemelor renal și hepatic, la cantitatea de 13 mg sericină/cap/ animal/ zi; sericina prezintă un potențial ingredient nou pentru: fabricarea produselor alimentare dietetice pentru stări de nutriție specială și industria farmaceutică; în baza acestei cercetări experimentale și a cercetărilor privind toxicitatea generală și genotoxicitate, precum și utilizarea sericinei în biomedicină, am depus în vederea obținerii Avizului științific favorabil pentru utilizarea sericinei ca ingredient alimentar nou, la Comisia Europeană dosarul cu numărul NF2018/0580.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

În acest studiu am urmărit să dezvoltăm noi produse pentru boli digestive cronice – refluxul gastroesofagian, constipația și complicațiile acesteia, fisurile anale, ca tratamente alternative la medicamentele care pot provoca reacții adverse.

În studiul de față, am dezvoltat un supliment alimentar pentru refluxul gastroesofagian natural. Verificarea eficacității acestuia a fost determinată pe baza unui studiu clinic prospectiv dublu orb randomizat versus placebo, pe un lot de 28 de pacienți, în baza *Avizului favorabil* al Comisiei de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu".

Rezultatele studiului clinic au indicat următoarele: cu 78% a fost mai eficient tratamentul cu Suplimentul alimentar pentru reducerea refluxului gastroesofagian față de placebo; rezultă că 1,28 persoane trebuie să consume "Suplimentul alimentar pentru reducerea refluxului alimentar" nou, corect, pentru ca la o persoană să fie redus refluxul gastroesofagian pe durata studiată comparativ cu placebo; niciun pacient inclus în studiul clinic în cele două grupuri, nu a prezentat reacții adverse. Datorită rezultatelor pozitive ale studiului clinic, am depus Cererea de Brevet de Invenție. Brevetul de invenție cu numărul a fost publicat Web of Science.

Pentru tratamentul alternativ al fisurilor anale, am dezvoltat un cicatrizant natural. Verificarea eficacității noului cicatrizant pentru fisuri anale este realizată cu ajutorul studiului clinic dublu orb randomizat prospectiv de evaluare a eficacității cicatrizantului versus placebo pe 50 pacienți. Acesta a început în anul 2014, în prezent fiind în desfășurare, în baza *Avizului favorabil* al Comisie de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj – Napoca. Noul cicatrizant este un unguent hidrofob, diadermic și stimulează producerea elastinei și regenerarea celulelor epiteliale, ceea ce conduce la accelerarea procesului de vindecare a pacienților care suferă de fisuri anale. Cicatrizantul prezintă caracteristici (aspect, miros, tixotropie, capacitatea de întindere, stabilitatea, pH-ul) corespunzătoare.

Pentru dezvoltarea anumitor produse alimentare pentru stări de nutriție specială – constipația, am realizat o cercetare experimentală pe șobolanii Wistar, în care am verificat eficacitatea sericinei în tratamentul constipației provocată de opiacee. Doza de lactoferină și sericină s-a calculat având în vedere nivelul maxim de utilizare a lactoferinei în produsele alimentare pentru scopuri medicale speciale de maxim 3 g/ zi. Astfel, cantitatea de sericină, respectiv lactoferină bovină administrată/ animal/ zi a fost 13 mg. Cercetarea experimentală s-a realizat conform legislației naționale în vigoare și în baza *Avizului favorabil* emis de Comisia de Etică a UMF "Iuliu - Hațieganu" Cluj – Napoca.

S-a observat că fecalele șobolanilor hrăniți cu sericină, au cel mai mare: Brix, respectiv cel mai mare conținut mediu de glucide și cea mai mare deformare plastică, ceea ce înseamnă că aceste fecale au conținutul cel mai mare de apă. Valoarea medie a pH-ului fecalelor șobolanilor din lotul "sericină", indică faptul că sericina nu a schimbat pH-ul fecalelor, fiind păstrat tot în intervalul bazic.

Cercetarea realizată pe șobolanii Wistar hrăniți cu sericină și lactoferină bovină, în cantitate de 13 mg/ cap/ zi oferă primele rezultate privitoare la: plasticitatea fecalelor, conținutul de glucide a fecalelor prin metoda refractometrică, analiza biochimică a urinei șobolanilor, utilizarea sericinei la doza echivalentă a 3 g/ zi pentru consum uman, ameliorarea constipației provocată de opiacee, necesitatea utilizării noului tip de cuști metabolice într-o astfel de cercetare experimentală și menținerea alcalinității fecalelor. De asemenea, s-a observat că administrarea sericinei nu modifică parametrii biochimici ai urinei. Conform cercetătorilor japonezi, consumul de sericină: crește cantitatea de IgA și butiric în colon și mucoase și scade riscul apariției cancerului

de colon și a colitei ulcerative, scade cantitatea trigliceridelor din ficat și ser, se îmbunătățește toleranța la glucoză și sericina este un potențial prebiotic.

Pentru obținerea Avizului favorabil al Comisiei Europene pentru autorizarea introducerii pe piață a sericinei ca ingredient alimentar nou, în temeiul Regulamentului (UE) 2283/ 2015, am depus la Comisia Europeană dosarul cu numărul NF 2018/ 0580.

Așa cum am prezentat și în lucrarea "Legătura între alimente, factorii psihosociali și suferință", " Calitatea vieții a fiecărui individ se regăsește în starea de bine, sănătate, adaptare, satisfacție, bucurii și fericire. Prin complexitatea sa, sănătatea cuprinde bunăstarea fizică, psihică și socială, echilibru între psihicul și fizicul ființei umane și îndeplinirea adecvată a aspirațiilor și nevoilor sale. La acestea se adaugă aspectele biologice prin integritatea morfologică, funcțională și homeostazia internă, psihologic din punct de vedere cognitiv, emoțional și comportamental, respectiv social și spiritual. Prin procesele fiziologice specifice, alimentele și modul de servire a acestora sunt esențiale pentru sănătate și calitatea vieții, indiferent de vârstă, acestea contribuind și la dezvoltarea culturală, socială și psihologică și obținerea satisfacției. Calitatea biologică a produselor alimentare de origine animală, consumate este condiționată de specia și rasa, vârsta, modul de creștere, inclusiv hrana (furajele) și tratamentele aplicate animalelor. Valoarea biologică a alimentelor de origine vegetală este direct proporțională cu zona geografică și zona de relief în care sunt cultivate furajele folosite în hrana animalelor și de tipul agriculturii aplicată – intensivă, sau ecologică.

Modul de consum și de percepție a alimentelor influențează percepția mâncării și sunt influențate de textura, gustul, aroma și culorile alimentelor. La acestea se adaugă ambientul, muzica, zgomotul și stresul, precum și dacă sunt consumate în familie, sau cu prietenii, sau singuri. Mass-media este un factor determinant în modul de consum și de percepție a alimentelor, atât în România, cât și în alte țări. Hedonismul este influențat inclusiv de muzica ascultată în timpul consumului de alimente, sau băuturi alcoolice, de tipul alimentelor și băuturilor, precum și de celebritățile muzicale care promovează un aliment, sau o băutură." În cadrul acestei lucrări, am prezentat piramida privind legătura între alimente, factorii psihosociali și suferință.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

The development of new products in the therapy of chronic digestive diseases

PhD Student **Irina Mihaela Matran**

PhD Scientific Coordinator Prof.dr. **Dan Lucian Dumitrașcu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	21
1. Gastroesophageal reflux	21
1.1. Causes of gastroesophageal reflux	21
1.2. Experimental models of treatment of the gastroesophageal reflux	22
1.3. Alternative and pharmacological treatment for GER	24
1.4. Adverse reactions, overdoses and food related warnings/ interactions for GER	29
2. CONSTIPATION	31
2.1. Causes of constipation	31
2.2. Experimental methods of constipation	33
2.3. Alternative treatments for constipation and annal fissures	35
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis /objectives	43
2. General methodology	45
3. Study 1. Development of a dietary supplement to reduce gastroesophageal reflux	46
3.1. Introduction	46
3.2. Working hypothesis	46
3.3. Material and method	47
3.4. Results	50
3.5. Discussions	54
3.6. Conclusions	58
4. Study 2. Development of a treatment for annal fissures	60
4.1. Introduction	60
4.2. Working hypothesis	60
4.3. Material and method	61
4.4. Results	72
4.5. Discussions	76
4.6. Conclusions	77
5. Study 3. Determination of sericin efficacy in the treatment of	78

opiate-induced constipation	
5.1. Introduction	78
5.2. Working hypothesis	79
5.3. Material and method	80
5.4. Results	82
5.5. Discussions	84
5.6. Conclusions	86
6. General conclusions (synthesis)	88
7. Originality and innovative contributions of the thesis	92
REFERENCES	96

Key words: BRGE, constipations, annal fissures, treatment, dietary supplement, sericin.

INTRODUCTION

The quality of life is the fundamental element of the contemporary world. Regardless of the field, development and performance are based on quality, which can only be achieved through constant change and the health of the population. Since the twentieth century, change is the core of all companies that are forced to react to market pressures. Addressing change by companies obliges employees to rapidly adopt change based on knowledge, updated and constantly verified in practice. Organizations need their most important assets - human resources, in full performance, health, dedication, attachment and creativity.

Along with the development and performance, for an important part of the population, the pressure of change brings change of lifestyle and the occurrence of chronic digestive diseases. These occur not only among adults but also children, due to a change in family unity, caused both by gender equality and by the cultural, social and psychological development of parents.

Two of the chronic digestive diseases encountered in both children and adults are gastroesophageal reflux and constipation accompanied by anal fissures or not. Access to information, as well as drug-related adverse reactions, make research and development of treatments increasingly evolving.

The PhD Thesis targeted three objectives:

1. Development of a food supplement for gastroesophageal reflux and patenting it;
2. Development of a natural treatment on anal fissures;
3. Determining the efficacy of sericin in treating opiate-induced constipation and submitting the dossier to the European Commission in order to obtain a favorable scientific advice for the introduction of sericin as a novel food ingredient.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The first part of the thesis, entitled *Current stage of knowledge*, synthesizes the most important data from the literature on functional digestive disorders set in its objectives - gastroesophageal reflux and constipation. The definition and classification of gastroesophageal reflux and constipation, the causes of their occurrence, the experimental models and alternative (including patented) and pharmacological treatments that were marketing authorization at the time of doctoral research were presented. Adverse reactions, overdose and food-related warnings / interactions of gastroesophageal reflux and constipation have also been reported.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

The second part of the thesis, entitled Personal Contributions, presents the working hypotheses, the general methodology, the materials and methods underlying the development of new products for the therapy of chronic digestive diseases - gastroesophageal reflux, constipation and anal fissures.

The general methodology underlying the development of the two new products for the treatment of chronic digestive diseases comprised basic

gastroenterological gastroenterology and anal fissure disease, general and therapeutic pharmacology, pharmaceutical chemistry, pharmacognosis, pharmaceutical technology, drug control and pharmacovigilance.

The verification of the existence / lack of some formulas close to those developed within the doctoral research was done using the internet and the OSIM and Espacenet databases.

For the clinical evaluation of the efficacy of the two products for the treatment of gastroesophageal reflux and anal fissures, the general methodology also included the national legislation applicable to clinical trials concerning the approval of the Guide to the Application Form and the documentation to be sent to the ethics committee for opinion on the conduct of a clinical study with medicinal products for human use in Romania and the Regulation of the Ethics Committee of the Scientific Research of UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj - Napoca.

Favorable Opinions of the Ethics Commission of UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj - Napoca were obtained and all patients included in the clinical trial fulfilled the inclusion criteria and signed the Information Form and the Acceptance Form.

In addition to the knowledge and regulation of the ethics committee of the Iuliu Hațieganu University of Medicine, Cluj-Napoca, the general methodology for determining sericin efficacy in the treatment of rodent opiate-induced constipation and submitting the dossier to the European Commission in order to obtain a favorable scientific opinion for the introduction sericin as a novel food ingredient was based on the application of national legislation on the protection of animals used for scientific purposes and the Analytical, Pharmacotherapeutic and Clinical Standards and Protocols relating to the testing of medicinal products, Regulation No. 2283 of 25th of November 2015 on novel foods, Regulation (EU) No. 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No. 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No. 1852/2001.

Study 1. Development of a dietary supplement to reduce gastroesophageal reflux

For patients suffering from gastroesophageal reflux there is a wide range of drugs and dietary supplements that reduce gastric hyperacidity or gastroesophageal reflux as well as alternative methods. To all this is added the change of lifestyle.

Since dental erosions are a pathology considered as comorbid in gastroesophageal reflux disease, it is necessary to address this extraesophageal complication of the disease which manifests itself by tissue loss that causes the morphology and the size of the dental crown to change, advancing in serious cases until the opening of the pulp chamber loss of pulp vitality. The mean frequency of dental erosions in patients with GER is 48.8% according to literature data. The quality of life of patients with these lesions is severely affected by dental pain and functional aesthetic disorders, masticatory. No solution identified in the OSIM and Espacenet databases treats the increase in pH in the oral cavity and prevents or stagnates the evolution of dental erosions, common lesions in the case of gastroesophageal reflux disease and caused by the acute attack of gastric secretions in the oral cavity, on the teeth.

Primary raw materials with antihistamine, prostaglandin, gastrointestinal protection, hepatic protection, capillary protection, analgesic action, antimicrobial - anti Gram + and anti Gram action were identified. The raw material that can provide dental protection has been identified through the films that are formed and how to prepare the dietary supplement for reducing gastroesophageal reflux. The new developed product is natural and provides an alternative solution for the treatment of RGE disease. Compared to existing gastroesophageal reflux products available on the market, the new product (food supplement) resulting from research and development and clinically studied has the following advantages: a synergistic effect on both the oral cavity and the stomach; systemic action; dental protection, through the lipid-forming films (cocoa butter); remineralizing dental enamel and stimulating the absorption of natural H2 antihistamines, due to sodium bicarbonate that increases pH in the oral cavity; is easy to administer; does not contain preservatives, gluten, lactose, or other synthetic substances; did not have side effects; the total number of episodes of reflux is reduced by 24 hours, the number of episodes of reflux over 5 minutes, and the longest reflux. The effectiveness of the dietary supplement to reduce gastroesophageal reflux was assessed using a prospective, randomized, double-blind randomized versus placebo clinical trial in the Cluj-Napoca Medical Clinic, in which 28 patients were included.

The product was patented and published in the Web of Science.

Study 2. Developing a treatment for anal fissures

Although there are drugs and alternative products for the treatment of anal fissures on the market, our study aimed at developing a new 100% natural treatment, a diadermal ointment, with ecotype Butirum cocoa excipients.

Raw materials have been identified with the following potential clinical significance: reduction of discomfort in the skin, hemorrhoidal veins and anal mucous membranes, stimulation of membrane permeability, flexibility of cell membranes, antiviral, antifungal, antibacterial, antioxidant, antiinflammatory, emotive, antiseptic, healing, stimulation of elastin production, soothing, anticancerous, regenerating epithelial cells, anti-allergic, fighting the risk of bleeding.

We also presented the technological flow of obtaining the new treatment for anal fissures, as well as analyzes for sensory parameters and physico-chemical and pharmacological parameters (thixotropy, stretchability, stability, pH).

Currently, the randomized double-blind clinical trials versus placebo trial is in progress, with results being interpreted and presented after completion.

Study 3. Determination of sericin efficacy in the treatment of opiate-induced constipation.

In recent years, sericine produced by extraction from textile industry waste to obtain silk yarns has been increasingly investigated, both in the field of medicine - antidiabetes, nerve cell repair following ischemic stroke, tissue regeneration, antioxidant, anticoagulant, inhibition of cancer cells, pharmaceuticals, cosmetics and the food industry.

The main objective was to determine the efficacy of sericin in relieving morphine constipation in order to research and develop a new food to prevent / improve constipation.

Experimental research was conducted on Wistar rats, healthy females and males. They were divided into three lots, each batch having 12 units (control, sericin, bovine lactoferrin) and at the start of the study, the rats were weighed and placed in marked individual cages. The preclinical study was performed under controlled microclimate conditions, depending on species specificity. Throughout the period of fundamental research, food and water consumption, each cage, with individual nutritionists and nutritionists, was monitored. Two types of metabolic cages were used: standard metabolic cages and metabolic cages designed and developed by Eng. Eugen Botan.

20 g / animal / day fodder was purchased from the Cantacuzino National Research Institute -Romania, serum was purchased from XiAn Zhongyun Biotechnology CO., LTD, China, and bovine lactoferrin "Vivinal Lactoferrin TD" was provided by KUK Romania, manufacturer FrieslandCampina DMV BV, the Netherlands.

The lactoferrin and sericine dose was calculated taking into account the maximum level of lactoferrin in food for special medical purposes of up to 3 g / day. (Commission Implementing Decision 2012/727 / EU authorizing the placing on the market of lactoferrin as a novel food ingredient under Regulation (EC) No. 258/97 of the European Parliament and of the Council (FrieslandCampina) - for human consumption. Thus, the amount of sericin and bovine lactoferrin administered / animal / day was 13 mg.

Research on Wistar rats fed with sericin and lactoferrin bovine in an amount of 13 mg / unit / day provides the first results on: faecal plasticity, carcass content using refractometric method, biochemical urine rat analysis, use of serum at the equivalent dose 3 g / day for human consumption, amelioration of opiate-induced constipation, the need to use new type of metabolic cages in such experimental research, and the maintenance of alkaline faeces.

GENERAL CONCLUSIONS

- The dietary supplement for reducing gastroesophageal reflux with synergistic effect on both the oral cavity and the stomach is a natural and easy-to-administer adjuvant in the case of gastroesophageal reflux and / or pyrosis episodes. This is an alternative for patients who are under long-term treatment with IPPs.
- Because the food supplement does not contain preservatives, gluten, lactose or other synthetic substances, it can also be given by people who are lactose or gluten-intolerant and have gastroesophageal reflux or pyrosis.
- Compared with gastroesophageal reflux products available on the market, the food supplement resulting from research and development and clinically studied have the following advantages: dental protection, through lipid-forming films (cocoa butter); remineralizing dental enamel and stimulating the absorption of natural H2 antihistamines, due to sodium bicarbonate that increases pH in the oral cavity; is easy to administer; did not have side effects; the total number of episodes of reflux is reduced by 24 hours, the number of episodes of reflux over 5 minutes, and the longest reflux; the therapeutic effect of the food supplement for reducing gastroesophageal reflux is due to antihistamine, prostaglandins, gastrointestinal protection, hepatic protection, capillary protection, analgesic action, anti-Gram + and anti Gram

anthrobicidal action; the phytotherapeutic complex of the invention is unique; the dietary supplement has positive effects (reducing the total number of episodes of reflux by 24 hours, the number of episodes of reflux over 5 minutes, and the longest reflux time, reducing episodes of pyrosis) in patients suffering from esophagitis class A Los Angeles, esophagitis class B Los Angeles, non-erosive gastroesophageal reflux disease, erosive gastroesophageal reflux disease, persistent pyrosis, reactive gastritis; due to the way of packaging, the food supplement for reducing the food reflux subject to the invention is easy to administer and can be taken both at the office and in the car and can be administered whenever necessary to reduce gastroesophageal reflux and its symptoms; the dietary supplement is a natural alternative to reducing reflux without side effects and is an adjuvant in the prevention of dental erosions; following a randomized double-blind clinical trial versus placebo for verifying the effectiveness of the dietary supplement to reduce RGE, its formulation is protected at OSIM by the RO132472-A0 patent; following the obtaining of the Patent for Invention, the food supplement will be approved at the Institute of Food Bioresources.

- The new healing agent is a hydrophobic, diadermic ointment and stimulates elastin production and regeneration of epithelial cells, which leads to accelerating the healing process of patients suffering from anal fissures; the treatment has characteristics (appearance, odor, thixotropy, tensile strength, stability, pH); this product is natural, 100% and does not contain synthesis substances; the results of the "Double randomized clinical trial evaluating the efficacy of the treatment for anal fissures versus placebo in 50 patients" will be interpreted and presented after completion of the clinical trial.

- From the two glycoproteins analyzed, serum had the best efficacy in relieving morphine-induced constipation. Following biochemical urine analysis, there were no changes in the renal and hepatic systems at 13 mg serum / unit / animal / day; sericin has a potential new ingredient for: the manufacture of dietary foods for special nutritional states and the pharmaceutical industry; based on this experimental research and research on general toxicity and genotoxicity as well as the use of sericin in biomedicine, I filed a dossier under NF2018 / 0580 to obtain a favorable scientific opinion for the use of sericin as a novel food ingredient.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THESIS

In this study we aimed to develop new products for chronic digestive diseases - gastroesophageal reflux, constipation and its complications, anal fissures, as alternative treatments to drugs that can cause side effects.

In this study, we developed a dietary supplement for natural gastroesophageal reflux. Its efficacy was verified on the basis of a randomized double blind prospective randomized clinical trial versus placebo on a batch of 28 patients based on the *favorable opinion* of the UMF Ethics Committee "Iuliu Hațieganu".

The results of the clinical study indicated the following: 78% was more effective in treating Gastroesophageal Reflux Supplement than placebo; it results that 1.28 people should eat the "new dietary supplement" to correct the gastroesophageal reflux over the study period as compared to placebo; no patient included in the clinical study in the two groups showed any adverse reactions. Due to the positive results of the

clinical trial, we filed the Patent Application for Invention. The patent of the invention was published by Web of Science.

For the alternative treatment of anal fissures, we developed a natural treatment. Checking the efficacy of the new anal fissure treatment is done with the prospective randomized double blind clinical trial evaluating efficacy of treatment vs. placebo in 50 patients. It started in 2014 and is currently underway on the basis of the favorable opinion of the Ethics Committee of UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj - Napoca. The new treatment is a hydrophobic, diaderic ointment and stimulates elastin production and epithelial cell regeneration, which leads to accelerating the healing process of patients suffering from anal fissures. The treatment has characteristics (appearance, odor, thixotropy, tensile strength, stability, pH).

For the development of certain foods for special nutritional states - constipation, we conducted an experimental research on the Wistar rats, in which we tested the efficacy of sericin in the treatment of opiate-induced constipation. The lactoferrin and sericine dose was calculated taking into account the maximum level of lactoferrin in food for special medical purposes of up to 3 g / day. Thus, the amount of sericin and bovine lactoferrin administered / animal / day was 13 mg. The experimental research was carried out according to the national legislation in force and based on the favorable opinion issued by the Ethics Committee of UMF "Iuliu - Hațieganu" Cluj - Napoca.

Serum-fed rat faeces were found to have the highest: Brix, respectively, the highest average carbohydrate content and the highest plastic deformation, which means that these faeces have the highest water content. The mean pH of the serpent faeces in the serum serum indicates that serum did not change the pH of the faeces, and was maintained throughout the baseline.

Research on Wistar rats fed with sericin and lactoferrin bovine in an amount of 13 mg / unit / day provides the first results on: faecal plasticity, faecal carbohydrate content using refractometric method, biochemical urine rat analysis, use of serum at the equivalent dose 3 g / day for human consumption, amelioration of opiate-induced constipation, the need to use new type of metabolic cages in such experimental research, and the maintenance of alkaline faeces. It has also been observed that serum administration does not alter the biochemical parameters of urine. According to Japanese researchers, serum consumption: increases the amount of IgA and butyrate in the colon and mucous membranes and lowers the risk of colon cancer and ulcerative colitis, lowers the amount of triglycerides in the liver and serum, improves glucose tolerance, and sericin is a probiotic potential.

In order to obtain the favorable opinion of the European Commission authorizing the placing on the market of serum as a novel food ingredient under Regulation (EU) 2283/2015, we filed with the European Commission file NF 2018/0580.

As we have also presented in the paper "The Relationship Between Food, Psychosocial Factors and Suffering," "The quality of every individual's life is found in the state of well-being, health, adaptation, satisfaction, joy and happiness." By its complexity, health encompasses physical well-being, psychological and social balance, the balance between the psyche and the physical of the human being, and the adequate fulfillment of his / her aspirations and needs, to which are added the biological aspects through morphological, functional and internal homeostasis, psychologically cognitive,

emotional and behavioral, respectively social and spiritual. By specific physiological processes, food and their way of serving are essential to health and quality of life, regardless of age, and they contribute to cultural, social and psychological development and satisfaction. Mate is conditioned by species and breed, age, mode of growth, including feed (feed) and treatments applied to animals. The biological value of food of plant origin is directly proportional to the geographical area and the area where the feed used for animal feed and the type of intensive or organic farming is cultivated.

Food consumption and perception patterns influence the perception of food and are influenced by the texture, taste, flavor and color of the food. These include environmental, music, noise and stress, as well as if they are consumed in the family, or with friends, or alone. Media is a determining factor in how to consume and perceive food in both Romania and other countries. Hedonism is also influenced by music played during food consumption, alcoholic beverages, food and beverages, as well as musical celebrities promoting a food or drink. "In this paper, we presented the pyramid on the link between food, psychosocial factors and suffering.