

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
FARMACIE**

**INTERDEPENDENȚA INFLAMAȚIE – STRES
OXIDATIV. METODE MODERNE DE EVALUARE A
DEZECHILIBRELOR REDOX ÎN SISTEMELE
BIOLOGICE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. MARGINĂ DENISA

Student-doctorand:

UNGURIANU ANCA

2019

Cuprins

Introducere.....	17
1. Implicațiile fiziopatologice ale stresului oxidativ.....	21
1.1. Introducere	21
1.2. Specii reactive de oxigen.....	21
1.3. Implicațiile fiziologice ale stresului oxidativ.....	22
1.4. Implicațiile patologice ale stresului oxidativ	22
1.4.1 Diabetul zaharat de tip 2	23
1.4.2 Obezitatea.....	23
1.4.3 Bolile cardiovasculare.....	24
1.4.4 Bolile inflamatorii	24
1.4.5 Afecțiunile renale.....	25
1.4.6 Bolile neurologice și neurodegenerative.....	25
1.4.7 Maladiile neoplazice	25
1.4.8 Fumatul	26
1.4.9 Procesul de îmbătrânire.....	26
1.5. Apărarea antioxidantă.....	26
1.5.1 Acidul ascorbic	27
1.5.2 Tocoferolii.....	27
1.5.3 Flavonoidele.....	28
1.5.4 Polifenolii.....	28
2. Procesele inflamatorii	29
2.1. Introducere	29
2.2. Mecanismele răspunsului inflamator	29
2.3. Mediatorii inflamației	30
2.4. Implicațiile patologice ale inflamației	32
2.4.1 Inflamația cronică de intensitate scăzută	32

2.4.2	Implicațiile radicalilor liberi	35
3.	Markeri de evaluare ai statusului redox	36
3.1.	Introducere	36
3.2.	Produșii de glicare avansată ai proteinelor	36
3.3.	Produșii de oxidare avansată ai proteinelor	37
3.4.	Determinarea lipoxidării	37
3.5.	Malondialdehida și 4-hidroxinonenalul	38
3.6.	Evaluarea oxidării lipoproteinelor serice	38
3.7.	Măsurarea tiolilor totali din ser.....	39
3.8.	Evaluarea capacității antioxidante	39
4.	Dezvoltarea și optimizarea unei metode fluorimetrice pentru evaluarea statusului redox al lipoproteinelor de înaltă densitate.....	42
4.1.	Introducere. Ipoteză de lucru și obiective.....	42
4.2.	Materiale și metode	43
4.2.1	Designul studiului	43
4.2.2	Prelevarea probelor de sânge	44
4.2.3	Determinarea parametrilor biochimici de rutină	44
4.2.4	Separarea LDL	44
4.2.5	Separarea HDL.....	44
4.2.6	Metoda Amplex Red	44
4.2.7	Analiza statistică	45
4.3.	Rezultate	45
4.4.	Discuții.....	50
4.5.	Concluzii parțiale	51
5.	Evaluarea statusului redox al lipoproteinelor serice la pacienții cu afecțiuni inflamatorii cronice	53
5.1.	Introducere. Ipoteză de lucru și obiective.....	53
5.2.	Materiale și metode	53

5.2.1	Designul studiului	53
5.2.2	Prelevarea probelor de sânge	54
5.2.3	Determinarea parametrilor biochimici de rutină	54
5.2.4	Separarea LDL	54
5.2.5	Separarea HDL.....	54
5.2.6	Metoda Amplex Red	54
5.2.7	Determinarea produșilor de oxidare avansată ai proteinelor	54
5.2.8	Determinarea produșilor de glicare avansată ai proteinelor.....	55
5.2.9	Analiza statistică	55
5.3.	Rezultate	55
5.4.	Discuții.....	60
5.5.	Concluzii parțiale	62
6.	Evaluarea spectrofotometrică și spectrofluorimetrică a legăturii dintre dezechilibre metabolice și peroxidarea lipidică.....	64
6.1.	Introducere. Ipoteză de lucru și obiective.....	64
6.2.	Materiale și metode	65
6.2.1	Designul studiului	65
6.2.2	Reactivi	66
6.2.3	Prelevarea probelor de sânge	66
6.2.4	Determinarea parametrilor antropometrici, biochimici și hematologici de rutină	66
6.2.5	Separarea LDL	67
6.2.6	Separarea HDL.....	67
6.2.7	Prepararea omogenatelor tisulare.....	67
6.2.8	Prepararea suspensiilor mitocondriale	67
6.2.9	Metoda Amplex Red	67
1.1.1	Metoda FOX	68
6.2.11	Dozarea proteinelor.....	68

6.2.12	Analiza statistică	68
6.3.	Rezultate	69
6.3.1	Evaluarea afectării redox la nivel seric	69
6.3.2	Evaluarea statusului redox în omogenate tisulare și suspensii mitocondriale	72
6.4.	Discuții.....	74
6.5.	Concluzii parțiale	76
7.	Efectul fumatului asupra peroxidării lipidice HDL la pacienți cu diabet zaharat de tip 2	77
7.1.	Introducere. Ipoteză de lucru și obiective.....	77
7.2.	Materiale și metode	78
7.2.1	Designul studiului	78
7.2.2	Prelevarea probelor de sânge	78
7.2.3	Determinarea parametrilor antropometrici și biochimici de rutină.....	78
7.2.4	Separarea HDL.....	79
7.2.5	Determinarea peroxidării lipidice a HDL	79
7.2.6	Analiza statistică	79
7.3.	Rezultate	79
7.4.	Discuții.....	83
7.5.	Concluzii parțiale	85
8.	Efectele fumatului asupra statusului inflamator seric într-un grup de pacienți cu diabet zaharat de tip 2.....	86
8.1.	Introducere. Ipoteză de lucru și obiective.....	86
8.2.	Materiale și metode	88
8.2.1	Designul studiului	88
8.2.2	Prelevarea probelor de sânge	89
8.2.3	Determinarea parametrilor biochimici de rutină.....	89
8.2.4	Determinarea parametrilor antropometrici.....	89
8.2.5	Determinarea produșilor de oxidare avansată ai proteinelor	89

8.2.6	Determinarea produşilor de glicare avansată ai proteinelor.....	89
8.2.7	Determinarea lipoperoxidării serice şi de la nivelul lipoproteinelor de înaltă densitate	89
8.2.8	Determinarea proteinei C reactive serice	90
8.2.9	Determinarea interleukinelor 6 (IL-6), 10 (IL-10) şi 1 β (IL-1 β) din ser.....	90
8.2.10	Analiza statistică	90
8.3.	Rezultate	90
8.3.1	Analizarea întregii populaţii de studiu	90
8.3.2	Analizarea grupului de studiu faţă de control	93
8.3.3	Analizarea subgrupurilor de studiu faţă de control	97
8.4.	Discuţii.....	101
8.5.	Concluzii parţiale	104
9.	Efectele asupra statusului redox seric şi tisular ale unui fitopreparat antidiabetic într-un model preclinic de diabet.....	105
9.1.	Introducere. Ipoteză de lucru şi obiective.....	105
9.2.	Materiale şi metode.....	107
9.2.1	Reactivi	107
9.2.2	Prepararea extractelor metanolice a componentelor fitopreparatului	108
9.2.3	Dozarea fenolilor totali	108
9.2.4	Dozarea flavonelor totale	108
9.2.5	Evaluarea <i>in vitro</i> a capacităţii extractelor de a neutraliza radicalii liberi.....	108
9.2.6	Designul studiului pe animale.....	109
9.2.7	Prepararea omogenatelor tisulare şi separarea fracţiei mitocondriale	109
9.2.8	Dozarea proteinelor totale	110
9.2.9	Prelevarea şi prelucrarea probelor de sânge.....	110
9.2.10	Separarea lipoproteinelor serice.....	110
9.2.11	Determinarea cantitativă a insulinei.....	110
9.2.12	Determinarea capacităţii antioxidante serice şi tisulare	110

9.2.13	Determinarea produşilor de glicare avansată ai proteinelor.....	110
9.2.14	Metoda Amplex Red	111
9.2.15	Metoda FOX	111
9.2.16	Analiza histopatologică.....	111
9.2.17	Analiza statistică	113
9.3.	Rezultate	113
9.3.1	Analiza fitochimică	113
9.3.2	Analiza pe întreaga populaţie de studiu	115
9.3.3	Analiza întregului grup de studiu faţă de grupul de control	119
9.3.4	Analiza loturilor grupului de studiu comparativ cu grupul de control.....	124
9.3.5	Analiza comparativă a efectelor diferitelor tratamente antidiabetice asupra histologiei cerebrale și hepatice.....	130
9.4.	Discuții.....	135
9.4.1	Analiza pe întreaga populaţie de studiu	135
9.4.2	Analiza întregului grup de studiu faţă de grupul de control	135
9.4.3	Analiza loturilor grupului de studiu comparativ cu grupul de control.....	136
9.4.4	Examenul histopatologic al grupurilor incluse în studiu	137
9.5.	Concluzii parţiale	137
10.	Efectele unui fitopreparat antidiabetic asupra statusului redox seric într-o populaţie de pacienţi cu diabet zaharat de tip 2	138
10.1.	Introducere. Ipoteză de lucru și obiective.....	138
10.2.	Materiale și metode	139
10.2.1	Reactivi	139
10.2.2	Designul studiului	139
10.2.3	Prelevarea probelor de sânge	140
10.2.4	Determinarea parametrilor biochimici de rutină.....	140
10.2.5	Determinarea parametrilor antropometrici și de istoric ai bolii.....	140
10.2.6	Separarea lipoproteinelor serice.....	141

10.2.7	Determinarea capacității antioxidante serice	141
10.2.8	Determinarea produșilor de glicare avansată ai proteinelor.....	141
10.2.9	Determinarea produșilor de oxidare avansată ai proteinelor	141
10.2.10	Metoda Amplex Red	141
10.2.11	Analiza statistică	141
10.3.	Rezultate	141
10.3.1	Analizarea întregii populații de studiu	141
10.3.2	Analiza întregului grup de studiu față de grupul de control	149
10.3.3	Analiza grupurilor de studiu cu abordări terapeutice diferite comparativ cu grupul de control	155
10.4.	Discuții.....	163
10.5.	Concluzii parțiale	165
11.	Efectele protectoare ale procainei și Gerovitalului H3 asupra peroxidării lipidice la nivel celular și seric	166
11.1.	Introducere. Ipoteză de lucru și obiective.....	166
11.2.	Materiale și metode.....	167
11.2.1	Reactivi	167
11.2.2	Culturi celulare.....	167
11.2.3	Peroxidarea lipidică la nivel mitocondrial	167
11.2.4	Peroxidarea lipidică la nivel seric	168
11.2.5	Susceptibilitatea la peroxidare lipidică prin metoda cu DPPP	168
11.3.	Rezultate	169
11.4.	Discuții.....	172
11.5.	Concluzii parțiale	173
12.	Concluzii și contribuții personale	174
	Bibliografie.....	179
	Anexe	200

Introducere

Alegerea direcției de cercetare dezvoltate în cadrul acestei lucrări a avut drept punct de plecare strânsa legătură a procesului inflamator cu dezechilibrele redox, descrisă în afecțiunile cronice cu o prevalență din ce în ce mai mare la nivel global, precum maladiile metabolice (diabet zaharat, obezitate, dislipidemie, sindrom metabolic), cele cardiovasculare, renale, neurologice și neurodegenerative.

Determinările biochimice de rutină, ce stau la baza evaluării cardiometabolice a pacienților cu afecțiuni cronice metabolice sau la aprecierea riscului de dezvoltare a acestora, sunt măsurători cantitative. Având în vedere că în cadrul proceselor inflamatorii cronice ce însoțesc evoluția acestor afecțiuni, are loc modificarea structurii normale a numeroase componente serice sau tisulare (oxidare, glicare, carbonilare, *crosslinking*), simplele determinări cantitative devin insuficiente.

Tema de cercetare a acestei teze a fost dezvoltarea și optimizarea unor metode simple, rapide și accesibile de evaluare a statusului redox atât la nivel seric, cercetând afectarea lipidelor, proteinelor și lipoproteinelor serice, cât și la nivel tisular, celular și mitocondrial.

Obiectivele generale propuse au fost:

- Obținerea unui grup de parametri relevanți în evaluarea statusului redox al pacienților cu afecțiuni inflamatorii cronice și utilizarea acestora pentru evaluarea cardiometabolică a unor grupuri de pacienți cu status inflamator diferit, alegând DZT2 drept modelul de inflamație cronică de intensitate scăzută și PAR pentru inflamația cronică de intensitate crescută;
- Dezvoltarea și optimizarea (concentrație, condiții de incubare și citire) unei metode de determinare a peroxidării lipidice la nivel seric și lipoproteic, mai ales a HDL, cu ajutorul sondei fluorimetrice Amplex Red, în absența HRP;
- Adaptarea micrometodei cu AR, având în vedere avantajele în ceea ce privește consumul de reactivi și timpul de analiză, cu posibilitatea automatizării unor etape;
- Optimizarea unor micrometode spectrofotometrice bazate pe XO pentru evaluarea peroxidării și, respectiv, pe ABTS pentru măsurarea capacității antioxidante, la nivel seric, tisular și mitocondrial;

- Măsurarea unor markeri clasici ai inflamației (IL-1 β , IL-6, IL-10 și CRP) și calcularea unor indici ai statusului inflamator, în vederea analizării statusului metabolic și funcției β -pancreatice la pacienți diabetici, cu istoric diferit de fumat;
- Compararea profilului cardiometabolic ilustrat prin markerii redox și inflamatori determinați cu riscul cardiovascular evaluat pe baza profilului metabolic evidențiat de către parametrii biochimici de rutină și evaluarea utilității lor în context clinic;
- Determinarea, în context preclinic și clinic, a efectelor asupra statusului redox seric și tisular ale unui fitopreparat antidiabetic, comparativ cu cele induse de două molecule antidiabetice utilizate pe scară largă: metformin și gliclazid.
- Cercetarea, în cadrul unui studiu pilot, a activității antioxidante a procainei și Gerovitalului H3 (GH3) asupra afectării oxidative și apărării antioxidante și riscului de peroxidare lipidică, la nivel celular, subcelular și seric.

Lucrarea prezintă un caracter interdisciplinar important, întrucât am folosit atât modele experimentale *in vitro*, cât și *in vivo*, aplicând metode rapide și accesibile, având la bază sonde spectrofotometrice și spectrofluorimetrice pentru evaluarea nivelurilor afectării oxidative și a apărării antioxidante. Totodată, am evaluat efectele asupra statusului redox și inflamator cu ajutorul parametrilor dezvoltăți, concomitent cu cei clasici, ale unor molecule și fitopreparate folosite în terapie fie ca primă opțiune farmacoterapeutică, fie ca adjuvanți, utilizând tehnici de culturi celulare, modele preclinice și evaluarea în context clinic.

Astfel, metodele dezvoltate și optimizate în cadrul cercetărilor doctorale sunt unele rapide, accesibile și reproductibile și pot fi utilizate pentru aprecierea statusului redox la nivel seric, tisular și mitocondrial, prezentând posibilitatea de a fi adaptate procesării semi-automate sau automate, fiind pretabile utilizării în studii extinse. Setul de parametri testați s-a dovedit util în discriminarea statusului redox pentru pacienții cu afecțiuni inflamatorii cronice față de cei sănătoși sau în cadrul unor subgrupuri formate pe baza tratamentului sau istoricului de fumat. De asemenea, cu ajutorul parametrilor determinați, alături de cei biochimici de rutină, am analizat efectele unui fitopreparat antidiabetic, atât într-un model preclinic de diabet zaharat, cât și în context clinic, într-o populație de pacienți cu DZT2, asupra afectării redox și apărării antioxidante.

Partea generală

1. Implicațiile fiziopatologice ale stresului oxidativ

1.1. Introducere

Conceptul de stres oxidativ a fost introdus în urmă cu peste 30 de ani (Sies, 2015). Stresul oxidativ reprezintă dezechilibrul între formarea radicalilor liberi și speciilor reactive de oxigen (SRO) și neutralizarea acestora de către sistemele antioxidante celulare. Având în vedere multitudinea de molecule ce pot acționa ca pro- sau antioxidanți, pentru SRO au fost descrise atât roluri fiziologice, cât și implicații patologice (Sies, 2015, Pizzino et al., 2017, Salim, 2017, Frijhoff et al., 2015, Luo et al., 2017, Kattoor et al., 2017, Sack et al., 2017).

1.2. Specii reactive de oxigen

Radicalii liberi sunt specii chimice care prezintă electroni nepereche, având o reactivitate crescută (Khansari et al., 2009). Creșterea formării SRO poate fi atât de natură endogenă, cât și exogenă. Generarea crescută endogenă apare în procesele inflamatorii și infecțioase, neoplasme, activarea celulelor imune, îmbătrânire și exercițiul fizic intens. În urma expunerii la poluanți, metale grele, pesticide, fum de țigară, radiații ultraviolete sau ionizante, la unele molecule medicamentoase (ciclosporina, tacrolimus) sau componente alimentare (carne afumată, grăsimi), are loc creșterea de natură exogenă a formării de SRO (Pizzino et al., 2017, Khansari et al., 2009, Sapbamrer et al., 2019).

1.3. Implicațiile fiziologice ale stresului oxidativ

În concentrații reduse sau moderate, radicalii liberi îndeplinesc roluri fiziologice (Pizzino et al., 2017, Luo et al., 2017, Kattoor et al., 2017), fiind implicați în apărarea antimicrobiană, activarea răspunsului mitogenic și modularea căilor de semnalizare celulară (Pizzino et al., 2017, Luo et al., 2017, Savini et al., 2013, Khansari et al., 2009).

1.4. Implicațiile patologice ale stresului oxidativ

Depășirea capacității celulare de neutralizare a SRO, cu apariția stresului oxidativ, conduce la afectarea structurilor celulare: membrana celulară sau membranele organelor celulare, proteinele, lipidele și acizii nucleici, cu perturbarea semnalizării redox fiziologice și afectarea structurilor celulare, poate contribui la dezvoltarea unor maladii cronice: diabet zaharat, obezitate, boli cardiovasculare, renale și neurodegenerative (Pizzino et al., 2017, Frijhoff et al., 2015, Luo et al., 2017, Kattoor et al., 2017, Salim, 2017).

1.5. Apărarea antioxidantă

Apărarea antioxidantă endogenă este formată din numeroase sisteme enzimatică, precum superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT), glutatión peroxidaza (GP), paraoxonaza (PON) și non-enzimatică, incluzând glutatiónul, acidul lipoic, acidul uric, coenzima Q (Pizzino et al., 2017, Salim, 2017, Savini et al., 2013, Khansari et al., 2009). Antioxidanții exogeni vin în sprijinul celor endogeni, fiind fie de origine alimentară, fie administrați ca suplimente alimentare (Pizzino et al., 2017).

2. Procesele inflamatorii

2.1. Introducere

Inflamația este un mecanism celular de adaptare, fiind declanșat de către stimuli nocivi sau în condiții dăunătoare, precum infecțiile sau leziunile tisulare, având drept scop refacerea homeostaziei tisulare (Medzhitov, 2008, Nathan, 2002, Calder et al., 2017, Minihane et al., 2015, Kotas and Medzhitov, 2015).

2.2. Mecanismele răspunsului inflamator

Răspunsul inflamator acut din infecții sau leziuni tisulare implică redistribuirea la locul afectat a plasmei și leucocitelor (Medzhitov, 2008). Stadiul inițial al procesului, recunoașterea stimulului infecțios/lezional, este mediat de către macrofagele și mastocitele de la nivel tisular, care produc o serie de mediatori ai inflamației (chemokine, citokine, amine vasoactive, eicosanoizi). După îndepărtarea patogenilor, în mod normal, are loc refacerea tisulară, în caz contrar se instalează o stare cronică de inflamație (Medzhitov, 2008).

2.3. Mediatorii inflamației

Răspunsul inflamator este reglat printr-o serie de căi celulare complexe, cu numeroase molecule ce funcționează drept mediatori ai inflamației. Căile de semnalizare ale inflamației sunt alcătuite din inductori, senzori, mediatori și efectori (Medzhitov, 2008). Mediatorii inflamației sunt de 7 tipuri: amine vasoactive, peptide vasoactive, fragmente ale căii complementului, mediatori lipidici, citokine, chemokine și enzime proteolitice, fiind sintetizați fie la nivel seric, fie tisular (Medzhitov, 2008, Glass et al., 2010).

2.4. Implicațiile patologice ale inflamației

Inflamația cronică este o stare patologică prelungită, caracterizată prin infiltrarea tisulară a celulelor sistemului imunitar (monocite, macrofage, limfocite), alături de distrugerea și fibrozarea

acestui. Efectele asociate inflamației cronice au la bază generarea excesivă de radicali liberi și diminuarea rezervelor de antioxidanți (Khansari et al., 2009).

2.4.1 Inflamația cronică de intensitate scăzută

Inflamația cronică de intensitate scăzută este un proces dăunător, ce poate sta la baza perturbării funcțiilor tisulare normale (Calder et al., 2017). Cauzele și mecanismele proceselor inflamatorii cronice de intensitate scăzută nu sunt încă pe deplin elucidate (Bonaccio et al., 2017, Minihane et al., 2015, Medzhitov, 2008). În etiologia acestora nu par a fi implicați factorii clasici asociați procesului inflamator, infecțiile sau leziunile tisulare, ci mai degrabă o afectare a funcționării normale tisulare, cu perturbarea homeostaziei unor sisteme fiziologice, fără implicare directă în apărarea antimicrobiană sau regenerarea tisulară (Medzhitov, 2008).

2.4.2 Implicațiile radicalilor liberi

Interacțiunea celulelor sistemului imunitar cu inductorii endogeni și exogeni ai inflamației este însoțită de generarea radicalilor liberi și SRO, cu stimularea sintezei de chemokine și citokine proinflamatorii (Khansari et al., 2009). Acestea, prin activarea căilor celulare specifice de semnalizare, sporesc stresul oxidativ, formându-se un ciclu inflamație – stres oxidativ, cu amplificarea efectelor lezionale (Khansari et al., 2009).

Pentru contracararea efectelor distructive, este necesară activitatea susținută a mecanismelor antioxidante și de refacere a ADN-ului. În cazul inflamației cronice, din cauza epuizării antioxidanților, afectarea structurilor celulare poate fi marcată, cu creșterea riscului de dezvoltare a unor maladii cronice (Khansari et al., 2009, Nathan, 2002).

3. Markerii de evaluare ai statusului redox

Având în vedere implicațiile fiziologice, dar mai ales patologice ale balanței redox și, implicit, a stresului oxidativ, evaluarea statusului redox în sistemele biologice ar trebui să facă parte dintre determinările biochimice de rutină.

Markerii biochimici relevanți în clinică sunt aceia care au utilitate în diagnosticarea uneia ori mai multor maladii sau în aprecierea riscului de dezvoltare a acestora și care să se coreleze cu evoluția patologiei (Frijhoff et al., 2015). Totodată, trebuie să fie relativ stabili în proba biologică prelevată și să se găsească la un nivel ușor accesibil (ser, urină, piele, salivă) (Frijhoff et al., 2015). Dintre markerii utilizați în evaluarea statusului redox, de interes pentru lucrarea de față au fost: producția de glicare sau oxidare avansată a proteinelor, producția lipoxidării, markerii de afectare redox ale lipoproteinelor serice și evaluarea capacității antioxidante.

Partea originală

4. Dezvoltarea și optimizarea unei metode fluorimetrice pentru evaluarea statusului redox al lipoproteinelor de înaltă densitate

4.1. Introducere. Ipoteză de lucru și obiective

Obiectivele studiului au fost:

- Dezvoltarea unei metode de determinare a peroxidării lipidice a lipoproteinelor serice, mai ales a HDL, bazată pe utilizarea sondei fluorimetrice Amplex Red;
- Optimizarea metodei cu Amplex Red pentru evaluarea peroxidării lipidice fără HRP;
- Evaluarea influenței concentrației de AR, condițiilor de incubare (timp, expunerea la radiații luminoase) și înregistrării rezultatelor (citire la punct fix, citiri multiple) asupra autooxidării sondei și a metodei.

4.2. Materiale și metode

În prima etapă a studiului, pentru testarea metodei și evaluarea utilității acesteia în aprecierea statusului redox al lipoproteinelor serice, probe de ser au fost recoltate de la un grup de 20 de pacienți internați la Institutului de Geriatrie și Gerontologie (INGG) “Ana Aslan” București, România. În a doua etapă a studiului, pentru evaluarea influenței concentrației, timpului de incubare și citirilor multiple asupra metodei, am folosit un număr restrâns de probe (n=4) dintre cele utilizate anterior pentru mai multe măsurători în vederea stabilirii parametrilor optimi ai metodei.

Pentru separarea LDL am folosit o soluție de precipitare cu 100 UI/mL heparină în tampon citrat 0,064 M, iar pentru HDL un reactiv de separare cu acid fosfotungstic 1,4 mM și clorură de magneziu 8,6 mM.

Amplex Red (Life Technologies, SUA) a fost utilizat pentru obținerea unei soluții stoc de 20 mM în DMSO, din care s-au preparat soluții de lucru de 600 μ M (pentru prima etapă a studiului) și 300 μ M (pentru a doua etapă a studiului) în tampon fosfat pH=7,4 (Biochrom AG, Germania).

Probele (50 μ L) au fost incubate cu soluția de AR 600 sau 300 μ M (50 μ L) timp de 5, 15 sau 30 de minute, la temperatura camerei și ferite de lumină. Ulterior, amestecul a fost diluat la 2000 μ L cu tampon fosfat pH=7,4 și a fost măsurată intensitatea fluorescenței la $\lambda_{excitație}=544\text{nm}/\lambda_{emisie}=585\text{nm}$, la un spectrofluorimetru Perkin Elmer LS 50B (Perkin Elmer, SUA). Pentru fiecare probă, am făcut trei măsurători la 60 de secunde distanță.

4.3. Rezultate

În figura 4.1, este prezentat spectrul matorului (ARm) comparativ cu trei spectre ale probelor diferitelor fracții lipoproteice separate dintr-o probă de ser (ARhdl, ARldl și, respectiv, ARvldl/ldl).

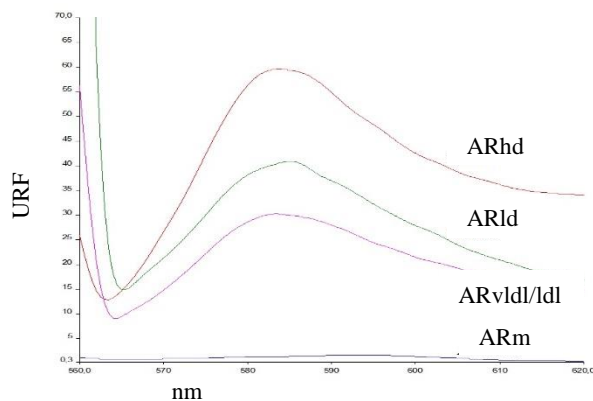


Figura 4.1 Compararea spectrelor matorului (ARm) cu cele a lipoproteinelor izolate (ARhdl, ARldl, Arvldl/ldl)

S-a observat o corelație semnificativă, pentru întreg grupul de studiu, între GLI și ARhdl, $r=0,851$ și $p<0,001$. Astfel, am analizat rezultatele raportat la valoarea glicemiei, constituind două subgrupuri: pacienți normoglicemici ($GLI<110$ mg/dL, $n=13$) și pacienți hiperglicemici ($GLI>110$ mg/dL, $n=7$). Afectarea redox a lipidomului celor două fracții lipoproteice, LDL și HDL, a fost mai accentuată în cazul subiecților cu glicemia mai mare (Figura 4.2), însă nu semnificativ ($p=0,168$ și, respectiv, $p=0,099$).

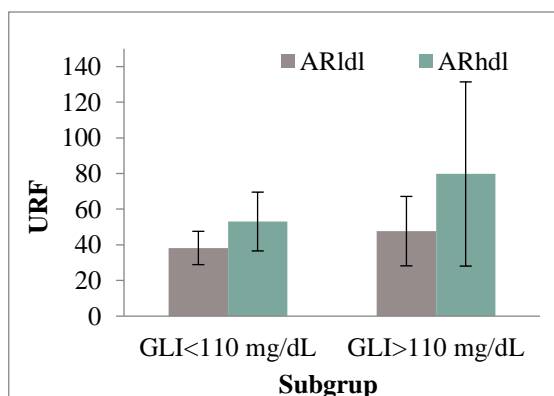


Figura 4.2 Variația peroxidării lipidice a LDL și HDL în cele două subgrupuri constituite pe baza valorilor glicemiei

4.4. Discuții

Este bine cunoscut faptul că HDL exercită un efect protector și antioxidant raportat la LDL (McPherson et al., 2007). Cu toate acestea, mulți dintre pacienții care au suferit evenimente

cardiovasculare aveau niveluri normale sau crescute la HDL (Navab et al., 2006). Astfel, a apărut ipoteza că simpla dozare a nivelurilor serice ale acestei fracții lipoproteice nu este suficientă pentru buna evaluare a riscului cardiovascular. În acest studiu, am încercat să dezvoltăm o metodă rapidă și accesibilă pentru evaluarea statusului lor redox, acesta fiind direct legat de efectele protectoare exercitate.

Mai întâi am evaluat autofluorescența sondei în domeniul spectral de interes și nu am găsit un semnal fluorescent semnificativ. Apoi, am aplicat metoda dezvoltată pentru determinarea peroxidării lipidice a lipoproteinelor izolate din ser, analizând datele obținute în funcție de nivelurile glucozei, trigliceridelor și HDL. Pentru subiecții din grupul de studiu, am găsit corelații pozitive a glicemiei și trigliceridemieii cu nivelurile peroxidizilor lipidici din HDL, confirmându-se legătura strânsă a acestora cu accentuarea stresului oxidativ și diminuarea efectelor protectoare ale HDL. Ulterior, am testat influența variației concentrației, timpului de incubare și citirilor multiple asupra autooxidării sondei, observând că citirile multiple și creșterea concentrației AR pot stimula acest proces.

Astfel, cu toate că tehnicile de analiză bazate pe AR implicau utilizarea HRP (Kelesidis et al., 2014, Navab et al., 2006, Summers et al., 2013), am reușit să dezvoltăm o metodă care permite determinarea peroxidizilor lipidici de la nivelul lipoproteinelor serice în absența acestei enzime. În urma rezultatelor experimentale, am decis că pentru utilizarea viitoare a metodei, concentrația optimă de sondă este de 300 μ M, cu citire la punct fix după o incubare de 30 de minute, la temperatura camerei, la întuneric.

4.5. Concluzii parțiale

Optimizarea metodei spectrofluorimetrice cu Amplex Red, prezentată în acest capitol, pentru determinarea peroxidării lipidice a lipoproteinelor serice izolate, reprezintă o modalitate rapidă și accesibilă de evaluare a statusului lor redox. Aceasta este relevantă pentru aprecierea riscului cardiometabolic, întrucât simplele determinări cantitative nu reflectă funcționalitatea lipoproteinelor serice. Astfel, ținând cont de implicațiile patologice ale disfuncționalității LDL și HDL, acesta metoda optimizată ar putea constitui o modalitate simplă, rapidă și economică de evaluare calitativă a acestora.

5. Evaluarea statusului redox al lipoproteinelor serice la pacienții cu afecțiuni inflamatorii cronice

5.1. Introducere. Ipoteză de lucru și obiective

Obiectivele studiului au fost:

- Evaluarea peroxidării lipidice a lipoproteinelor izolate HDL și LDL, utilizând metoda dezvoltată anterior cu Amplex Red;
- Determinarea produșilor de oxidare avansată ai proteomului HDL și LDL;
- Măsurarea glicării avansate a proteinelor din ser;
- Compararea statusului redox, evidențiat prin parametrii mai sus menționați, a grupului de studiu, și respectiv a celor două subgrupuri cu status inflamator diferit: intensitate crescută – pacienți cu poliartrită reumatoidă (PAR) și scăzută – pacienți cu DZT2, față de grupul de control;
- Compararea profilului cardiometabolic ilustrat prin parametrii redox descriși anterior cu riscul cardiovascular evaluat pe baza profilului lipidic clasic pentru cele două subgrupuri caracterizate printr-un status inflamator cronic diferit.

5.2. Materiale și metode

Populația studiului a inclus 57 de subiecți, selectați dintre pacienții internați la INGG „Ana Aslan” și de la Clinica „Humanitas CD”, București, România. Populația studiului a fost constituită dintr-un grup de control (GC, n=17) – subiecți sănătoși și un grup de studiu (GS, n=40) – pacienți cu afecțiuni inflamatorii, cu două subgrupuri: pacienți cu DZT2 (n=20) și pacienți cu PAR (n=20), aflați în stadiul de remisie.

Am utilizat metoda dezvoltată și descrisă anterior (capitolul 4), bazată pe sonda fluorimetrică Amplex Red, atât pentru probe de LDL izolat (ARldl), cât și pentru HDL izolat (ARhdl). Rezultatele au fost exprimate în unități relative de fluorescență (URF).

Pentru determinarea produșilor de oxidare avansată ai proteinelor (AOPP) am utilizat un *kit* de analiză OxySelect STA-318 (Cell Biolabs, SUA), iar produșii de glicare avansată ai proteinelor (AGE) au fost determinați conform metodei descrise anterior (Kalousova et al., 2002, Bartling et al., 2011).

Pentru prelucrarea datelor brute, am utilizat IBM SPSS (IBM Corporation, SUA). Datele sunt prezentate ca medie \pm abatere standard, pentru cele cu distribuție normală, sau ca mediană [cuartila 25; cuartila 75], pentru cele distribuite non-normal. Testul Kolmogorov-Smirnov a fost folosit pentru stabilirea tipului de distribuție a fiecărui parametru. Pentru determinarea diferențelor

dintre grupuri (2 sau mai multe), am folosit teste parametrice (testul t-Student sau ANOVA) pentru datele distribuite normal și teste non-parametrice (Mann-Whitney sau Kruskal-Wallis) pentru datele distribuit non-normal. Pentru determinarea corelațiilor dintre parametri, am aplicat metoda Spearman. Valoarea limită $p=0,05$. Acestea au fost aplicate și pentru restul capitolelor tezei.

5.3. Rezultate

Nivelurile HDL ale pacienților cu PAR nu au fost semnificativ diferite față de cele ale GC, însă semnificativ mai mari față de cele ale subgrupului cu DZT2 ($p=0,005$). Cu toate acestea, peroxidarea HDL (ARhdl) a fost semnificativ mai mare în subgrupul de pacienți cu PAR față de GC ($p=0,001$) și similară subgrupului cu DZT2 ($p=0,787$). Totodată, nu am găsit diferențe semnificative în ceea ce privește nivelurile HDL, LDL, CT sau TG între pacienții cu PAR și GC ($p>0,05$).

Cu toate că, din punct de vedere al glicemiei, am observat o diferență semnificativă ($p<0,001$) între cele două subgrupuri, aceasta nu s-a transpus în diferențe semnificative în ceea ce privește AGEs ($p=0,279$), AOPPs ($p=0,152$) sau respectiv AOPP proteomului lipoproteinelor serice (AOPPI dl, $p=0,224$; AOPP hdl, $p=0,946$) și peroxidării lipidice a acestora (ARl dl, $p=0,552$; ARhdl, $p=0,787$).

Corelații pozitive ale TC și TG cu AOPPs, s-au evidențiat și în cele două subgrupuri de pacienți cu afecțiuni inflamatorii diferite: cu DZT2 ($p=0,017$ și, respectiv, $p=0,001$) și cu PAR ($p<0,001$, în ambele cazuri). Corelațiile au fost înalt semnificative pentru subgrupul cu PAR, cu toate că nivelurile serice ale acestor doi parametri erau în limite normale. Mai mult, am identificat și alte corelații semnificative în subgrupul de pacienți cu PAR. În timp ce corelațiile LDL cu TG și AOPPs au fost pozitive, cele identificate pentru HDL au fost negative. Mai mult, pentru ambele fracții lipoproteice, corelații negative între peroxidarea lipidică (ARl dl, ARhdl) și oxidarea avansată a proteinelor (AOPPI dl, respectiv, AOPP hdl) au fost observate.

Corelațiile pozitive ale TG cu AGEs ($r=0,554$, $p=0,014$) și AOPPs ($r=0,795$, $p<0,001$), alături de corelația CT cu AOPPs ($p<0,001$), indică o legătură puternică între dezechilibrul metabolismului lipidic, glicare avansată și stres oxidativ în cazul pacienților cu PAR, cu toate că nivelurile serice ale TG, CT și GLI sunt în limite normale.

Peroxidarea lipidică a HDL pare a fi strâns legată de glicemie în cazul pacienților cu afecțiuni inflamatorii, întrucât am observat o corelație pozitivă a GLI cu ARhdl pentru întreg grupul de

studiu ($r=0,495$, $p=0,002$), pentru subgrupul cu DZT2 ($r=0,729$, $p<0,001$) și pentru cel cu PAR ($r=0,422$, $p=0,081$), însă la limita nivelului de semnificație în cazul celui din urmă.

5.4. Discuții

Perturbările metabolice cronice, caracterizate prin stres oxidativ și inflamație sistemică determină importante modificări la nivelul proteomului și lipidomului lipoproteinelor serice. Timp îndelungat metabolismul fracției LDL a fost în prim-plan în prevenția și tratamentul bolilor cardiovasculare. Însă rezultate recente au demonstrat că modificările patologice ale fracției HDL joacă un rol important în dezvoltarea maladiilor cardiovasculare, din cauza pierderii rolului lor protector, antioxidant și antiinflamator (Gonzalez-Gay and Gonzalez-Juanatey, 2014).

În acest studiu, utilizând noi parametri pentru ilustrarea statusului redox, am arătat că peroxidarea lipidică a LDL și a HDL a fost semnificativ mai mare în grupul de pacienți cu PAR comparativ cu subiecții sănătoși, însoțită de o creștere a oxidării avansate a proteinelor din structura acestora. Diferențele nesemnificative dintre profilul lipidic al pacienților cu PAR și cel al grupului de control sunt în concordanță cu raportări anterioare (Myasoedova et al., 2009). Mai mult, am observat o afectare redox la nivelul lipoproteinelor serice similară pacienților cu DZT2. Ținând cont de diferențele privind nivelurile LDL, aceste rezultate indică faptul că reducerea nivelurilor serice ale LDL nu se traduce neapărat într-o îmbunătățire a profilului lipidic și susțin necesitatea analizelor calitative ale acestor fracții lipoproteice pentru aprecierea funcționalității lor.

Corelația pozitivă între nivelurile serice la TG și cele ale AOPPs a fost una înalt semnificativă în grupul nostru de studiu. Având în vedere implicarea lipidelor, în special a acizilor grași, în răspunsul inflamator, nivelurile crescute ale colesterolului și a trigliceridelor pot accentua stresul oxidativ în cazul pacienților cu stare inflamatorie cronică.

5.5. Concluzii parțiale

În concluzie, pacienții cu DZT2 și PAR prezintă alterări oxidative similare ale lipoproteinelor serice. În ceea ce privește markerii de glicare și oxidare avansată ai proteinelor serice, sunt numai ușor crescute la diabetici, fără diferențe semnificative între grupuri. Acești parametri s-au dovedit a fi niște indicatori mai buni ai statusului metabolic pentru pacienții cu afecțiuni inflamatorii cronice, având în vedere că determinările biochimice de rutină nu reflectă funcționalitatea acestor molecule esențiale.

6. Evaluarea spectrofotometrică și spectrofluorimetrică a legăturii dintre dezechilibre metabolice și peroxidarea lipidică

6.1. Introducere. Ipoteză de lucru și obiective

Obiectivele studiului au fost:

- Optimizarea metodei fluorimetrice cu AR, diminuând concentrația de sondă cu menținerea sensibilității metodei, alături de extinderea acesteia de la probe de lipoproteine serice izolate la omogenate tisulare și organite izolate;
- Ajustarea acesteia în micrometodă, având în vedere avantajele utilizării unei micrometode în ceea ce privește consumul de reactivi și timpul de analiză, cu posibilitatea automatizării unor etape;
- Optimizarea unei micrometode spectrofotometrice bazate pe XO pentru tipurile de probe menționate mai sus;
- Compararea celor două metode din punct de vedere al relevanței clinice și utilității lor pentru definirea unor biomarkeri relevanți în evaluarea pacienților cu afecțiuni metabolice caracterizate de dezechilibre redox.

6.2. Materiale și metode

Am utilizat probe de ser de la pacienți cu DZT2 de la INDNBM “N. Paulescu”, București, România. Grupul de studiu a fost divizat în: grup de control (GC, n=17) - DZT2 controlat prin dietă și grup sub tratament cronic cu 1000 mg/zi clorhidrat de metformin (GM, n=12). Pentru determinările efectuate pe probe derivate din țesuturi animale, am utilizat șobolani Wistar de la biobaza UMFCD București. Pentru inducerea experimentală a diabetului, am folosit o metodă bazată pe administrarea aloxanului (Negreș S, 2013). Două grupuri de șobolani diabetici au fost constituite: un grup de control (sGC, n=7), care au primit 10 mL apă distilată/zi (p.o.) și un grup care a primit clorhidrat de metformin (sGM), 150 mg/kg/zi (p.o). Administrarea s-a făcut o dată/zi, timp de 10 zile, monitorizând glicemia în zilele 1, 4, 7 și 10, la 2 ore după administrare.

Omogenatele tisulare și suspensiile mitocondriale s-au obținut conform tehnicii descrise anterior (Wieckowski et al., 2009). Acestea au fost diluate 1:20 cu tampon fosfat pH=7,4 înainte de desfășurarea procedurilor experimentale.

Am utilizat metoda Amplex Red dezvoltată și descrisă anterior (capitolul 5), cu o soluție de lucru de 300 și, respectiv, 100 μ M atât pentru probe de LDL (ARldl_300 și, respectiv ARldl_100), cât și pentru HDL (ARhdl_300 și, respectiv ARhdl_100), cât și pentru probe de ser (ARs_300 și,

respectiv ARs_100). Pentru probele de omogenat tisular și suspensii mitocondriale am folosit soluția AR de 100 μM, cu o incubare suplimentară pentru fracția mitocondrială cu succinat de sodiu (1:1, 10'). Rezultatele au fost exprimate în unități relative de fluorescență (URF) pentru probele de ser, LDL și HDL și ca UFR raportate la cantitatea de proteine din probă (URF x (mg/mL)⁻¹), dozate prin metoda Lowry (Lowry et al., 1951), pentru probele de omogenat tisular și suspensii mitocondriale. Totodată, am testat adaptarea unei micrometode utilizând probe de ser. Am folosit atât o soluție AR de 100 (mARs_100), cât și una de 300 (mARs_300) μM, singura modificare fiind diluarea finală de 1:20.

Metoda optimizată cu XO are la bază o soluție stoc cu XO 2,5 mM, Fe²⁺ 2,5 mM și acid percloric 1,1 M, aceasta diluându-se 1:5 cu apă distilată în momentul utilizării. Soluția de lucru obținută se incubează în raport 1:1 cu proba timp de 30 de minute, ulterior înregistrându-se densitatea optică la 545 nm, alături de o curbă etalon de hidroperoxid de cumen.

6.3. Rezultate

6.3.1 Evaluarea afectării redox la nivel seric

Am determinat peroxidarea lipidică serică totală și de la nivelul lipoproteinelor izolate prin metoda AR, utilizând soluția de sondă 100 μM (ARs_100, ARhdl_100, ARldl_100) și cea de 300 μM (ARs_300, ARhdl_300, ARldl_300). De asemenea, am folosit metoda FOX pentru evaluarea nivelurilor hidroperoxidizilor (FOXs, FOXhdl FOXldl). Cu metoda AR, am observat diferențe semnificative pentru ARs și ARldl între cele două grupuri. Din punct de vedere al metodei FOX, nu s-au evidențiat diferențe semnificative între grupuri și nu s-a corelat cu metoda AR.

Cele două seturi de parametrii au fost corelate pozitiv. Astfel, markerii peroxidării lipidice serice și LDL determinați cu AR 300 μM (ARs_300 și ARldl_300) au fost corelați semnificativ cu cei determinați cu AR 100 μM: ARs_100 (r=0,863, p<0,001 și, respectiv, r=0,679, p<0,001), ARhdl_100 (r=0,566, p=0,004 și, respectiv, r=0,396, p=0,037) și ARldl_100 (r=0,677, p<0,001 și, respectiv, r=0,634, p<0,001). Mai mult, peroxidarea lipidică serică, determinată cu oricare dintre cele două soluții de AR (100 sau 300 μM), a fost corelată pozitiv cu nivelurile serice ale peptidului C (r=0,517, p=0,011 și r=0,460, p=0,027).

6.3.2 Evaluarea statusului redox în omogenate tisulare și suspensii mitocondriale

Metoda AR s-a dovedit utilă în determinarea statusului redox tisular și mitocondrial, chiar și în absența HRP și la o concentrație de sondă de 100 μM. Cu toate că am observat diferențe în ceea ce privește statusul redox cu ambele metode utilizate, acestea nu au fost semnificative nici

pentru markerii tisulari globali: ARt ($p=0,550$) și FOXt ($p=0,598$), nici pentru cei mitocondriali: ARm ($p=0,675$) și FOXm ($p=0,133$). Am observat că între cele două seturi de parametrii, ARt – FOXt și ARm – FOXm, există corelații pozitive semnificative. Astfel, statusul redox global determinat prin metoda AR s-a corelat cu cel determinat prin metoda FOX: $r=0,887$, $p<0,001$, similar și pentru activitatea redox mitocondrială: $r=0,768$, $p=0,006$.

6.4. Discuții

La reducerea concentrației de la 300 la 100 μM , aplicând metoda pe probe de ser și de lipoproteine izolate, am obținut două seturi de date corelate pozitiv, indicând că reducerea concentrației la 100 μM poate fi făcută cu menținerea sensibilității și reproductibilității metodei (Ungurianu et al., 2019). Mai mult, la adaptarea în micrometodă, testând-o pe probe de ser, am observat că parametrii obținuți pentru cele două concentrații de sondă folosite s-au corelat cu cei determinați anterior. Astfel, micrometoda poate fi folosită menținând sensibilitatea metodei, cu un consum redus de reactivi și timp de analiză mai scurt, datorită posibilității automatizării unor pași ai protocolului.

Pentru probele de ser și de lipoproteine izolate, cele două metode nu au prezentat o legătură semnificativă între ele. Aceste rezultate indică faptul că ele interacționează diferit cu speciile oxidante din probe.

De asemenea, am optimizat o metodă cu AR pentru evaluarea statusului redox tisular total și mitocondrial fără utilizarea unei enzime drept catalizator. Spre deosebire de rezultatele obținute pe probele de ser și pe cele de lipoproteine izolate, pentru evaluarea statusului redox tisular și mitocondrial, am observat o corelație pozitivă semnificativă între cele două metode. Aceste rezultate contrastante pot fi puse pe seama diferențelor semnificative în ceea ce privește matricea probelor și nivelurilor mult mai mari de SRO din probele tisulare.

6.5. Concluzii parțiale

Studiul nostru prezintă protocoalele optimizate a două metode, una spectrofluorimetrică bazată pe sonda AR și cealaltă spectrofotometrică bazată pe XO, pentru evaluarea statusului redox al diferitelor probe biologice: ser, lipoproteine serice izolate, omogenate tisulare și suspensii mitocondriale. Metodele dezvoltate sunt aplicabile pentru studii complexe, întrucât necesită cantități reduse de reactivi, sunt rapide și sensibile, cu o bună reproductibilitate. Mai mult, prezintă avantajul unei analize semiautomate și posibilitatea de a fi extinse pentru o mare varietate de omogenate tisulare și organite celulare izolate.

7. Efectul fumatului asupra peroxidării lipidice HDL la pacienți cu diabet zaharat de tip 2

7.1. Introducere. Ipoteză de lucru și obiective

Obiectivele studiului au fost:

- Determinarea peroxidării lipidice a lipoproteinelor serice de înaltă densitate cu metoda Amplex Red anterior optimizată prin reducerea concentrației de sondă la 100 μM ;
- Compararea statusului redox al HDL la pacienți fumători, nefumători și foști fumători cu diabet zaharat de tip 2;
- Analiza statusului redox HDL al populației de studiu ținând cont de profilul lor cardiometabolic și de funcția secretorie β -pancreatică.

7.2. Materiale și metode

Un grup de pacienți cu DZT2 selectați de la IDNBM “N. Paulescu”, București, România, a fost divizat în: grup de control (GC, n=29) de nefumători și grup de studiu (GS, n=30) cu un subgrup de fumători (sGF, n=15, fumat >5 ani), și un subgrup de foști fumători (sGFF, n=15), pacienți care au fumat mai mult de 5 ani și nu mai fumează de cel puțin 5. Am utilizat metoda dezvoltată și descrisă anterior (capitolul 6) pentru probe de HDL izolat (ARhdl), folosind o soluție de lucru de 100 μM în tampon fosfat pH=7,4.

7.3. Rezultate

Prima diferență semnificativă observată între grupul de control și cel de studiu, a fost cea privind vârsta curentă și cea la diagnostic. Pacienții din grupul de studiu sunt mai tineri ($p=0,003$) și au o vârstă a diagnosticului semnificativ mai mică ($p=0,001$), deși durata bolii este similară ($p=0,203$) între cele două grupuri. În privința IMC și glicemiei la diagnostic, nu am găsit diferențe semnificative între grupuri ($p=0,254$ și, respectiv, $p=0,392$).

În ceea ce privește profilul lipidic, nu s-au observat diferențe între grupul de studiu și cel de control pentru niciunul dintre parametrii determinați: CT ($p=0,494$), TG ($p=0,802$) și HDL ($p=0,407$). Am calculat și raportul TG/HDL, un indicator al riscului aterogenic (Wakabayashi, 2014), însă nici pentru acesta nu am găsit o diferență semnificativă între grupul de control și cel de studiu ($p=0,283$) sau față de cele două subgrupuri: sGF ($p=0,169$) ori sGFF ($p=0,464$).

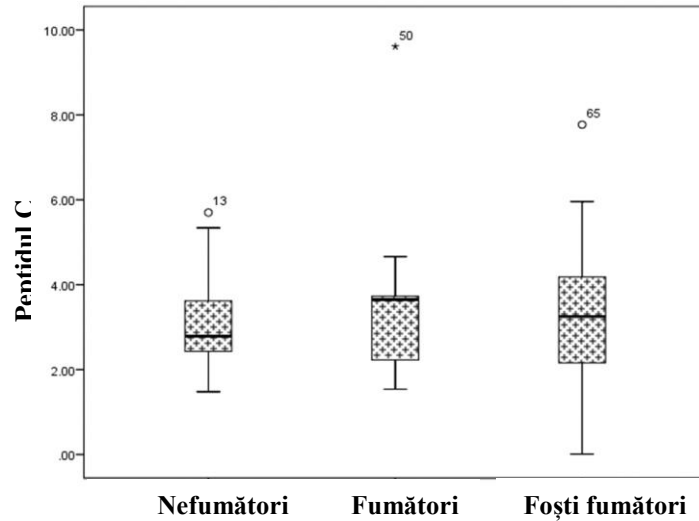


Figura 7.1 Variația nivelurilor peptidului C în cazul pacienților nefumători (GC, n=29), fumători (sGF, n=15) și foști fumători (sGFF, n=15)

Cu toate că nu am identificat diferențe semnificative între grupuri din punct de vedere al parametrilor biochimici de rutină (GLI, CT, TG, HDL) sau al peptidului C (Figura 7.1), la analizarea peroxidării lipidice a HDL am observat niveluri semnificativ mai mari în grupul de studiu, față de cel de control ($p=0,005$). Mai mult, la analizarea subgrupurilor față de control (Figura 7.2), diferențele au rămas semnificative pentru grupul de fumători ($p=0,05$), însă mai ales pentru foștii fumători ($p=0,008$).

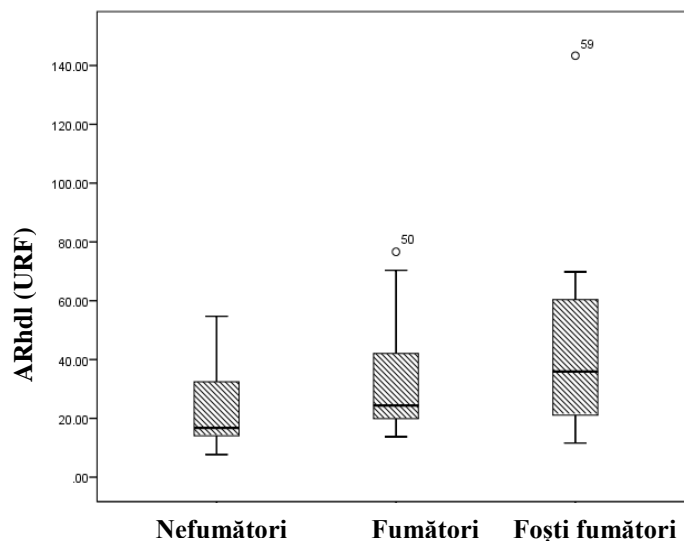


Figura 7.2 Variația peroxidării HDL în cazul pacienților nefumători (GC), fumători (sGF) și foști fumători (sGFF)

În grupul de studiu, am observat o corelație pozitivă semnificativă între peroxidarea lipidică a HDL și durata bolii, care sugerează o legătură între gradul de afectare redox al HDL și evoluția diabetului. Mai mult, raportul TG/HDL, care indică riscul aterogenic seric, a fost corelat cu nivelurile serice ale peptidului C.

7.4. Discuții

Fumatul determină o intensificare a stresului oxidativ seric și, totodată, o creștere a peroxidării lipoproteinelor serice, rezultând structuri disfuncționale (He et al., 2013, Takata et al., 2014). Amplificarea stresului oxidativ și inflamației poate conduce la diminuarea acțiunilor protectoare ale HDL, cu generarea unei fracții lipoproteice proaterogenice (He et al., 2013, Takata et al., 2014). Corelația pozitivă a afectării redox HDL cu durata bolii subliniază efectul semnificativ al stresului oxidativ asupra lipoproteinelor de înaltă densitate la diabeticii cu istoric de fumat, cu progresia bolii.

Rezultatele studiului au arătat că pacienții grupului de studiu, constituit din fumători și foști fumători, deși mai tineri și cu o durată a bolii similară grupului de control, au prezentat o afectare redox semnificativ mai pronunțată, indicând o disfuncție mai avansată a HDL.

7.5. Concluzii parțiale

Având în vedere diferențele ne semnificative semnalizate de parametrii biochimici de rutină utilizați în mod curent pentru evaluarea statusului metabolic al pacienților cu DZT2, ARhdl poate reprezenta un marker util în aprecierea statusului cardiometabolic al acestora.

Rezultatele studiului prezentat în acest capitol indică o peroxidare lipidică a lipoproteinelor de înaltă densitate mai accentuată pentru diabeticii cu un istoric de fumat. Mai mult, renunțarea la fumat nu a determinat îmbunătățirea semnificativă statusului redox a HDL.

Cu toate acestea, implicațiile complexe ale renunțării la fumat asupra statusului inflamator nu au fost evaluate în acest studiu, ele putând evidenția o îmbunătățire a statusului cardiometabolic. De asemenea, ar putea sta la baza unei ameliorări ale funcției β -pancreatice, ceea ce ar explica variabilitatea mare observată în cazul subgrupului de foști fumători.

8. Efectele fumatului asupra statusului inflamator seric într-un grup de pacienți cu diabet zaharat de tip 2

8.1. Introducere. Ipoteză de lucru și obiective

Obiectivele studiului au fost:

- Determinarea nivelurilor serice ale unor markeri ai inflamației: IL-1 β , IL-6, IL-10 și CRP;
- Aprecierea statusului redox al proteinelor serice prin măsurarea AGE și AOPP;
- Evaluarea peroxidării lipidice serice și de la nivelul HDL prin metoda Amplex Red;
- Calcularea unor markeri și indici ai statusului metabolic, pe baza parametrilor redox și inflamatori determinați, pentru analizarea diferențelor între subgrupurile de pacienți diabetici: nefumători, fumători și foști fumători;
- Evaluarea utilității markerilor determinați pentru utilizarea în context clinic.

8.2. Materiale și metode

Un grup de pacienți (n=68) selectați de la IDNBM „N. Paulescu” București, România, a fost împărțit în: grup de control (GC, n=16) fără DZT2 și un grup de studiu (GS, n=52) cu DZT2, cu 3 subgrupuri: nefumători (sGNF, n=27), fumători (sGF, n=13) și foști fumători (sGFF, n=12).

Pentru determinarea peroxidării lipidice serice (ARs) și de la nivelul HDL (ARhdl), am aplicat metoda Amplex Red descrisă anterior utilizând o soluție de lucru de 300 μ M.

Pentru determinarea nivelurilor serice ale CRP, IL-6, IL-10 și IL-1 β , am folosit *kit*-uri ELISA (Enzo Life Sciences, Elveția și Sigma Aldrich, SUA), conform instrucțiunilor producătorilor, rezultatele fiind exprimate în ng/dL și, respectiv, în pg/mL.

8.3. Rezultate

Pe lângă parametrii măsurați, am vrut să determinăm utilitatea unor rapoarte între nivelurile serice ale IL-1 β , IL-6, IL-10 sau CRP în evaluarea statusului inflamator seric, având în vedere că unele dintre aceste rapoarte au fost utilizate în scop de diagnostic sau în aprecierea riscului de dezvoltare a unor maladii (Pochat-Cotilloux et al., 2018, Sun et al., 2016, Suyasa et al., 2017). Mai mult, am calculat și unii markeri de evaluare a statusului metabolic luând în considerare nivelurile serice ale CRP și ARhdl, raportate fie la nivelul seric al HDL, fie al IL-1 β , și anume: indexul HDL 1 (IH1), indexul HDL 2 (IH2) și indexul inflamator seric (IIS), formulele de calcul fiind prezentate în ecuațiile (8.1), (8.2) și, respectiv (8.3). Am considerat că acești markeri ar putea fi utili în

aprecierea statusului cardiometabolic al pacienților cu maladii metabolice cronice caracterizate prin stres oxidativ și inflamație cronică de joasă intensitate.

$$IH1 = \frac{CRP \text{ (ng/dL)} \times ARhdl \text{ (URF)}}{100 \times HDL \text{ (mg/dL)}} \quad (8.1)$$

$$IH2 = \frac{CRP \text{ (ng/dL)} \times ARhdl \text{ (URF)}}{100 \times IL - 6 \text{ (pg/mL)}} \quad (8.2)$$

$$IIS = \frac{CRP \text{ (ng/dL)} \times IL - 1\beta \text{ (pg/mL)}}{IL - 10 \text{ (pg/mL)}} \quad (8.3)$$

În cazul GC, afectarea redox a proteinelor serice este legată de cea a lipidelor, ambele fiind dependente de nivelul seric al TG, notabilă fiind și legătura inversă a nivelului IL-10 cu GLI. Pentru GS, LPO serică este direct proporțională cu glicemia și AGEs, în timp ce raportul CRP/HDL este dependent de TG. Mai mult, nivelurile IL-6 sunt direct proporționale cu cele ale CRP și cu valoarea IMC.

Oxidarea și glicarea avansată a proteinelor serice a fost semnificativ mai mare pentru toate subgrupurile de studiu față de control. În ceea ce privește LPO, am remarcat o singură diferență semnificativă: între GC și sGNF. Nivelurile CRP și raportul CRP/HDL au fost semnificativ mai mari în subgrupurile de studiu față de control și, mai mult decât atât, semnificativ mai mari în sGF față de sGNF și sGFF. Markerii IH1 și IH2 au avut valori mai mari în sGF și sGFF față de sGNF și, numai pentru IH1, față de GC. Raportul CRP/IL-6 a fost semnificativ mai mare pentru sGF și sGFF față de GC, iar IL-10/IL-6 a fost semnificativ mai mare numai pentru sGFF comparativ cu GC.

Analizând corelațiile în cele trei subgrupuri de studiu, am găsit unele semnificative ale markerilor statusului inflamator cu glicemia, însă numai pentru subgrupul de diabetici fumători. Astfel, IL-1 β /IL-6, CRP/IL-10 și IIS au prezentat corelații pozitive, în timp ce IL-6, IL-10, IL-10/IL-1 β și IL-10/IL-6 au fost invers legate de GLI. Mai mult, tot numai în sGF, raportul CRP/HDL a fost direct legat de nivelurile serice ale trigliceridelor, ureei și creatininei.

8.4. Discuții

În cadrul acestui studiu, GS a fost alcătuit din pacienți cu DZT2, supraponderali și obezi, cu IMC, glicemie și trigliceridemie semnificativ mai mari față de control. Analizând parametrii redox determinați, glicoxidarea proteinelor serice a fost semnificativ mai mare pentru pacienții diabetici, însă nu și lipoxidarea, cu toate că am observat corelații pozitive semnificative atât ale markerilor

de glicare avansată, cât și ai peroxidării lipidice serice cu glicemia. Aceste diferențe s-au regăsit și la compararea subgrupurilor de studiu cu grupul de control. Pacienții din cele trei subgrupuri au prezentat valori semnificativ mai mari pentru IMC, glicemie, trigliceridemie și glicoxidarea avansată a proteinelor serice. Totodată, am observat că glicemia și AGEs în sGFF au fost semnificativ mai mare față de sGF.

În GC, glicoxidarea avansată a proteinelor serice a fost strâns legată de lipoxidarea serică, fiind corelate pozitiv cu trigliceridemia. De asemenea, am observat o legătură inversă între nivelurile IL-10 și glicemie, indicând un efect benefic al IL-10 în reglarea metabolismului glucidic, în condiții fiziologice normale. Aceste rezultate sunt în concordanță cu mențiunile anterioare din literatură privind efectul favorabil IL-10 de origine splenică, acesta determinând o îmbunătățire a metabolismului glucozei prin inhibarea sintezei de IL-1 β (Gotoh et al., 2017).

În populația studiului, nu am detectat diferențe semnificative între grupul/subgrupurile de studiu față de control, din punct de vedere al nivelurilor serice ale IL-6. Am observat, în GS, o corelație semnificativă a IL-6 cu CRP și, de asemenea, cu IMC, raportate și anterior (Smidowicz and Regula, 2015, Vozarova et al., 2003).

În cazul subgrupurilor de studiu, valorile CRP și CRP/HDL au fost semnificativ mai mari față de GC și semnificativ mai mici pentru sGNF și sGFF față de sGF. După renunțarea la fumat, nivelurile CRP scad treptat, inițial diferențele fiind ne semnificative față de fumători, rezultate ce confirmă date deja raportate în literatură (Asthana et al., 2010, Joseph et al., 2008, Tibuakuu et al., 2017).

Analizând corelațiile semnificative în sGF, am observat că glicemia s-a corelat pozitiv cu markeri de apreciere a gradului de inflamație sistemică: IL-1 β /IL-6, CRP/IL-10 și IIS și negativ cu cei pentru aprecierea răspunsului antiinflamator: IL-10, IL-10/IL-1 β , IL-10/IL-6 și, de asemenea, cu IL-6. Aceasta ultimă corelație indică un posibil efect benefic al IL-6, acesta fiind posibil luând în considerare efectele complexe, atât pro-, cât și antiinflamatoare raportate anterior (Feigerlova and Battaglia-Hsu, 2017).

8.5. Concluzii parțiale

În cadrul acestui studiu, am observat diferențe semnificative din punct de vedere al statusului inflamator seric între pacienții cu DZT2 și, mai mult, între subgrupurile formate pe baza istoricului de fumat, și grupul de control. Fenomenele inflamatorii regăsite în etiopatogenia DZT2, sunt accentuate de fumat, care poate contribui la creșterea riscului de instalare a comorbidităților. Renunțarea la fumat contribuie, în timp, la restabilirea echilibrelor homeostatice.

9. Efectele asupra statusului redox seric și tisular ale unui fitopreparat antidiabetic într-un model preclinic de diabet

9.1. Introducere. Ipoteză de lucru și obiective

Obiectivele studiului au fost:

- Caracterizarea componentelor FA prin dozarea cantității totale de fenoli și flavone;
- Evaluarea *in vitro* a CAO extractelor metanolice obținute din componentele FA;
- Evaluarea efectelor FA *versus* două antidiabetice clasice: metformin și gliclazid, într-o populație de șobolani cu diabet aloxanic, față de un grup de control nediabetic;
- Determinarea AGE și AOPP la nivel seric și la nivelul lipoproteinelor serice separate;
- Evaluarea statusului redox tisular și mitocondrial prin metodele Amplex Red și FOX;
- Examinarea efectelor acestor tratamente diferite asupra histologiei hepatice și cerebrale.

9.2. Materiale și metode

Un comprimat (600 mg) de FA (Retinofort, Plantavorel, România; aprobat de Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare pentru Bioresurse, București, România prin ordinul 244/401/2005) conține: 10 mg extract purificat de *Vaccinium myrtillus*, *Ericaceae* (EP_Vm), standardizat în antociani (0,97%, exprimat în cianidin-3-o-glucozidă), 30 mg pulbere de fructe de *Vaccinium myrtillus*, *Ericaceae* (P_Vm), 40 mg pulbere de fructe de *Ribes nigrum*, *Grossulariaceae* (P_Rn), 30 mg pulbere de fructe de *Capsicum annuum*, *Solanaceae* (P_Ca) și 40 mg pulbere de fructe de *Rosa canina*, *Rosaceae* (P_Rc).

Extractele metanolice din componentele vegetale s-au obținut prin refluxarea timp de 1h a unei suspensii din 5 g ad 100 mL metanol, urmată de filtrare și concentrare la un volum de 5 mL (P_Rn, P_Rc, P_Ca) sau 10 mL (P_Vm), în funcție de vâscozitatea soluției. În cazul extractului purificat de afin (EP_Vm), am suspendat 5g în 100 mL metanol, soluția obținută în urma filtrării fiind folosită în continuare. Conținutul total de fenoli (CT_{FNL}) s-a determinat prin metoda Folin-Ciocalteu (Margina et al., 2015), iar cel de flavone (CT_{FLV}) prin metoda cu AlCl₃ (Zhishen et al., 1999). Capacitatea de neutralizare a radicalilor liberi prin metoda cu 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), descrisă anterior (Margina et al., 2015).

Pentru desfășurarea studiului preclinic, am selectat o colectivitate de șobolani adulți masculi Wistar, de la biobaza UMFCD București. Aloxanul (130 mg/kg, i.p.) a fost utilizat pentru inducerea experimentală a diabetului zaharat (Negreș S, 2013). La 48 de ore după administrarea aloxanului, s-a măsurat glicemia (GLI) prin puncționarea venelor cozii, animalele cu valori mai

mari de 200 mg/dL fiind incluse în grupul de studiu (GS) și divizate în 4 loturi de studiu, cu tratamente diferite: lot diabetic netratat (LDN, n=6) - apă distilată, 10 mL/kg/zi (p.o.); lot metformin (LM, n=6) - metformin 150 mg/kg/zi (p.o., soluție 1,5%); lot gliclazid (LG, n=6) - gliclazid 10 mg/kg/zi (p.o., suspensie 0,1%); lot FA (LF, n=7) - 100 mg/kg/zi din FA (p.o., suspensie 1% Retinofort). Aceste grupuri de studiu au fost comparate cu un grup de control (GC, n=8) de animale non-diabetice. Durata tratamentului a fost de 10 zile, la final animalele fiind sacrificate, cu recoltarea sângelui, creierului și ficatului. Dozele administrate au fost alese conform datelor din literatură (Alhaider et al., 2011, Wu et al., 2012, Attia et al., 2012, Yao et al., 2016, Yazgan et al., 2015), iar în cazul FA doza a fost calculată, fiind mai mare față de cea folosită la om, ținând cont de diferențele de metabolism între specii (Nair and Jacob, 2016).

Pentru determinarea capacității antioxidante (CAO) a probelor de ser (CAOs) și de lipoproteine serice separate (CAO_{hdl} și CAO_{ldl}) am utilizat o metodă bazată pe acidul 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS).

Pentru realizarea analizei histopatologice, probele de ficat și creier prelevate au fost fixate în formaldehidă 10% pentru 24 de ore, fiind supuse ulterior mai multor pași de deshidratare în: 1) alcool etilic 70% timp de 60 de minute, 2) alcool etilic 96% timp de 45 de minute și 3) alcool absolut timp de 2 ore. Ulterior, speciemenle recoltate au fost prelucrate folosind tehnica la parafină. Clarificarea probelor a fost realizată prin imersii repetate în xilen, utilizând un procesator STP 120-3 (Thermo Fischer Scientific, SUA), urmată de infiltrări cu parafină la Microm EC 350-1 (Thermo Fischer Scientific, SUA), acestea fiind procesate automat. Ulterior, blocurile au fost secționare la 3 μm la un microtom RM 125RTS (Leica, Germania) și etalate pe lame histologice. Acestea au fost colorate cu hematoxină-eozină cu ajutorul aparatului automat de colorare a lamelor Microm HMS 70 (Thermo Fischer Scientific, SUA). Examinarea preparatelor s-a realizat folosind un microscop Olympus BX 43 (Olympus, Japonia) dotat cu sistem video de achiziție Olympus DP73 (Olympus, Japonia), iar pentru analiza imaginilor obținute s-a folosit programul semiautomat de analiză a imaginii Olympus Cell^B (Olympus, Japan). În fiecare caz s-a urmărit identificarea leziunilor prezente la nivel ficatului (secțiuni longitudinale axiale și transversale ale lobului hepatic stâng) și sistemului nervos central (secțiuni sagitale ale emisferei drepte cerebrale și secțiuni sagitale ale părții drepte a cerebelului). Pentru interpretarea cât mai exactă a hepatopatiilor s-a recurs la acordarea unui scor lezional histopatologic, care sa permită gruparea acestora în hepatopatie minoră, medie sau gravă (Militaru M, 2008).

9.3. Rezultate

Rezultatele obținute în urma determinării cantității totale de fenoli și flavone din componentele FA studiat au fost în concordanță cu raportările anterioare din literatură (Miletić N., 2014, Huang et al., 2012). În ceea ce privește capacitatea de neutralizare a radicalilor liberi, rezultatele obținute pentru urmărirea efectului în cinetică sunt prezentate în figura 9.1.

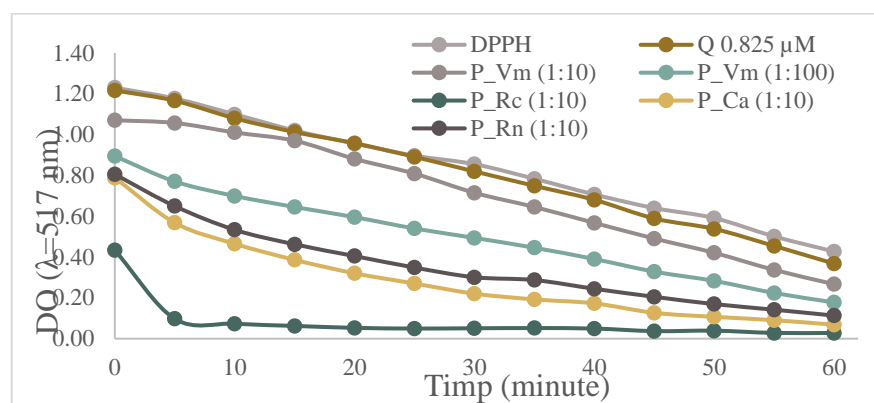


Figura 9.1 Determinarea în cinetică a capacității extractelor metanolice diluate de neutralizare a radicalilor liberi;

Din punct de vedere a CAO, comparând LM, LG și LF cu GC, am observat o CAOs semnificativ mai mică numai în cazul primelor două. În ceea ce privește lipoproteinelor serice, CAO_{hdl} și CAO_{ldl} au fost similari în cele 4 loturi. La analizarea diferențelor dintre LF și LM, LG și LDN, am observat o CAOs a LF semnificativ mai mare față de toate cele trei loturi și la nivelul LDL față de lotul diabetic netratat.

AGEs a fost semnificativ mai mare pentru LG și LF față de GC, iar AGE_{hdl} a fost semnificativ mai mic pentru LM și mai mare pentru LF. Pentru AGE_{ldl} nu s-au decelat diferențe semnificative între grupuri. AGEs a fost semnificativ mai mare pentru LG atât față de LM, cât și față de LDN. Pentru HDL, diferența a rămas semnificativă numai față de LM. În ceea ce privește peroxidarea lipidică, valorile ARs ale GC au fost similare cu cele ale loturilor sunt tratament. AR_{hdl} a fost semnificativ mai mare pentru LG și LF comparativ cu GC, iar din punct de vedere al AR_{ldl}, loturile au fost similare.

Din punct de vedere al parametrilor utilizați la evaluarea statusului redox la nivelul fracției mitocondriale și omogenatului total de creier, nu am găsit diferențe notabile față de GC, prin metoda AR. În cazul probelor de ficat, nu am găsit diferențe semnificative ale loturilor diabetice față de GC. Însă, cu metoda FOX, am observat valori semnificativ mai mari pentru loturile diabetice sub tratament față de cel netratat, în ceea ce privește statusul redox mitocondrial hepatic.

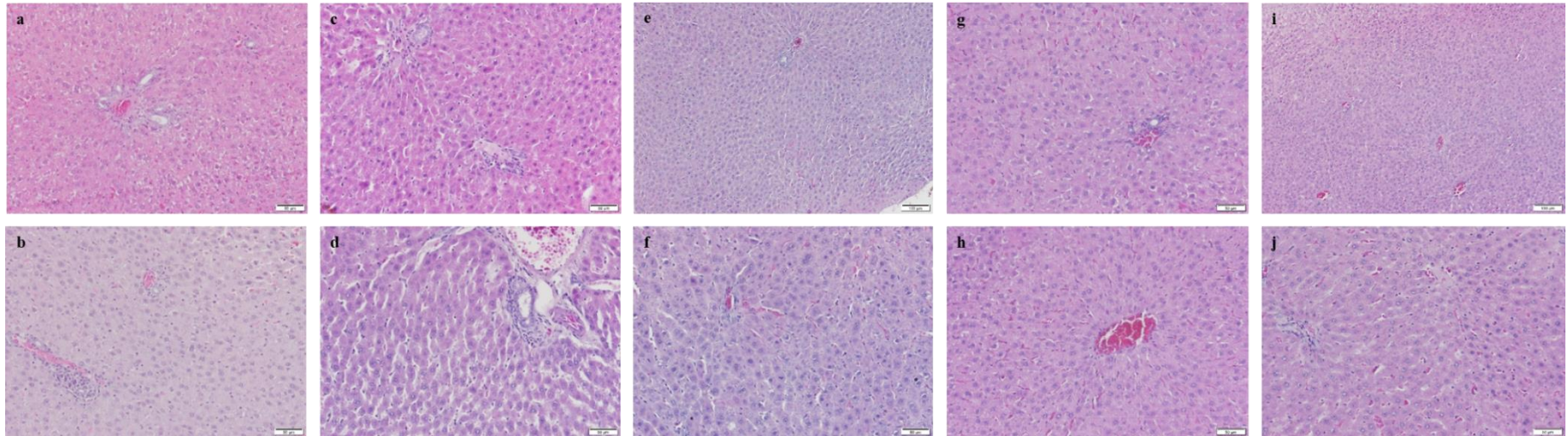


Figura 9.2 Evaluarea histologică a probelor de ficat pentru grupul de control la 10x (a) și 20x (b), LDN la 10x (c) și 20x (d), LM la 10x (e) și 20x (f), LG la 10x (g) și 20x (h) și LF la 10x (i) și 20x (j)

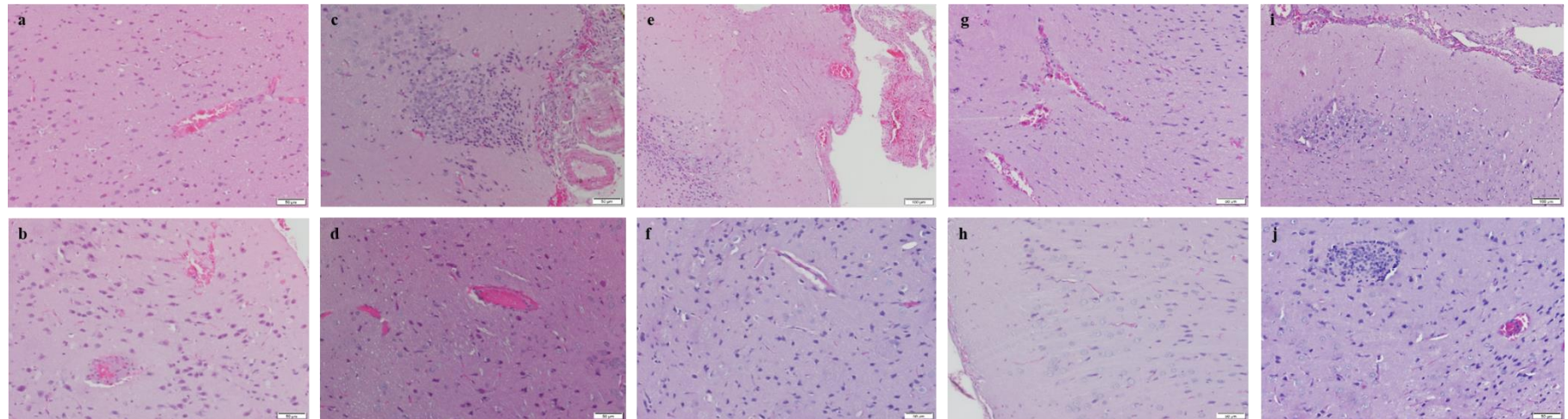


Figura 9.3 Evaluarea histologică a probelor de creier pentru grupul de control la 10x (a) și 20x (b), LDN la 10x (c) și 20x (d), LM la 10x (e) și 20x (f), LG la 10x (g) și 20x (h) și LF la 10x (i) și 20x (j)

Histologia țesutului cerebral a lotului diabetic netratat, comparativ cu a grupului de control, a prezentat semne de inflamație, vase sangvine trombotice și unele elemente de necroză neuronală. În cazul grupurilor aflate sub tratament nu am găsit diferențe histologice față de cel netratat, cu toate că un aspect ușor mai bun a fost remarcat pentru LF (Figura 9.2). În cazul țesutului hepatic, față de control, lotul diabetic netratat a prezentat o hepatopatie moderată. Pentru LG, s-au observat semne de inflamație, alături de o mărire a volumului celular, în timp ce pentru LM și LF, numai semne de hepatopatie minoră au fost observate (Figura 9.3).

9.4. Discuții

În cazul grupului de control, statusul redox hepatic și seric, inclusiv a HDL, a fost strâns legat de parametrii ce evidențiază controlul glicemic. Totodată, corelațiile greutății pe parcursul tratamentului cu markerii de evaluare a peroxidării lipidice și capacității de apărare antioxidantă a LDL, indică o strânsă legătură între controlul greutății și funcționalitatea lipoproteinelor de joasă densitate. În cazul grupului diabetic, glicarea avansată a lipoproteinelor serice a fost strâns legată de peroxidarea lipidică a acestora și, în cazul HDL, de statusul oxidativ și glicemic seric. Mai mult, acești parametri s-au corelat cu pozitiv cu statusul oxidativ tisular, însă negativ cu cel mitocondrial, la nivel hepatic.

Similaritatea capacității antioxidante a HDL observată între cele trei loturi, alături de scăderea semnificativă a acesteia în cazul LDL și la nivel seric pentru a lotul diabetic netratat, arată îmbunătățirea apărării antioxidante după instituirea tratamentului antidiabetic. Din punct de vedere al peroxidării lipidice, nu s-au evidențiat diferențe nici la nivel seric, nici lipoproteic.

9.5. Concluzii parțiale

Tratamentul cu metformin a condus la rezultatele cele mai bune în ceea ce privește glicarea sau/și oxidarea proteinelor și lipoxidarea la nivel seric și al lipoproteinelor serice. Totodată, a ameliorat statusul redox seric și al HDL. Utilizarea fitopreparatului a condus la o îmbunătățire a capacității antioxidante serice, inclusiv a lipoproteinelor de la nivel seric. Instituirea tratamentului antidiabetic a condus la o creștere a activității redox mitocondriale la nivel hepatic, însă fără afectarea statusului redox global tisular. Din punct de vedere al analizei histopatologice, între grupurile de animale aflate sub tratament nu s-au evidențiat diferențe notabile, acestea prezentând un aspect mai bun față de animalele diabetice netratate.

10. Efectele unui fitopreparat antidiabetic asupra statusului redox seric într-o populație de pacienți cu diabet zaharat de tip 2

10.1. Introducere. Ipoteză de lucru și obiective

Obiectivele acestui studiu au fost:

- Evaluarea utilității markerilor redox testați anterior în aprecierea statusului metabolic al pacienților cu DZT2 cu abordări terapeutice diferite;
- Analizarea diferențelor privind profilul metabolic, conform parametrilor biochimici de rutină, și privind statusul redox, conform markerilor redox;
- Evaluarea efectului utilizării FA drept adjuvant al farmacoterapiei DZT2.

10.2. Materiale și metode

Un grup de pacienți (n=125) selectați de la IDNBM „N. Paulescu” București, România. În urma aplicării criteriilor de excludere, GS (n=80) cu DZT2 a fost împărțit în: grup metformin (GM, n=15), - metformin 1000 mg/zi; grup metformin și gliclazid (GMG, n=18) - metformin 1000 mg/zi și gliclazid 60 mg/zi; grup metformin și FA (GMF, n=12) - metformin 1000 mg/zi și 1 comprimat/zi FA; grup metformin, gliclazid și FA (GMGF, n=10) - metformin 1000 mg/zi, gliclazid 60 mg/zi și 1 comprimat/zi FA; grup FA (GF, n=10) - 2 comprimate/zi de FA; grup cu diabet controlat prin dietă (GD, n=15), respectând recomandările dietetice în DZT2, comparat cu un grup de control fără DZT2 (GC, n=25).

10.3. Rezultate

Valorile CRP, IAP, raportului CRP/HDL și peptidului C au fost semnificativ mai mari în GS, indicând un risc cardiovascular crescut. Totodată, acesta din urmă a fost corelat pozitiv cu IAP și IMC și negativ cu HbA1C. Corelațiile pozitive dintre markerii peroxidării lipidice: ARs – ARhdl, ARs – ARldl și ARhdl – ARldl, alături de cele dintre CAOhdl și CAOldl, reafirmă „ciclul peroxizilor” la nivelul lipoproteinelor serice (Ungurianu A., 2016, Kelesidis et al., 2014) și contribuția afectării redox ale acestora la statusul redox seric. CAOldl a fost corelată negativ cu AOPPs, AGEs și ARs, iar AOPPldl pozitiv cu nivelul seric al CRP. AGEs și AGEldl s-au corelat pozitiv cu ARs și ARldl și cu AOPPs și AOPPldl. AOPPs și AGEs, alături de ARhdl au fost direct proporționale cu valorile IMC. Glicemia a fost invers corelată cu CAOs. De asemenea, controlul glicemic pare a fi avut un efect important și asupra statusului redox al HDL, întrucât atât glicemia curentă, cât și cea de la diagnosticare, s-au corelat pozitiv cu ARhdl. Mai mult, nivelurile peptidului C au fost corelate pozitiv cu IAP, ARs și AOPPldl.

10.4. Discuții

În întregul GS, GLI a fost invers proporțională cu CAOs. De asemenea, controlul glicemic pare a avea un efect important și asupra statusul redox al HDL, întrucât atât glicemia curentă, cât și cea de la diagnosticare, s-au corelat pozitiv cu ARhdl, iar CAOs și HDL fiind semnificativ mai mari în GC.

Atât glicarea, cât și oxidarea avansată a proteinelor contribuie la dezvoltarea complicațiilor cronice ale DZT2 (Grzebyk and Piwowar, 2014), prin mecanisme ce implică *crosslinking* și acumularea moleculelor disfuncționale. Toate grupurile diabetice au avut o glicemie semnificativ mai mare față de control, însă GF a prezentat niveluri similare GD. Niveluri semnificative mai mari ale AGEs și AGEldl au fost observate față de GC, însă semnificativ mai mici pentru HDL. Aceste rezultate sugerează că, în cazul non-diabeticilor, HDL este mult mai afectat față de LDL și că după instalarea DZT2 are loc o alterare a interacțiunilor normale între lipoproteinele serice. Astfel, glicarea diferită a proteomului lipoproteinelor serice indică diferențele dintre funcțiile lor homeostatice. Totodată, nivelurile AGEldl au fost similare între GD și GF, și semnificativ mai mici față de celelalte grupuri diabetice. Având în vedere că aportul AGE exogen este un factor promotor al stresului oxidativ și al inflamației (Chilelli et al., 2013), dieta și suplimentarea acesteia cu fitopreparate antioxidante și antiinflamatoare poate conduce la diminuarea riscului pacienților cu DZT2 de a dezvolta complicații cronice.

Cu toate că nivelurile serice ale HDL au fost semnificativ diferite între GC și GF, ARhdl a fost similară, mai mică față de celelalte grupuri diabetice, cu excepția GM. Tratatamentul cu metformin și FA au avut efectele cele mai bune în ceea ce privește menținerea funcționalității HDL. Corelațiile peroxidării lipidice serice cu cea a HDL și LDL, alături de corelațiile parametrilor de evaluare a capacității antioxidante, indică legătura strânsă dintre funcționalitatea fracțiilor lipoproteice și impactul asupra celei serice.

10.5. Concluzii parțiale

Dintre rezultatele studiului nostru, cele mai importante sunt cele privind lipoproteinele serice. Utilizarea cronică a FA a avut efecte pozitive la nivelul HDL și LDL, ameliorând totodată și markerii redox serici. Astfel, acest fitopreparat poate constitui un adjuvant al terapiei farmacologice a diabetului zaharat, cu efecte notabile de ameliorare a statusului metabolic și de reducere a riscului cardiovascular. Cu toate acestea, sunt necesare și studii de evaluare a mecanismului acestuia de acțiune la nivel celular și studii clinice controlate, pentru a-i stabili eficacitatea pe termen lung.

11. Efectele protectoare ale procainei și Gerovitalului H3 asupra peroxidării lipidice la nivel celular și seric

11.1. Introducere. Ipoteză de lucru și obiective

Obiectivele studiului au fost:

- Investigarea efectului protector al procainei și GH3 împotriva peroxidării lipidice la nivel mitocondrial și la nivelul lipoproteinelor serice, prin metoda cu Amplex Red, optimizată anterior;
- Evaluarea acțiunii procainei și GH3 asupra apărării împotriva peroxidării lipidice induse la nivel membranar pe un model de limfoblaste T (Jurkat), prin metoda cu DPPP.

11.2. Materiale și metode

Gerovital H3 (Zentiva, România) conține 2% clorhidrat de procaină, 0.12% acid benzoic, 0.10% metabisulfid de potasiu și 0.01% fosfat disodic, având un pH=3.3. Acesta, alături de procaină (Sigma-Aldrich, SUA, utilizată drept soluție 2%), a fost testat, în diferite concentrații, pentru determinarea efectului antioxidant.

Celule Jurkat (limfoblaste T; Centrul European de Culturi Celulare, Marea Britanie) au fost crescute în mediu RPMI-1640 cu 10% ser fetal bovin, la 37°C în atmosferă de 5% CO₂, fiind pasate la fiecare 2 zile. În cadrul experimentului s-au utilizat celule obținute după 4 etape de pasare, după un ciclu de congelare-decongelare.

Pentru determinarea peroxidării lipidice la nivel mitocondrial cu Amplex Red, s-au separat mitocondrii conform procedurii descris anterior (capitolul 9) din omogenat de ficat prelevat de la un șobolan Wistar, de la biobaza UMFCB București, România. Procedura presupune utilizarea unei soluții AR 75 μM și a inclus o incubare GH3 și procaină 2% 0,5/1,0/2,0/5,0/10,0 mM. Rezultatele sunt exprimate ca inhibare procentuală a peroxidării lipidice: %IPL=100 x (URF_{Control}-URF_{Probă})/URF_{Control}.

Pentru evaluarea la nivel seric am folosit concentrate lipoproteice serice (8000 rpm/1h - filtre Amicon Ultra-10k 10,000 NMWL, Millipore, SUA). Peroxidării lipidice a fost determinată prin metoda AR descrisă anterior (capitolul 5), utilizând o soluție de sondă de 300 μM și a inclus o incubare GH3 și procaină 2% 0,5/1,0/2,0/5,0/10,0 mM. Rezultatele au fost exprimate ca %IPL.

Susceptibilitatea la peroxidarea lipidică, indusă cu hidroperoxid de cumen, a fost testată pe limfocitele Jurkat incubate cu GH3, procaină și curcumină (4h, 2,5/5,0/10 mM). Generarea SRO

la nivel membranar a fost monitorizată cu DPPH (Margina et al., 2013) timp de 20 de minute, în cinetică, după tratarea cu HPC 10 μM , la $\lambda_{\text{excitație}}=351 \text{ nm}/ \lambda_{\text{emisie}}=380 \text{ nm}$.

11.3. Rezultate

La toate aceste concentrații, inhibiția peroxidării lipidice înregistrată a fost mai mare pentru procaină, valorile fiind însă apropiate de cele înregistrate pentru GH3 (Figura 11.1).

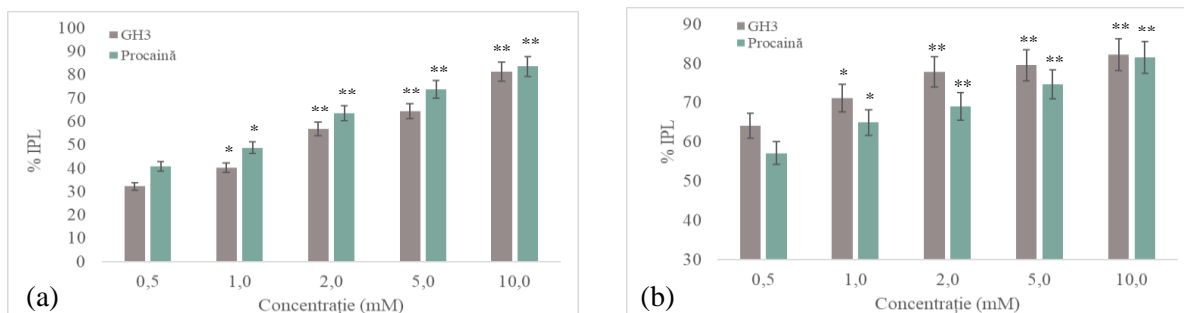


Figura 11.1 Variația efectului de inhibiție *in vitro* a peroxidării lipidice sub acțiunea GH3 și procainei în suspensiile de mitocondrii hepatice (a) și concentrate lipoproteice serice (b).

Efectul protector a variat cu timpul de incubare, GH3 fiind mai eficient decât procaina în protejarea împotriva generării peroxidizilor lipidici, în special la concentrația cea mai redusă, când a avut efecte similare curcuminei (Figura 11.2).

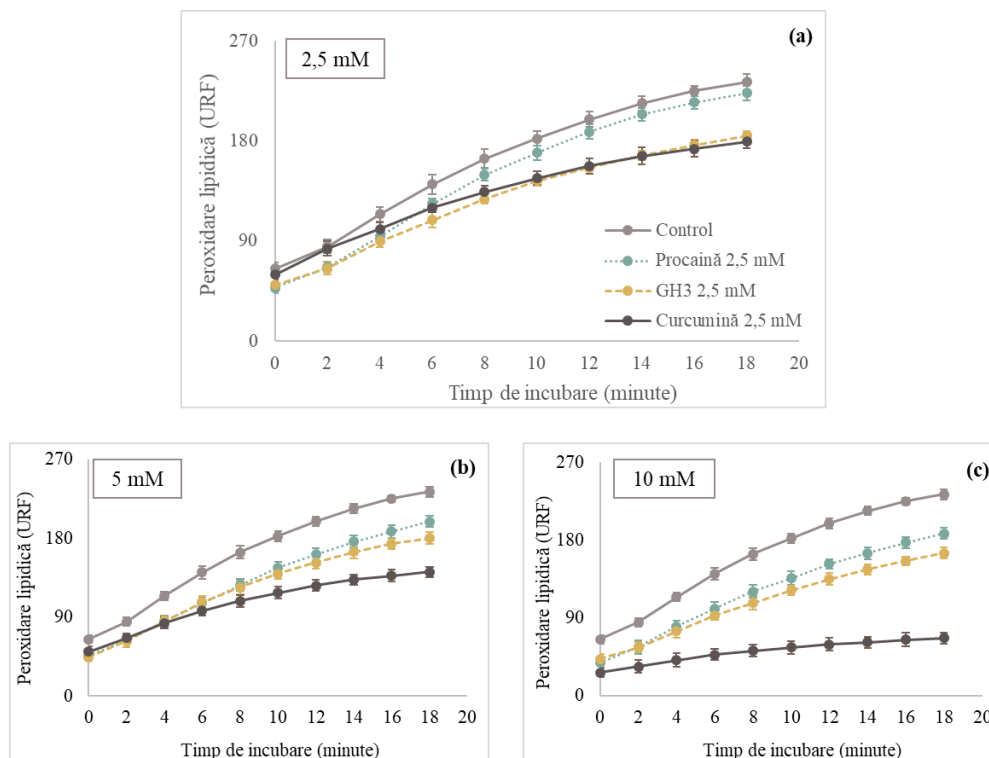


Figura 11.2 Evaluarea în cinetică a efectelor GH3, procainei și curcuminei la (a) 2,5 mM, (b) 5 mM sau (c) 10 mM, asupra peroxidării lipidice membranare în celule Jurkat (limfoblaste T)

11.4. Discuții

Prin utilizarea mai multor modele experimentale, precum mitocondrii izolate, concentrate de lipoproteine serice și limfocite Jurkat, am adus noi dovezi privind efectele antioxidante ale GH3 și procainei.

Acțiunea antioxidantă a GH3 și procainei a devenit mai intensă cu creșterea concentrațiilor utilizate, atât în suspensiile mitocondriale, cât și pentru lipoproteinele serice. Cu toate acestea, procaina a fost mai eficientă la nivel mitocondrial, în timp ce GH3 a avut un efect mai intens la nivelul concentratelor lipoproteice, aceste observații putând fi puse pe seama diferitelor interacțiuni cu matricea și cu sistemele antioxidante ale celor două tipuri de probe biologice (Lee et al., 2010, Rusu, 1989, Rusu, 1992). Diferențele între acțiunea celor două au fost notabile la concentrații mai scăzute, efectul devenind similar la concentrații mari.

Testarea acțiunii protectoare a GH3 și procainei în condiții pro-inflamatorii a fost realizată într-un model experimental cu limfocite Jurkat. Am ales drept referință curcumina, întrucât este o moleculă cu bine cunoscute efecte antioxidante (Margina et al., 2013, Margina et al., 2015). Rezultatele obținute au indicat că GH3 are, la concentrații scăzute, efecte comparabile cu cele ale curcuminei în diminuarea generării peroxizilor lipidici la nivelul membranei celulare.

11.5. Concluzii parțiale

În concluzie, studiul acesta aduce noi dovezi ale implicațiilor directe ale GH3 în diminuarea generării radicalilor liberi și peroxidării lipidice membranare, la nivel celular, subcelular și seric, efecte ce pot fi atribuite în principal procainei.

12. Concluzii și contribuții personale

În cadrul studiilor derulate în perioada doctoratului, au fost îndeplinite obiectivele propuse inițial. Astfel, metodele dezvoltate și optimizate sunt unele rapide, accesibile și reproductibile, prezentând posibilitatea de a fi adaptate procesării semiautomate sau automate, în timp ce parametrii serici determinați sunt utili în aprecierea statusului redox pentru pacienții cu afecțiuni inflamatorii cronice, atât de intensitate crescută, cât și scăzută. Totodată, acestea pot fi utilizate și pentru evaluarea statusului redox la nivel tisular și mitocondrial. De asemenea, cu ajutorul parametrilor testați, alături de cei biochimici de rutină, am analizat efectele asupra perturbărilor redox și apărării antioxidante ale unui fitopreparat antidiabetic, atât într-un model preclinic de diabet zaharat, cât și în context clinic, într-o populație de pacienți cu DZT2.

În continuare sunt prezentate, pe scurt, contribuțiile personale, rezultatele originale și concluziile studiilor ce constituie partea experimentală.

Scopul studiului prezentat în cadrul în **capitolul 1** a fost **testarea inițială a metodei de determinare a peroxidării lipidice cu Amplex Red, la nivelul lipoproteinelor serice izolate. Am dezvoltat o metodă originală, rapidă și accesibilă de evaluare a statusului redox al lipoproteinelor serice, în absența HRP.** Aceasta este relevantă pentru aprecierea riscului cardiometabolic, **întrucât simplele determinări cantitative nu reflectă funcționalitatea lipoproteinelor serice.**

În cadrul studiului prezentat în **capitolului 2** am urmărit aplicarea metodei AR optimizate pentru evaluarea statusului redox lipoproteic la două grupuri de pacienți cu status inflamator cronic diferit: de intensitate crescută – pacienți cu poliartrită reumatoidă și de intensitate scăzută – diabet zaharat de tip 2. În urma evaluării glicării și oxidării avansate a proteinelor serice și a proteomului lipoproteinelor serice, alături de evaluarea peroxidării lipidice, nu am observat diferențe semnificative ale afectării redox a lipoproteinelor între cele două grupuri de studiu, cu toate că profilul lipidic al pacienților cu PAR a fost similar grupului de control. Având în vedere că determinările biochimice de rutină nu reflectă funcționalitatea acestora, **parametrii redox propuși sunt indicatori mai buni ai statusului cardiometabolic pentru pacienții cu afecțiuni inflamatorii cronice.**

În continuare, în studiul prezentat în **capitolul 3**, am urmărit creșterea setului de parametri prin optimizarea unei **micrometode de determinare a peroxidării lipidice cu Xylenol Orange și adaptarea unei micrometode AR**, în vederea diminuării consumului de reactivi și scăderii

timpului de analiză. De asemenea, **am extins utilizarea celor două metode pentru probe de omogenate tisulare și organite celulare izolate**, cu menținerea sensibilității acestora și adaptarea parametrilor de lucru. Pentru probele de ser și de lipoproteine izolate, nu am găsit corelații semnificative între cele două metode, cel mai probabil, datorită interacțiunilor diferite cu speciile oxidante de la acest nivel. **Metoda AR s-a dovedit mai utilă în evaluarea statusului redox seric, cel mai probabil datorită mecanismului direct de generare al rezorufinei.** În cazul metodei FOX, generarea complexului $\text{Fe}^{3+}\text{-XO}$ și stabilizarea acestuia are loc în urma interacțiunii Fe^{2+} din reactiv cu SRO. Spre deosebire de rezultatele obținute pe ser și lipoproteine izolate, **la evaluarea statusului redox tisular și mitocondrial, cele două metode s-au corelat pozitiv semnificativ.** Contrastul dintre aceste rezultate se datorează diferențelor semnificative în ceea ce privește matricea probelor și nivelurilor mult mai mari de SRO din probele tisulare.

Ulterior, utilizând parametrii testați anterior în evaluarea statusului redox și, implicit, cardiometabolic, am ales drept model al stării inflamatorii cronice de joasă intensitate diabetul zaharat. De asemenea, având în vedere că fumatul este un factor de risc important al dezvoltării și progresiei bolilor metabolice și cardiovasculare, fiind implicat în accentuarea stresului oxidativ și inflamației sistemice, am evaluat utilitatea markerilor redox determinați în evidențierea diferențelor afectării redox a HDL la pacienți diabetici, cu istoric diferit de fumat.

Rezultatele studiului prezentat **capitolul 4** indică o **peroxidare lipidică a lipoproteinelor de înaltă densitate mai accentuată pentru diabeticii cu un istoric de fumat**, pe când din punct de vedere al parametrilor biochimici de rutină nu am observat diferențe semnificative. Mai mult, **renunțarea la fumat nu a determinat îmbunătățirea semnificativă statusul redox a lipoproteinelor de înaltă densitate.**

Cu toate acestea, implicațiile complexe ale renunțării la fumat asupra statusului inflamator nu au fost evaluate în acest studiu, ele putând evidenția o îmbunătățire a statusului cardiometabolic. Astfel, în studiul prezentat în **capitolul 5**, pe lângă determinare peroxidării lipidice a HDL, determinată de acesta dată cu o concentrație de sondă mai mare, pentru reevaluarea concentrației optime, am măsurat și o serie de markeri clasici ai procesului inflamator.

Am observat **diferențe semnificative din punct de vedere al statusului inflamator seric între pacienții cu DZT2 și, mai mult, între subgrupurile formate pe baza istoricului de fumat, și grupul de control.** Cu toate acestea, nu am găsit diferențe semnificative în ceea ce privește peroxidarea lipidică de la nivelul HDL. Astfel, utilizarea concentrației mai scăzute de sonda a condus la rezultate mai bune în discriminarea afectării redox a HDL.

Totodată, dintre parametrii determinați și calculați, unii, precum AOPPs, AGEs, CRP, CRP/HDL, CRP/IL-6, IL-10/IL-6 și IH1 au fost utili în evidențierea diferențelor dintre diabetici și populația normală, cu posibilă valoare de diagnostic sau prognostic. Alții, ca CRP, CRP/HDL și IH2, ar putea fi utilizați pentru evaluarea dinamicii statusului cardiometabolic în cazul diferitelor populații de pacienți cu DZT2, prezentând în cazul acestui studiu valoare discriminatorie la compararea pacienților cu istoric diferit de fumat. De asemenea, am identificat o strânsă legătură între controlul glicemic și markerii de evaluare ai statusului inflamator, glicemia fiind corelată pozitiv cu parametrii inflamatori și invers cu cei antiinflamatori pentru pacienții fumători.

În cadrul studiului preclinic din **capitolul 6** am urmărit, într-un model de diabet aloxanic, evaluarea efectelor asupra statusului redox seric și tisular ale unui fitopreparat antidiabetic folosit drept adjuvant în terapia DZT2, care conține fructe de afin (*Vaccinium myrtillus*), coacăz negru (*Ribes nigrum*), măceș (*Rosa canina*) și ardei (*Capsicum annuum*), comparativ cu cel a doua molecule antidiabetice: metformin și gliclazid.

Astfel, **tratamentul cu metformin a condus la rezultatele cele mai bune în ceea ce privește glicemia sau/și oxidarea proteinelor și lipoxidarea la nivel seric și al lipoproteinelor serice, cu ameliorarea statusului redox seric și al HDL. Utilizarea fitopreparatului îmbunătățește capacitatea antioxidantă serică, inclusiv a lipoproteinelor.** La nivel tisular, instituirea tratamentului antidiabetic a condus la o creștere a activității redox mitocondriale la nivel hepatic, însă fără afectarea statusului redox global tisular. Din punct de vedere al analizei histopatologice, între grupurile de animale aflate sub tratament nu s-au evidențiat diferențe notabile, acestea prezentând un aspect mai bun față de animalele diabetice netratate.

Studiul prezentat în **capitolul 7** a avut drept scop evaluarea, în context clinic, a efectelor asupra statusului redox seric a utilizării pe termen lung a fitopreparatului antidiabetic testat anterior, într-o populație de pacienți cu DZT2 cu abordări terapeutice diferite, incluzând și fitopreparatul antidiabetic drept adjuvant al terapiei farmacologice (metformin și gliclazid, mono- sau biterapie) sau al măsurilor igienico-dietetice.

Pentru întregul grup de studiu, **glicemia a fost invers proporțională cu apărarea antioxidantă serică, acesta fiind, alături de cea a HDL și LDL, semnificativ mai mică față de grupul de control.** Cu toate că nivelurile serice ale HDL au fost mai mari în grupul de control față de cel tratat cu FA, peroxidarea lipidică a acestei fracții lipoproteice a fost asemănătoare, și similară grupului tratat cu metformin, cu valori mai mici comparativ cu celelalte grupuri diabetice. În ceea

ce privește **afectarea redox a HDL, controlul glicemic pare a fi un bun predictor al acesteia, atât glicemia curentă, cât și cea de la diagnosticare fiind corelate cu aceasta.**

Astfel, utilizarea cronică a fitopreparatului a avut efecte pozitive asupra HDL și LDL, ameliorând totodată și markerii redox serici. Folosirea acestuia drept adjuvant al terapiei farmacologice a diabetului zaharat, poate conduce la ameliorarea notabilă a statusului redox și diminuarea riscului cardiovascular. Cu toate acestea, pentru stabilirea mecanismelor de acțiune și eficacității pe termen lung, sunt necesare și studii clinice controlate.

În **ultimul capitol**, am prezentat un studiu pilot care a avut drept scop evaluarea activității antioxidante a procainei și GH3 asupra formării SRO și peroxidării lipidice, la nivel celular, subcelular și seric, prin utilizarea mai multor modele experimentale, precum mitocondrii izolate, concentrate de lipoproteine serice și limfocite Jurkat. În acest context, am putut aplica în condiții experimentale, pentru evaluarea efectelor celulare ale unui preparat clasic, metodele dezvoltate și optimizate în cursul prezentei teze de doctorat. Testarea acțiunii protectoare a GH3 și procainei în condiții proinflamatorii a fost realizată într-un model experimental cu limfocite Jurkat, rezultatele obținute indicând un efect similar curcuminei în diminuarea generării peroxizilor lipidici la nivelul membranei celulare. **Atât la nivel mitocondrial, cât și la nivel seric, acțiunea antioxidantă observată pentru GH3 și procaină a devenit mai intensă cu creșterea concentrațiilor utilizate.** Acest studiu restrâns aduce noi dovezi privind implicațiile directe ale procainei și, implicit, GH3 în diminuarea generării radicalilor liberi și peroxidării lipidice membranare, la nivel celular, subcelular și seric. **Acestea pot fi atribuite cu precădere procainei, însă este necesară extinderea acestor studii pentru determinarea mecanismului molecular de acțiune al acesteia.**

Principala limitare a studiilor prezentate în aceasta lucrare este de numărul relativ mic de pacienți incluși în studiile prezentate, întrucât pentru validarea unui parametru și stabilirea intervalelor normale și patologice este necesară o populație de studiu însemnată, constituită atât din indivizi sănătoși, cât și bolnavi. Cercetările vor fi continuate în perioada post-doctorală cu creșterea numărului de pacienți pentru validarea markerilor propuși pentru utilizarea clinică. De asemenea, se va încerca extinderea setului de parametrii redox prin utilizarea de noi sonde fluorimetrice (precum rodamina 123). Considerăm de o importanță crucială evaluarea statusului redox și inflamator la pacienții cu diferite patologii, dar în egală măsură și utilizarea aceluiași markeri pentru evaluarea efectelor induse de diferite molecule farmacologic active în modele celulare, în studii preclinice și respectiv pentru monitorizarea clinică a eficacității acestora.

Bibliografie

- ALHAIDER, A. A., KORASHY, H. M., SAYED-AHMED, M. M., MOBARK, M., KFOURY, H. & MANSOUR, M. A. 2011. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chem Biol Interact*, 192, 233-42.
- ASTHANA, A., JOHNSON, H. M., PIPER, M. E., FIORE, M. C., BAKER, T. B. & STEIN, J. H. 2010. Effects of smoking intensity and cessation on inflammatory markers in a large cohort of active smokers. *Am Heart J*, 160, 458-63.
- ATTIA, H. N., AL-RASHEED, N. M., AL-RASHEED, N. M., MAKLAD, Y. A., AHMED, A. A. & KENAWY, S. A. 2012. Protective effects of combined therapy of gliclazide with curcumin in experimental diabetic neuropathy in rats. *Behav Pharmacol*, 23, 153-61.
- BARTLING, B., HOFMANN, H. S., SOHST, A., HATZKY, Y., SOMOZA, V., SILBER, R. E. & SIMM, A. 2011. Prognostic potential and tumor growth-inhibiting effect of plasma advanced glycation end products in non-small cell lung carcinoma. *Mol Med*, 17, 980-9.
- BONACCIO, M., POUNIS, G., CERLETTI, C., DONATI, M. B., IACOVIELLO, L., DE GAETANO, G. & INVESTIGATORS, M.-S. S. 2017. Mediterranean diet, dietary polyphenols and low grade inflammation: results from the MOLI-SANI study. *Br J Clin Pharmacol*, 83, 107-113.
- CALDER, P. C., BOSCO, N., BOURDET-SICARD, R., CAPURON, L., DELZENNE, N., DORE, J., FRANCESCHI, C., LEHTINEN, M. J., RECKER, T., SALVIOLI, S. & VISIOLI, F. 2017. Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Res Rev*, 40, 95-119.
- CHILELLI, N. C., BURLINA, S. & LAPOLLA, A. 2013. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a "glycooxidation-centric" point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 23, 913-9.
- FEIGERLOVA, E. & BATTAGLIA-HSU, S. F. 2017. IL-6 signaling in diabetic nephropathy: From pathophysiology to therapeutic perspectives. *Cytokine Growth Factor Rev*, 37, 57-65.
- FRIJHOFF, J., WINYARD, P. G., ZARKOVIC, N., DAVIES, S. S., STOCKER, R., CHENG, D., KNIGHT, A. R., TAYLOR, E. L., OETTRICH, J., RUSKOVSKA, T., GASPAROVIC, A. C., CUADRADO, A., WEBER, D., POULSEN, H. E., GRUNE, T., SCHMIDT, H. H. & GHEZZI, P. 2015. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 23, 1144-70.
- GLASS, C. K., SAIJO, K., WINNER, B., MARCHETTO, M. C. & GAGE, F. H. 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-34.
- GONZALEZ-GAY, M. A. & GONZALEZ-JUANATEY, C. 2014. Inflammation and lipid profile in rheumatoid arthritis: bridging an apparent paradox. *Ann Rheum Dis*, 73, 1281-3.
- GOTOH, K., FUJIWARA, K., ANAI, M., OKAMOTO, M., MASAKI, T., KAKUMA, T. & SHIBATA, H. 2017. Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity [Review]. *Endocr J*, 64, 375-378.
- GRZEBYK, E. & PIWOWAR, A. 2014. The Tibetan herbal medicines Padma 28 and Padma Circosan inhibit the formation of advanced glycation endproducts (AGE) and advanced oxidation protein products (AOPP) in vitro. *BMC Complement Altern Med*, 14, 287.
- HE, B. M., ZHAO, S. P. & PENG, Z. Y. 2013. Effects of cigarette smoking on HDL quantity and function: implications for atherosclerosis. *J Cell Biochem*, 114, 2431-6.
- HUANG, W. Y., ZHANG, H. C., LIU, W. X. & LI, C. Y. 2012. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J Zhejiang Univ Sci B*, 13, 94-102.

- JOSEPH, A. M., HECHT, S. S., MURPHY, S. E., LANDO, H., CARMELLA, S. G., GROSS, M., BLISS, R., LE, C. T. & HATSUKAMI, D. K. 2008. Smoking reduction fails to improve clinical and biological markers of cardiac disease: a randomized controlled trial. *Nicotine Tob Res*, 10, 471-81.
- KALOUSOVA, M., SKRHA, J. & ZIMA, T. 2002. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res*, 51, 597-604.
- KATTOOR, A. J., POTHINENI, N. V. K., PALAGIRI, D. & MEHTA, J. L. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 19, 42.
- KELESIDIS, T., ROBERTS, C. K., HUYNH, D., MARTINEZ-MAZA, O., CURRIER, J. S., REDDY, S. T. & YANG, O. O. 2014. A high throughput biochemical fluorometric method for measuring lipid peroxidation in HDL. *PLoS One*, 9, e111716.
- KHANSARI, N., SHAKIBA, Y. & MAHMOUDI, M. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 3, 73-80.
- KOTAS, M. E. & MEDZHITOV, R. 2015. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*, 160, 816-827.
- LEE, J. M., SUH, J. K., JEONG, J. S., CHO, S. Y. & KIM, D. W. 2010. Antioxidant effect of lidocaine and procaine on reactive oxygen species-induced endothelial dysfunction in the rabbit abdominal aorta. *Korean J Anesthesiol*, 59, 104-10.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
- LUO, H., CHIANG, H. H., LOUW, M., SUSANTO, A. & CHEN, D. 2017. Nutrient Sensing and the Oxidative Stress Response. *Trends Endocrinol Metab*, 28, 449-460.
- MARGINA, D., GRADINARU, D., MANDA, G., NEAGOE, I. & ILIE, M. 2013. Membranar effects exerted in vitro by polyphenols - quercetin, epigallocatechin gallate and curcumin - on HUVEC and Jurkat cells, relevant for diabetes mellitus. *Food Chem Toxicol*, 61, 86-93.
- MARGINA, D., OLARU, O. T., ILIE, M., GRADINARU, D., GUTU, C., VOICU, S., DINISCHIOTU, A., SPANDIDOS, D. A. & TSATSAKIS, A. M. 2015. Assessment of the potential health benefits of certain total extracts from *Vitis vinifera*, *Aesculus hippocastanum* and *Curcuma longa*. *Exp Ther Med*, 10, 1681-1688.
- MCPHERSON, P. A., YOUNG, I. S., MCKIBBEN, B. & MCENENY, J. 2007. High density lipoprotein subfractions: isolation, composition, and their duplicitous role in oxidation. *J Lipid Res*, 48, 86-95.
- MEDZHITOV, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-35.
- MILETIĆ N., P. B., MITROVIĆ O., KANDIĆ M., LEPOSAVIĆ A. 2014. Phenolic compounds and antioxidant capacity of dried and candied fruits commonly consumed in Serbia. *Czech Journal of Food Sciences* 32, 360-368.
- MILITARU M, C. E., SOARE T, ȘTIRBU-TEOFĂNESCU B, NICOLAESCU M, DINESCU G, MILITARU D, SERDARU M, CONSTANTINESCU C, SAVU C 2008. Microleziuni hepatice și musculare în contextul modificărilor de profil metabolic la suinele abatorizate. *Revista Română de Medicină Veterinară*, 18, 51-70.
- MINIHANE, A. M., VINOY, S., RUSSELL, W. R., BAKA, A., ROCHE, H. M., TUOHY, K. M., TEELING, J. L., BLAAK, E. E., FENECH, M., VAUZOUR, D., MCARDLE, H. J., KREMER, B. H., STERKMAN, L., VAFEIADOU, K., BENEDETTI, M. M., WILLIAMS, C. M. & CALDER, P. C. 2015. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr*, 114, 999-1012.

- MYASOEDOVA, E., CROWSON, C. S., KREMERS, H. M., FITZ-GIBBON, P. D., THERNEAU, T. M. & GABRIEL, S. E. 2009. Total cholesterol and LDL levels decrease before rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 69, 1310-4.
- NAIR, A. B. & JACOB, S. 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*, 7, 27-31.
- NATHAN, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-52.
- NAVAB, M., ANANTHARAMAIAH, G. M., REDDY, S. T., VAN LENTEN, B. J., ANSELL, B. J. & FOGELMAN, A. M. 2006. Mechanisms of disease: proatherogenic HDL--an evolving field. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2, 504-11.
- NEGREŞ S, C. C., MOROŞAN E, ARSENE A 2013. Experimental pharmacological model of diabetes induction with aloxan in rats. *Farmacologia*, 61, 313-322.
- PIZZINO, G., IRRERA, N., CUCINOTTA, M., PALLIO, G., MANNINO, F., ARCORACI, V., SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D. & BITTO, A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 8416763.
- POCHAT-COTILLOUX, C., BIENVENU, J., NGUYEN, A. M., OHANESSIAN, R., GHESQUIERES, H., SEVE, P., GARNIER, L. & KODJIKIAN, L. 2018. Use of a Threshold of Interleukin-10 and Il-10/Il-6 Ratio in Ocular Samples for the Screening of Vitreoretinal Lymphoma. *Retina*, 38, 773-781.
- RUSU, C., BORSA, C. GRADINARU, D., IONESCU, C. 1992. Gerovital H3 effect on the peroxidation potential and superoxide dismutase activity in rat liver, brain and kidney homogenates. *Rom. J. Geront. Geriat.*, 13, 93-100.
- RUSU, C., LUPEANU, E. 1989. Inhibitory effect of procaine, Gerovital H3 and Aslavital on the production of superoxide radical. *Rom. J. Geront. Geriat.*, 10, 117-129.
- SACK, M. N., FYHRQUIST, F. Y., SAIJONMAA, O. J., FUSTER, V. & KOVACIC, J. C. 2017. Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol*, 70, 196-211.
- SALIM, S. 2017. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*, 360, 201-205.
- SAPBAMRER, R., KHACHA-ANANDA, S., SITTITON, N., WUNNAPUK, K., SEESEN, M., SIDTHILAW, S., CHITTRAKUL, J. & SUWANNAKUL, B. 2019. A longitudinal follow-up study of oxidative stress and DNA damage among farmers exposed to pesticide mixtures. *Environ Sci Pollut Res Int*.
- SAVINI, I., CATANI, M. V., EVANGELISTA, D., GASPERI, V. & AVIGLIANO, L. 2013. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci*, 14, 10497-538.
- SIES, H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 4, 180-3.
- SMIDOWICZ, A. & REGULA, J. 2015. Effect of nutritional status and dietary patterns on human serum C-reactive protein and interleukin-6 concentrations. *Adv Nutr*, 6, 738-47.
- SUMMERS, F. A., ZHAO, B., GANINI, D. & MASON, R. P. 2013. Photooxidation of Amplex Red to resorufin: implications of exposing the Amplex Red assay to light. *Methods Enzymol*, 526, 1-17.
- SUN, J., SU, J., XIE, Y., YIN, M. T., HUANG, Y., XU, L., ZHOU, Q. & ZHU, B. 2016. Plasma IL-6/IL-10 Ratio and IL-8, LDH, and HBDH Level Predict the Severity and the Risk of Death in AIDS Patients with Pneumocystis Pneumonia. *J Immunol Res*, 2016, 1583951.
- SUYASA, I. K., KAWIYANA, I. K., BAKTA, I. M. & WIDIANA, I. G. 2017. Interleukin-6 and ratio of plasma interleukin-6/interleukin-10 as risk factors of symptomatic lumbar osteoarthritis. *World J Orthop*, 8, 149-155.
- TAKATA, K., IMAIZUMI, S., KAWACHI, E., SUEMATSU, Y., SHIMIZU, T., ABE, S., MATSUO, Y., TSUKAHARA, H., NODA, K., YAHIRO, E., ZHANG, B., UEHARA, Y.,

- MIURA, S. & SAKU, K. 2014. Impact of cigarette smoking cessation on high-density lipoprotein functionality. *Circ J*, 78, 2955-62.
- TIBUAKUU, M., KAMIMURA, D., KIANOUSH, S., DEFILIPPIS, A. P., AL RIFAI, M., REYNOLDS, L. M., WHITE, W. B., BUTLER, K. R., MOSLEY, T. H., TURNER, S. T., KULLO, I. J., HALL, M. E. & BLAHA, M. J. 2017. The association between cigarette smoking and inflammation: The Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) study. *PLoS One*, 12, e0184914.
- UNGURIANU, A., SEREMET, O., GRADINARU, D., IONESCU-TIRGOVISTE, C., MARGINA, D. & DANCIULESCU MIULESCU, R. 2019. Spectrophotometric versus spectrofluorometric assessment in the study of the relationships between lipid peroxidation and metabolic dysregulation. *Chem Biol Drug Des*.
- UNGURIANU A., D.-M. R., GRĂDINARU D., ILIE M., MARGINĂ D. 2016. Fluorimetric assays for measuring the redox status of HDL. *INTERDIAB 2016: DIABETES MELLITUS AS CARDIOVASCULAR DISEASE Book Series*, 2, 477-489.
- VOZAROVA, B., FERNANDEZ-REAL, J. M., KNOWLER, W. C., GALLART, L., HANSON, R. L., GRUBER, J. D., RICART, W., VENDRELL, J., RICHART, C., TATARANNI, P. A. & WOLFORD, J. K. 2003. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet*, 112, 409-13.
- WAKABAYASHI, I. 2014. Smoking and lipid-related indices in patients with diabetes mellitus. *Diabet Med*, 31, 868-78.
- WIECKOWSKI, M. R., GIORGI, C., LEBIEDZINSKA, M., DUSZYNSKI, J. & PINTON, P. 2009. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc*, 4, 1582-90.
- WU, D., WEN, W., QI, C. L., ZHAO, R. X., LU, J. H., ZHONG, C. Y. & CHEN, Y. Y. 2012. Ameliorative effect of berberine on renal damage in rats with diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Phytomedicine*, 19, 712-8.
- YAO, H., FENG, J., ZHENG, Q., WEI, Y., WANG, S. & FENG, W. 2016. The effects of gliclazide, methylcobalamin, and gliclazide+methylcobalamin combination therapy on diabetic peripheral neuropathy in rats. *Life Sci*, 161, 60-8.
- YAZGAN, U. C., TASDEMIR, E., BILGIN, H. M., DENIZ OBAY, B., SERMET, A. & ELBEY, B. 2015. Comparison of the anti-diabetic effects of resveratrol, gliclazide and losartan in streptozotocin-induced experimental diabetes. *Arch Physiol Biochem*, 121, 157-61.
- ZHISHEN, J., MENGCHENG, T. & JIANMING, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

Lista de lucrări din tema de cercetare a tezei de doctorat

Capitole în cărți de specialitate

Spectral methods of assessing redox imbalances in biological samples, **A. Ungurianu**, D. Grădinaru, D. Margină in Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences (Capitolul 5), Transilvania University Press, 2016, ISBN 978-606-19-0768-7

Articole in extenso publicate în reviste indexate ISI

1. Spectrophotometric versus spectrofluorimetric assessment in the study of the relationships between lipid peroxidation and metabolic dysregulation, **A. Ungurianu**, O. Șeremet, D. Grădinaru, C. Ionescu-Tîrgoviște, D. Margină, R. Dănciulescu-Miulescu, Chem Biol Drug Des., 2019;00:1–10, doi:10.1111/cbdd.13474 (2017 **IF: 2.328**)
2. Adiponectin tissue level – state of the art marker of cardiovascular risk in obese patients, **A. Ungurianu**, D. Margină, C. Băcanu, D. Grădinaru, M. Ilie, R. Dănciulescu Miulescu, L. Constantin, INTERDIAB 2017: 3rd International Conference on Interdisciplinary Management of Diabetes Mellitus and its Complications Book Series (3): 341-349, 2017, ISSN-2393-3488
3. Lipoprotein redox status evaluation as a marker of cardiovascular disease in patients with inflammatory disease, **A. Ungurianu**, D. Margină, C. Băcanu, M. Ilie, C. Tsitsimpikou, K. Tsarouhas, D. A. Spandidos, A. M. Tsatsakis, Mol Med Report, 15(1): 256-262, 2017, doi: 10.3892/mmr.2016.5972, (2017 **IF: 1.922**)
4. Fluorimetric assays for measuring the redox status of HDL, **A. Ungurianu**, R. Dănciulescu-Miulescu, D. Grădinaru, M. Ilie, D. Margină, INTERDIAB 2016: DIABETES MELLITUS AS CARDIOVASCULAR DISEASE Book Series: International Conference on Interdisciplinary Management of Diabetes Mellitus and its Complications (2): 477-489, 2016, ISSN-2393-3488.

Articole in extenso publicate în reviste indexate BDI sau în reviste din țară recunoscute de către CNCSIS (cel puțin categoria B)

1. Impact of smoking on HDL particles lipid peroxidation in type 2 diabetes, **A. Ungurianu**, D. Margină, D. Grădinaru, R. Dănciulescu-Miulescu, C. Ionescu-Tîrgoviște, InterDiab Book Series, (4):29-17, ISSN 2393-3488

Studii publicate în rezumat în volume indexate ISI Thomas Reuters

1. The effects of a plant-based antidiabetic supplement on the antioxidant capacity of serum and serum lipoproteins in diabetic rats, **A. Ungurianu**, O. Șeremet, D. Grădinaru, C. Ionescu-Tîrgoviște, R. Dănciulescu-Miulescu, D. Margină, Toxicology Letters (2017 **IF 3.166**), DOI 10.1016/j.toxlet.2018.06.558
2. Assessment of serum oxidative stress biomarkers for smoking patients in different age groups, **A. Ungurianu**, D. Margină, D. Grădinaru, Toxicology Letters (2017 **IF 3.166**), DOI 10.1016/j.toxlet.2017.07.267
3. Quantification of lipoprotein status in elderly patients – **A. Ungurianu**, G. Nițulescu, D. Grădinaru, M. Ilie, D Margină, Toxicology Letters (2016 **IF 3.858**): EUROTOX 2016, DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.06.1388

Studii publicate în rezumat în volumele unor manifestări științifice cu ISBN/ISSN

1. Protocoale biochimice pentru evaluarea dezechilibrelor redox în probele biologice, D. Margină, **A. Ungurianu**, M. Hănciuanu, C. Mircea, C. Dehelean, G. Nițulescu, M. Nițulescu, O. Olaru, O. Șeremet, D. Grădinaru, CNFR 2018 Abstract Book, p. 71, ISSN 2537-2823
2. Influența renunțării la fumat asupra HDL la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 **A. Ungurianu**, D. Grădinaru, C. Ionescu-Tîrgoviște, D. Margină, CNFR 2018 Abstract Book, p. 79, ISSN 2537-2823
3. Optimization of spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the assessment of tissue and mitochondrial redox status, **A. Ungurianu**, O. Șeremet, D. Grădinaru, R. Dănciulescu-Miulescu, C. Ionescu-Tîrgoviște, D. Margină, cartea de rezumate a celui de al 12-lea Congresului Anual al Asociației Medicale Române, 30 august – 1 septembrie 2018, București
4. The impact of chronic inflammation on the redox status of serum proteins, **A. Ungurianu**, D. Grădinaru, R. Dănciulescu-Miulescu, C. Băcanu, D. Margină, MÆDICA - a Journal of Clinical Medicine – Supplement 2018, 13(16), p. 11, ISSN 2501-6903
5. Antioxidant assessment of Gerovital H3 solution compared to natural components, **A. Ungurianu**, D. Margină, D. Grădinaru, IC-DRBG Abstract Book, 120, ISBN 978-973-664-848-9

6. Relevanța calitativă a lipoproteinelor de înaltă densitate în evaluarea statusului cardiometabolic, **A. Ungurianu**, D. Grădinaru, D. Margină, Volumul de rezumate al Conferinței Naționale de Farmacie Clinică, ediția a doua, 160, ISBN 978-973-0-24609-4
7. Gerovital H3 – Noi mecanisme de acțiune ale celui mai longeviv medicament anti-aging, D. Grădinaru, D. Margină, **A. Ungurianu**, G.-I. Prada, Volumul de rezumate al Conferinței Naționale de Farmacie Clinică, ediția a doua, 117, ISBN 978-973-0-24609-4
8. Efectul antioxidant al Gerovitalului H3 – un studiu preliminar, **A. Ungurianu**, D. Margină, D. Grădinaru, *Maedica – a journal of clinical medicine*, Vol 12(15) Supplement 2017, 46, ISSN 2501-6903
9. Adiponectina – marker relevant în aprecierea statusului cardiometabolic al pacienților cu obezitate avansată, **A. Ungurianu**, D. Margină, C. Băcanu, D. Grădinaru, M. Ilie, R. Dănciulescu Miulescu, Laura Constantin, *Revista Medicală Română*, Vol. LXIV, Suppl 2017, ISSN 1220-5478
10. Evaluation of lipoprotein redox status in patients with different states of inflammatory burden, **A. Ungurianu**, D. Grădinaru, C. Băcanu, M. Ilie, D. Margină, lucrare publicată în volumul de rezumate al Erisman Institute of Hygiene and Toxicology Conference, November 2016, ISBN 978-5-394-02775-8
11. Evaluarea funcționalității lipoproteinelor plasmatice la pacienții cu boli inflamatorii cronice, **A. Ungurianu**, D. Grădinaru, C. Băcanu, M. Ilie, D. Margină, lucrare publicată în volumul de rezumate al Congresului Național al Farmaciștilor din România 2016, București, 28 septembrie – 01 octombrie 2016, ISSN 2537-2823
12. Effects of smoking on serum biomarkers of oxidative stress in young and old individuals, D. Grădinaru, **A. Ungurianu**, R. Dănciulescu-Miulescu, C. Borșa, C. Ionescu, D. Margină, acceptat pentru publicare în cadrul volumului Congresului Anual al Asociației Medicale Române, București, 25-27 aprilie 2016
13. Analiza funcțională a HDL – dezvoltarea unei noi metode, **A. Ungurianu**, R. Dănciulescu-Miulescu, D. Grădinaru, M. Ilie, D. Margină, acceptat pentru publicare în cadrul volumului Congresului Anual al Asociației Medicale Române, București, 25-27 aprilie 2016