



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI FACULTATEA  
DE MEDICINĂ ȘCOALA DOCTORALĂ  
CATEDRA DE BIOCHIMIE**

*Implicațiile biochimice ale suplimentelor nutritive în  
terapia cu glucocorticoizi*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. MOHORA MARIA**

**Student-doctorand:  
RĂTESCU CĂS. DINU ADRIANA**

**2020**

# Cuprins

INTRODUCERE .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1. NANOMEDICINA .....	9
1.1 Definiție și noțiuni generale .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2. Scurt istoric .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.Nanotehnologie .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4. Caracteristici ale nanoparticulelor.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.5. Administrarea nanoparticulelor .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.6. Farmacocinetica medicamentelor nanoformule .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.6.1. Biodistribuția .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.6.2. Metabolizarea și excreția .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.7. Avantajele folosirii nanoparticulelor.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.8. Efectele adverse ale nanoparticulelor.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.9. Exemple de nanoparticule folosite în terapie .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.10. Nanoparticulele acid poli lactic-co glicolic (PLGA)...	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2. MODIFICĂRI FIZIOPATOLOGICE ÎN OBEZITATE .....	10
2.1.Definire și epidemiologie .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2. Normoponderali obezi.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3. Obezi normali metabolic .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4. Fiziopatologia obezității.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5. Aportul de alimente.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.1. Adipokinele în metabolism.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.2. Adipokinele în imunitate .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.3. Adipokinele în sistemul CV și renal.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6. Complicațiile obezității .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6.1. Complicațiile inflamatorii ale obezității .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

2.6.2. Complicațiile cardioasculare în obezitate.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6.3. Complicațiile renale în obezitate .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3. GLUCOCORTICOIZII.....	10
3.1. Structura și sinteza glucocorticoizilor .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2. Transportul glucocorticosteroidelor .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3. Metabolismul cortizolului .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4. Reglarea secreției cortizolului.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.5. Mecanism de acțiune.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.6. Farmacocinetică .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.7. Efectele cortizolului pe metabolismul intermediar.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.8. Efectul antiinflamator și imunosupresor al Glucocorticizilor.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.9.Efectul cortizolului pe sistemul endocrin.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.10. Efectul cortizolului pe sistemul CV .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.11. Efectul cortizolului pe sistemul musculoscheletal .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.12. Efectul cortizolului la nivel renal .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.13. Efectul cortizolului la nivel hematologic .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.14. Efectul cortizolului la nivelul SNC .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.15. Efectul cortizolului la nivelul pielii.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.16. Cortizol și obezitate.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.17. Efectele secundare oftalmologice ale administrării corticoizilor.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.18. Nitrosteroidii.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4. SUPLIMENTELE NUTRITIVE UTILIZATE.....	11
4.1 Capacitatea totală antioxidantă.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.1.Generalități .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

4.1.2. Capacitatea totală antioxidantă în administrarea de suplimente nutritive .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.3 Influența luteinei asupra capacității antioxidante totale .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.4. Influența vitaminei E asupra capacității totale antioxidante..	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2. Vitamina E.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.1. Noțiuni generale .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.2. Surse .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.3. Distribuția .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.4. Metabolizarea .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.5. Eliminarea vitaminei E din organism .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.6. Rolurile vitaminei E.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3 Luteina.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3.1.Generalități. Surse .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3.2. Structura chimică.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3.3.Absorbția și transportul luteinei.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3.4. Doza zilnică.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3.5. Metabolizării luteinei .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3.6. Distribuția în țesuturi a xantofilelor.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3.7. Rolurile luteinei .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4. Acizii Grași Omega3 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4.1. Noțiuni generale .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4.2. Efectele acizilor grași ω3.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4.3. Nucile.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4.4. Uleiul de pește și Uleiul Lysi .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5. IPOTEZE DE LUCRU ȘI OBIECTIVE GENERALE.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

5.1. Date introductive .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2 Studiul pilot.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.3 Studiul propriu-zis:.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.MATERIALE ȘI METODE .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.1. Preambul.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.2. Organizarea studiului pilot.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.3. Organizarea studiului propriu-zis.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.4. Metodele de lucru.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.4.1. Metode pentru determinarea valorilor biologice sangvine ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.4.2. Metode pentru estimarea stresului oxidativ tisular.	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.4.3. Metode de lucru pentru examinarea histopatologică	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.4.4. Metode pentru examinarea imunohistochimică.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.5. Analiza statistică .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7. STUDIUL PILOT .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.1. Introducere la studiul pilot .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.2. Materiale și metodă studiul pilot.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3. Rezultate și discuții studiul pilot .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.1. Dieta obezogenă și greutatea corporală .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.2. Dieta obezogenă și glicemia .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.3. Implicațiile biochimice ale administrării vitaminei E sub formă de nanoparticule PLGA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.4. Implicațiile biochimice ale administrării acizilor grași omega-3 .	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.5. Implicațiile biochimice ale administrării vitaminei E sub formă de nanoparticule PLGA în combinație cu AG $\omega$ -3 din uleiul de pește .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

7.3.6. Influența vitaminei E sub formă de nanoparticule PLGA asupra markerilor tisulari de stres oxidativ .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.7. Rezultate și discuții privind aspectul de histologie	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.8. Rezultate și discuții privind aspectul imunohistochimic .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.4. Concluziile studiului pilot .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8. Studiul propriu-zis .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.1. Introducere în studiul propriu-zis .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.2. Material și metodă pentru studiul propriu-zis .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.3. Rezultate și discuții pentru studiul propriu-zis: .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.3.1. Valorile cortizolului seric .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.3.2. Valorile vitaminei E serice .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.4. Analize biochimice, histopatologice, imunohistochimice cu relevanță pentru cord .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.4.1. Valorile serice ale unor parametri biochimici .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.4.2. Aspectele histopatologice pe cord, examen hematoxilină-eozină	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.4.3. Evaluarea imunohistochimică.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.5. Analize biochimice, histopatologice, imunohistochimice, cu relevanță pe rinichi	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.5.1. Valorile sangvine ale unor parametri biochimici ...	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.5.2. Aspectele histopatologice pe rinichi, examen hematoxilină-eozină.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.5.3. Evaluarea imunohistochimică.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.6. Analize histopatologice pe mușchiul scheletic.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.7. Efectul luteinei sub formă de nanoparticule PLGA în prevenția afecțiunilor oculare induse de prednison.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

8.8. Rezultate și discuții privind efectul vitaminei E asupra greutății. **Error! Bookmark not defined.**

Concluzii..... **Error! Bookmark not defined.**

**Motto: „Fie ca hrana să-ți fie medicament  
și medicamentul hrană” Hipocrate**

### **Mulțumiri**

La finalul stagiului doctoral mă simt profund marcată de împlinire și recunoștință datorită faptului că am avut tot sprijinul și susținerea să duc la bun sfârșit acest desiderat.

Doresc să exprim recunoștința și respectul meu față de toți cei ce au contribuit în procesul formării mele profesionale dar în mod special susținătorilor în tot demersul prezentei cercetări pentru realizarea acestei teze de doctorat. Pe această cale doresc să mulțumesc acelor oameni minunați care mi-au oferit consultanță științifică în fiecare moment de colaborare, de multe ori împărțind cu mine timpul lor liber pentru a-mi oferi sprijin și ajutor.

Mulțumiri doamnei prof. Dr. Mohora Maria în calitate de conducător de doctorat, pentru atenta îndrumare pe care a manifestat-o pe parcursul anilor de studii doctorale pentru răbdarea și înțelegerea în realizarea acestei teze.

Mulțumiri speciale doamnei conf dr, Bogdana Virgolici pentru toată susținerea, sugestiile, răbdarea și dăruirea de care a dat dovadă pe tot parcursul acestei cercetări.

Mulțumiri echipei de suport din Facultatea de Medicină Veterinară București , doamnei conf dr Iuliana Ionașcu pentru colaborarea în examinarea clinică și oftalmologică a animalelor

studiate, doamnei dr Elvira Gagniuc asistent aniversitar pentru toată dăruirea și suportul în examinarea histologică a cercetării. Mulțumiri colegilor de la Facultatea de Medicină din Timișoara care ne-au donat anticorpii utilizați pentru studiul imunohistochimic al lamelor.

Mulțumiri domnului Dr Enache Valentin pentru examinările imunohistochimice în cadrul Laboratorului Institutului National Victor Babes București.

Mulțumiri doamnei dr Ramona Barac, asistent universitat pentru colaborarea pentru examinarea oftalmologică a animalelor studiate, a doua opinie.

Mulțumiri întregii echipe ce cercetare din cadrul departamentului de biochimie al Univesității de Medicină și Farmacie Carol Davila București.

Spre final as vrea să mulțumesc familiei restrânse pentru toată înțelegerea și susținerea acordată de-a lungul vremii, și mamei mele care mi-a deschis gustul pentru a căuta răspunsuri științifice.

In final și pentru tot ceea ce s-a putut înfăptui îi mulțumesc lui Dumnezeu care mi-a dat voița sănătatea și putința de a aduce la bun sfârșit teza început.

## INTRODUCERE

Trăim într-o perioadă de schimbări majore universale, pe diferite planuri ale stilului de viață. De la munca fizică și mișcare în aer liber, astăzi sub influența socio-economică recent agravată de criza sanitară COVID 19, societatea presează crearea și transformarea instruirii formale și non formale, a reuniunilor și locurilor de muncă în format digital, sedentar. Alimentația s-a procesat, cu condensarea caloriilor, diminuarea cantității de vitamine și oligoelemente. Stresul trăit astăzi, determină comportamente adaptative tot mai frecvent întâlnite. Toate acestea au un impact direct pe noua normalitate biologică: supraponderabilitate, obezitate ce determină morbiditate crescută cu preponderență inflamatorie și autoimună.

Astfel, obezitatea afectează în mod alarmant copilăria și tinerețea timpurie cu prognostic predefinit, în lipsa unor măsuri preventive. Aproximativ jumătate din populația lumii este supraponderală și obeză iar țara noastră ocupă locul 2 în Europa la obezitate infantilă.

Tulburările metabolice și endocrine multiple date de acțiunea adipokinelor produse de țesutul adipos perivisceral, încă de timpuriu, produc deteriorări progresive ale proceselor biologice la nivel molecular și nanometric ce rămân dificil de cuantificat. Obezitatea timpurie și adultă determină persistența statusului prooxidant printr-un cerc vicios: statusul prooxidant și proinflamator are răsunet molecular somatic, determină tulburări endocrine, boli cardiovasculare cu risc crescut de evenimente, boli metabolice, renale, hepatice cu înmulțirea patologiei inflamatorii cronice, ș.a.

Cunoașterea actuală privind creșterea nivelului hormonilor de stres și a statusului prooxidant ce produc deteriorarea progresivă a organelor interne, intricat cu activitatea perturbată a sistemului imun au în centru secreția anormal de mare a cortizolului, în încercarea de adaptare a organismului la mediul intern și extern perturbat.

Glucocorticoizii utilizați cronic stau la baza unor protocoale de tratament eficient (boli alergice, inflamatorii, autoimune, neoplaziile hematologice, evitarea rejetului după transplantul de organe) determinând efecte secundare nedorite pe termen lung în doze crescute ceea ce reprezintă o preocupare recunoscută de lumea medicală astăzi. De fapt o mare parte dintre pacienții ce au nevoie de terapie glucocorticoidă pe termen lung fac parte din categoria supraponderalilor și obezilor, chiar tulburările date de obezitate fiind cauza bolii ce necesită tratament cortizolic.

Medicina eumetabolică are preocupări actuale de a utiliza elementele nutriționale cele mai compatibile cu metabolismul personal pentru a favoriza reversibilitatea sau/și prevenția apariției tulburărilor metabolice actuale.

Conceptul cercetării pe model animal a fost făcut cu scopul de a obține date utile pentru populația obeză în cele două ipostaze diferite: în adolescență/primă tinerețe privind suplimentele sau asocierea lor ce pot reversa efectele adverse ale stilului actual de viață „obezogen” iar mai târziu la vârsta adultă identificarea acelor suplimente nutritive ce se pot utiliza asociat tratamentului cu presnison pentru a preveni sau încetini apariția efectelor adverse.

Teza este structurată în două părți importante ce însumează 8 capitole pe parcursul a 222 pagini iar bibliografia cuprinde 232 referințe, 58 tabele și 104 figuri.

## PARTEA GERNERALĂ

### 1. NANOMEDICINA

Majoritatea bolilor cronice apar din cauza unor alterări progresive ale proceselor biologice la nivel molecular și nanometric celular ca urmare a mutațiilor genice, alterări proteice, infecții cauzate de diferite virusuri sau bacterii ce conduc la anomalii, implicând organe apoi întregul organism. Utilizarea nanomaterialelor pentru administrarea de medicamente poate reduce la minimum efectele adverse prin prevenirea absorbției nespecifică a agenților terapeutici în țesuturi sănătoase (Alexis et al., 2008). Farmacocinetica medicamentului inclus în nanoparticule interacționează cu matricea polimerului prin interacțiuni hidrofob-hidrofile, interacțiuni ionice, forțe van der Waals, efect steric și altele. Substanța chimică și interacțiunile fizice joacă un rol fundamental în degradarea și difuziunea componentelor de antioxidant înglobat (Dillen et al., 2004). Eficiența medicamentelor hidrofobe este cuprinsă între 80 și 95%, iar pentru medicamente hidrofile de la 30 la 70% (Astete, 2010). **Nanoparticulele acid poli lactic-co glicolic (PLGA)** sunt polimeri artificiali biodegradabili care servesc ca sisteme avansate de livrare a medicamentului. S-a arătat că PLGA modificate activează endocitoza mediată de receptor prin adăugarea de surfactant de suprafață și/sau conjugare cu ligand, care îmbunătățește furnizarea medicamentului prin bariera hemato-encefalică și hemato-oculară la o concentrație nemaiîntâlnită

până la momentul actual de 16%(Jingyan Li and Sabliov Cristina, 2013), (Ahmed and Aljaeid, 2017).

## 2. MODIFICĂRI FIZIOPATOLOGICE ÎN OBEZITATE

**Obezitatea metabolică cu greutate normală** este considerată ca statusul în care procentul de grăsime al corpului este crescut la indivizi cu IMC normal (Lorenzo et al., 2006). La adulții de vârstă între 20 și 79.9 ani, **analiza impedanței bioelectrice** stabilește **procentul de grăsime** al organismului. Valori sub 25% la bărbați și sub 30% la femei definesc conținutul normal de grăsime la un metabolism corect (Romero-Corral et al., 2008). Iar obezii și supraponderalii cu un profil metabolic încadrat în normal au totuși valori mai ridicate a glicemiei și profilului lipidic, la limita de sus a normalului (Pataky Z et al., 2010).

Principalul **mecanism al obezității** îl reprezintă menținerea îndelungată a unui dezechilibru între aportul nutritiv excesiv și cheltuielile energetice reduse, cu menținerea unui status de activare permanentă a axului hipotalamo-hipofizar ce determină hiperfagie cu dorința de alimente hipercalorice cu index glicemic crescut cu un status proinflamator ce stimulează secreția suprarenaliană (Rossum, 2017) și dereglarea balanței adipokinelor(O'Carroll et al., 2013), (Gao et al., 2014), (Pereira and Alvarez-Leite, 2014). Complicațiile determinate de obezitate determină tulburări în întregul organism dar cu precădere cardiovascular, metabolic, renal și imun

## 3. GLUCOCORTICOIZII

Cortizolul este cheia reglării homeostaziei întregului organism pentru realizarea proceselor metabolice sau circulatorii deși nu este direct responsabil pentru inițierea acestora (Mohora, M., 2019). Cortizolul oferă capacitatea de a rezista la schimbările de mediu și la invazia substanțelor non-self. **Secreția acestuia respectă ritmul circadian** al cortisolemiei determinat de ritmul pulsatil și amplitudinea secreției de ACTH/CRH sub coordonarea sistemului nervos central, catecolaminele pot crește secreția acestuia(Zelena D. et al., 2015). **Răspunsul la stres apare în câteva minute prin intermediul SNC cu eliberarea de CRH și ACTH și creșterea cortizolului zilnic**, ce adaptează astfel organismul la stresul acut. Ca răspuns al organismului la stres mental, cortizolul se eliberează mai lent decât catecolaminele dar are implicații mai profunde în metabolism (Mohora, M., 2019). **Pe altă parte administrarea dozelor mari de GC și în sindromul Cushing anulează răspunsul cortizolic la stres** (Poiana C. et Fica S., 2015). De

altfel efectele negative ale stresului încep să-și facă apariția atunci când secreția crescută de cortizol este una constantă, transformând un sistem de apărare într-o afecțiune cronică ce se poate exprima atât fizic cât și psihic (Van der Valk et al., 2018).

Cortizolul natural are un  $T_{1/2}=1.5-2$  h. Pe când formulele galenice au timp de acțiune și de înjumătățire mult prelungit (Hidrocortizonul 8-12H, Prednisonul 12-16H Dexametazona 20-36H). Hormonii steroizi sunt hormoni liposolubili ce mediază aproape toate acțiunile la nivelul țesuturilor țintă prin modularea transcripției genice (Guyton A.C. and Hall J. E., 2006), prin intermediul celor 4 tipuri de receptori membranari, citosolici și nucleari (Buttgereit et al., 2004). Glucocorticoidul natural și sintetic reprezintă sinteza unor proteine cheie care accentuează procesele inflamatorii, ex. interleukina-1, și stimulează sinteza altor proteine care au rol antiinflamator, ex. lipocortina care inhibă generarea eicosanoizilor proinflamatori (Mohora, M., 2019).

Corticoterapia a revoluționat tratamentul bolilor alergice de imunitate, rejetul de organ transplantat, numeroase afecțiuni dermatologice, respiratorii, digestive, oculare, astăzi fiind utilizate în toate domeniile terapeutice (Chast, 2013). Peste 1-2% din populația lumii primesc tratament cronic cortizonic. Dintre aceștia peste 70% experimentează efecte secundare, care sunt multiple (Morgan et al., 2014).

Cortizol și obezitate: La obezi în plus față de producția internă de cortizol în timp apar unele modificări de clearance ce pot fi la nivelul enzimelor implicate în metabolismul hormonal steroidian (11 $\beta$ hidroxisteroid dehidrogenaze, 5 $\alpha$  și 5 $\beta$ reductazele, CYP 3A4), acizilor biliari sau steatozei hepatice însoțitoare (Rossum, 2017). Administrarea glucocorticoizilor prelungită în doze mari induce efecte secundare ca: apariția cataractei subcapsulare posterioare, uveitei, creșterea presiunii intraoculare, retinopatie centrală seroasă accelerând procesele oxidative la nivelul receptorului oftalmic (Miloslavsky et al., 2017).

#### **4. SUPLIMENTELE NUTRITIVE UTILIZATE**

**Capacitatea totală antioxidantă (CAT)** este măsura cantității de radicali liberi epuizați de o soluție de testare, fiind utilizată pentru a evalua capacitatea antioxidantă a probelor biologice.

**Vitamina E** Antioxidanții și vitaminele sunt fundamentale pentru sănătatea umană. Se cunosc: șapte tocoferoli { $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ - ( $\zeta_1$ ,  $\zeta_2$ ) și  $\eta$ - tocoferol} și patru tocotrienoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -

,  $\delta$ -, tocotrienol) (Sen et al., 2006) disponibile în alimentație. În formulele galenice se utilizează vitamina E acetat cu stabilitate mai bună. Administrarea preparatelor sub formă de nanoparticule PLGA a vitamina E a dus la eliminarea unor inconveniențelor cu eliberarea vitaminei E sub formă de „explozie”, urmată de difuzia ei omogenă în organismul gazdă (Traber et al., 2017).

Necesarul zilnic de vitamină E este diferit în funcție de cantitatea de AG nesaturați ingerați, fiind stabilit la 10-30 mg/zi pentru un adult, iar necesarul nou-născutului fiind de 4 mg/zi și 18.7 mg/zi pentru femeia care alăptează (Astete, 2010).

Rolul antioxidant al tocoferolilor este puternic, acționând atât la nivelul membranei celulare cât și la nivelul lipoproteinelor plasmatiche. Tocopherolii protejează diverși compuși biologici activi ca lipide, AG polinesaturați, hormoni hipofizari, hormoni suprarenalieni, vitamina A, carotenoizi, biotină și altele (Mitreă N, 2008). În menținerea integrității membranelor,  $\alpha$ -tocopherolul participă la formarea și stabilizarea componentei fosfolipidice a membranei (Ionica E and Costache M, 2014).

Tocopherolul împiedică oxidarea LDL colesterolului implicat în dezvoltarea de boli cardiovasculare (Trpkovic A. et al., 2015). Vitamina E scade inflamația renală, elimină stresul oxidativ, ajută la transportul de nutrienți către rinichi și scade riscul de stenoza de arteră renală. Alfa tocopherolul ca antioxidant major prezent în lipoproteinele umane joacă un rol recunoscut ca marker în boala cardiacă ischemică cu efect protector aterosclerotic pentru leziunile produse de vârstă (Catalgol and Ozer, 2012). Vitamina E, ca vitamină antioxidantă poate fi implicată în efectul benefic protector pe cataracta diabetică (Yoshida et al., 2004).

**Luteina**(L) este o substanță de origine naturală între cele 600 descoperite la momentul actual din clasa carotenoizilor, (pigmenți din plante), fiind cea mai polară din această clasă, produs al fotosintezei. Împreună cu zeaxantina(Z), mezozeaxantina astaxantina și cantaxantina (Giordano E. and Quadro L, 2018) grupul xantinelor aparținând unui grup de derivați oxigenați ai carotenoidelor (Vachali et al., 2014).

Doza zilnică nu a fost clar stabilită ingestia zilnică fiind diferită: americanii adulți consumă în medie 1-2 mg/zi, iar la africani este de 3 mg/zi (Mares-Perlman J. A. et al., 2002). Pentru uz uman peste 6 mg/zi oferă efecte de îmbunătățire a sănătății, doza zilnică terapeutică fiind până la 20-40mg/zi. Timpul de înjumătățire  $t_{1/2}$  al luteinei este de 10-14 zile.

Concentrația în diferite țesuturi este proporțională cu activitatea fiziologică specifică, astfel la nivelul retinei concentrația luteină/zexantină este de 40 de ori mai mare decât în creier(Connor et al., 2007). Ochiul uman este protejat de lumina albastru-violet de „vitamina ochiului” datorită proprietăților antioxidante puternice prin legăturile nesaturate multiple cu capacitatea de a absorbi undele de lumină cu energie înaltă în albastru-violet (Vachali et al., 2014). Cataracta subcapsulară posterioară este o afecțiune inflamatorie a segmentului anterior ocular ce constă în apariția unor opacități ce ocupă regiunea polară posterioară a cortexului cristalinian chiar în capsula posterioară (Schaal and Kaplan, 2008) Acesta poate apare în mai multe situații: tratamentul steroidian cronic, la vârsta înaintată, inflamații intraoculare, radiații ionizante, diabet, miopie forte, retinită pigmentoasă(Tuzcu M. et all, 2017). Suplimentarea luteinică a ameliorat important creșterea nivelului factorului de creștere endotelială vasculară (VEGF), oxid sintaza inductibilă (iNOS), factorul nuclear-kappa B (NF-κB) și molecula de adeziune intercelulară-1 (ICAM), a scăzut expresia factorului nuclear de transcriere 2 eritroid (Nrf2) și hem oxigenazei proteică genică 1 (HO-1) determinată de HFD din țesuturile retiniene la șoareci (Tuzcu M. et all, 2017). Luteina are un rol în protecția împotriva diabetului de tip 2 și a bolilor cardiovasculare (Scanlon, 2011). Degradarea proteinelor funcționale ca rodopsina și sinaptofizină, epuizarea factorului neurotrofic cerebral și afectarea ADN-ului sunt prevenite de luteină (Watson and Preedy, 2015).

#### Acizii Grasi Omega3

Raportul normal AG ω6/ AG ω3 ca aport alimentar ar fi 1:1, dar s-a constatat că în zilele noastre aportul este ajunge până la 20/1 în zonele super industrializate și 4:1 în zona peri-japoneză. Consumul regulat de nuci, semințe oleaginoase, pește gras și alge marine pot îmbunătăți acest raport de ingestie al PUFA. Grăsimile din nuci și semințe oleaginoase sunt reprezentate de AG nesaturați ce sunt acompaniați de antioxidanți și alte substanțe necesare metabolizării lor(Radulescu E, 2015). Arahidele sunt o sursă excelentă de compuși precum resveratrol, acizi fenolici, flavonoizi și fitosteroli care blochează absorbția colesterolului din dietă. Este, de asemenea, o sursă bună de Co-enzimă Q10 conțin toți cei 20 de aminoacizi cu cea mai mare cantitate de arginină (Arya et al., 2016). Nucile combat stresul oxidativ și inflamația prin scăderea peroxidării lipidelor in vivo și reducerea producției de radical oxid nitric liber și citokină pro-inflamatorie TNF-α in vitro (Carey et al., 2012).

In uleiul de pește tipic EPA și DHA au un procent de 30%, fiind cunoscut ca având rolul de a normaliza trigliceridele, colesterolul și HTA. Comparând administrarea de EPA cu statina scăderea trigliceridelor a fost uniformă însoțită de o creștere modestă de HDL (Giannouris TL., 2020).

## PARTEA SPECIALĂ

### 5. IPOTEZE DE LUCRU ȘI OBIECTIVE GENERALE

#### Date introductive

Medicamentele cu glucocorticoizi au puternic efect antiinflamator și sunt administrate frecvent în tratamentul afecțiunilor autoimune. Utilizarea acestora pe termen lung prezintă multiple efecte adverse: creștere în greutate, hiperinsulinemie sau/și insulinorezistență, toleranță scăzută la glucoză sau/și diabet zaharat, dislipidemie, HTA, steatoză hepatică, cataractă, infecții repetate etc. Acizii grași  $\omega$ -3, Vitamina E și Luteina, având rol antioxidant și antiinflamator ar putea încetini/preveni apariția efectelor adverse endocrine, metabolice și tisulare induse de administrarea prelungită de corticosteroizi sistemici.

Teza se bazează pe două studii experimentale pe șobolani atent aleși de aceeași vârstă (3 luni respectiv 1 an) aceeași condescendență în ambele studii.

#### Studiul pilot:

- a fost efectuat pe șobolani Wistar, masculi, tineri, ținuti fie pe dietă standard, fie pe dietă obezogenă;
- și-a propus să evidențieze efectele dismetabolice și lezante (procesele inflamatorii și de stres oxidativ) tisulare ale dietei obezogene;
- a urmărit efectul sistemic și tisular al vitaminei E, administrate prin gavaj, sub formă de nanoparticule PLGA, asociate fiecărui tip de dietă;
- a urmărit efectul sistemic și tisular al acizilor grași omega-3 (AG  $\omega$ -3) administrați prin gavaj, asociați fiecărui tip de dietă;
- și-a propus să demonstreze efectul sinergic, benefic al combinării celor două suplimente, AG omega-3 și vitamina E sub formă de nanoparticule PLGA.

**Studiul propriu-zis:**

- a fost efectuat pe șobolani Wistar, masculi, în vârstă de 1 an, care în paralel cu dieta obezogenă au primit Prednison prin gavaj;
- s-a urmărit efectul protectiv, benefic tisular al suplimentelor cu vitamină E (fie forma sintetică, sub formă de gelule, fie forma încărcată pe nanoparticule PLGA-diverse doze), de ameliorare a reacțiilor adverse metabolice ale glucocorticoizilor;
- a urmărit efectul protectiv, benefic atât ocular cât și sistemic al luteinei încărcată pe nanoparticule PLGA, de contracarare a reacțiilor adverse ale glucocorticoizilor;
- a urmărit efectul protectiv, benefic metabolic al nucilor, ca sursă naturală de acizi grași polinesaturați, combinați cu vitamina E la animalele aflate pe dietă obezogenă

Fiecare studiu a cuprins:

- determinări biologice sangvine, vizând diverși parametrii metabolici;
- determinări histopatologice, colorație hematoxilină-eozină, pe diverse țesuturi
- determinări de imunohistochimie, care evidențiază procesul inflamator sau lipidoză tisulară
- determinări de stres oxidativ, fie sistemic, fie tisular

La final, coroborarea rezultatelor obținute au ajutat la validarea concluziilor.

Suplimentele testate în această teză au fost diverse:

1. vitamina E sub diverse forme (sintetică/gelule sau sub formă de nanoparticule PLGA, diverse doze)
2. acizii grași omega-3 (AG  $\omega$ -3)
3. luteina sub formă de nanoparticule PLGA
4. nucile, ca sursă naturală de acizi grași

Țesuturile analizate histopatologic și imunohistochimic au fost numeroase: cord, rinichi, splină, pancreas, ficat, mușchi scheletic ochi

## **6.MATERIALE ȘI METODE**

## 6.1. Preambul

Studiul experimental de cercetare teoretico-fundamental a fost efectuat în cadrul Biobazei Facultății de Medicina din cadrul Universității de Medicina și Farmacie „Carol Davila” din București cu avizul comisiei de etică. (Aviz nr. 134/ 08.08.2017, Anexa 2).

## 6.2. Organizarea studiului pilot

**Studiul pilot** a avut ca scop evaluarea potențialului eficacității acizilor grași nesaturați omega 3 sub forma de ulei Lysi, a vitaminei E sub formă de nanoparticule și asocierea lor în prevenția efectelor metabolice și tisulare la șobolani Wistar tineri, hrăniți cu o dietă hiperlipidică hipercalorică comparativ cu o dietă standard.

Studiul a fost desfășurat pe 40 de șobolani Wistar masculi tineri, cu vârsta de 3 luni, la Biobaza Facultății de Medicina din cadrul Universității de Medicina și Farmacie "Carol Davila" din București. Au fost respectate condițiile de habitat standard.

Animalele au fost distribuite în 2 grupuri a câte 20 de șobolani fiecare: un grup standard, care a primit dietă standard (3.5 kcal/g/zi) și un grup cu dietă obezogenă hipercalorică/hiperlipidică (5.15 kcal/g/zi).

Timp de 4 săptămâni șobolanii au primit dietă diferită, apoi timp de 3 săptămâni li s-au administrat diferite suplimente nutritive prin gavaj.

- 10 șobolani Wistar: cu vitamina E sub formă de nanoparticule(1 mg/kgc) ( 5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică)
- 10 șobolani Wistar- ulei de pește Lysi (1 ml/kgc) (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică)
- 10 șobolani Wistar –vitamina E sub formă de nanoparticule (1 mg/kgc) + ulei Lysi (1 ml/kgc) (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică, hipercalorică)
- 10 șobolani Wistar – fără supliment nutritiv (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică).

Sacrificarea s-a realizat prin decapitare (dislocare cervicală) sub anestezie cu ketalar 50 mg/kg corp intramuscular, apoi s-au prelevat probe sangvine(pentru hemogramă, teste biochimice: glicemie, colesterol, proteine totale, trigliceride, transaminaze, creatinină, uree și fosfatază alcalină, vitamina E plasmatică).

Organele interne au fost recoltate, s-au determinat markeri de stres oxidativ tisular pe homogenate, restul au fost depozitate în soluție de formol 10%, în vederea examinării histopatologice și/sau imunohistochimice.

### **6.3. Organizarea studiului propriu-zis**

Etapa a doua a, de studiu propriu-zis a avut ca scop evaluarea eficienței unor suplimente nutritive în prevenirea efectelor secundare determinate de administrarea de glucocorticoid sistemic (prednison), la șobolani Wistar masculi hrăniți cu o dietă standard versus o dietă hiperlipidică hipercalorică.

S-au comparat efectele protective ale vitaminei E sub formă de nanoparticule cu cele obținute în urma administrării de vitamina E din gelule gelatinoase sau nuci pentru apariția efectelor adverse determinate de dieta hipercalorică asociată cu prednison. De asemenea, administrarea luteinei (cu rol cunoscut protector asupra modificărilor oculare determinată de vârstă) a fost administrată sub formă de nanoparticule pentru evaluarea răspunsului terapeutic protector în special pe ochi și eventual pe alte efecte adverse induse de glucocorticosteroizi sistemici în tratament cronic asociat dietei obezogene.

Studiul a fost desfășurat pe 70 șobolani Wistar masculi, cu vârsta de 10-12 luni, la Biobaza menționată anterior.

S-au respectat condițiile de habitat standard, menționate la studiul pilot.

Șobolanii au fost randomizați în 2 grupuri de șobolani fiecare: un grup de 30 de exemplare, care au primit dietă standard (30 g/zi cu 3.5 kcal/g, 105 kcal/animal) și un grup de 40 de șobolani la care pe lângă dieta standard, s-a adăugat o dietă hiperlipidică/ hipercalorică/ hiperglucidică (5.15 kcal/g prin adăugarea a 4 g ciocolată albă, 8 g unt 80% grăsime, 170 kcal/).

În același timp cu dieta, s-au administrat prin gavaj: prednison (0.8 ml/zi, adică 0.4 mg/zi, echivalentul a 1 mg/kgc la un șobolan de aproximativ 400 g) și diferite suplimente nutritive timp de 6 săptămâni, după cum urmează:

- 10 șobolani: grupul martor = nicio intervenție (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică)
- 10 șobolani: prednison 1 mg/kgc/zi (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică)

- 10 șobolani: prednison 1 mg/kgc/zi + nanoparticule încărcate cu vitamina E (1 mg/kgc/zi) (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică)
- 10 șobolani: prednison 1 mg/kgc/zi + vitamina E 1 mg/kgc (din gelule) (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică)
- 5 șobolani: prednison 1 mg/kgc/zi + nanoparticule încărcate cu vitamina E doză dublă (2 ml/zi) (cu dietă hiperlipidică/hipercalorică/hiperglucidică)
- 10 șobolani: prednison 1 mg/kgc/zi + alune/nuci (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică)
- 10 șobolani: doar alune/nuci (5 cu dietă standard, 5 cu dietă hiperlipidică hipercalorică)
- 5 șobolani: prednison 1 mg/kgc/zi + luteina (1mg/kgc) (cu dietă hiperlipidică hipercalorică).

Cele două grupuri care au primit arahide(nuci) 15 g/subiect, în plus 85 kcal/zi în total 360 kcal/exemplar.

S-a măsurat greutatea animalelor la începutul și la sfârșitul intervenției. Înainte de sacrificare, șobolanii au fost de asemeni analgosedăți cu ketamină (50 mg/kgc) și au fost examinați clinic și oftalmologic. Analgosedarea a avut rolul de a proteja animalele de stres și a oferit confort examinatorului.

Sacrificarea s-a realizat ca și în studiul pilot, s-au prelevat probe sangvine (pentru hemogramă, teste biochimice: glicemie, colesterol, proteine totale, trigliceride, transaminaze, uree, cystatin C și fosfatază alcalină, capacitatea antioxidantă totală, vitamina E plasmatică, cortizol plasmatic, markeri de stres oxidativ plasmatic) plus organele interne (cordul, aorta, mușchi scheletic și rinichiul) au fost recoltate pentru a fi examinate histopatologic și imunohistochimic. La fiecare exemplar s-a urmărit identificarea leziunilor prezente la nivelul cordului, mușchiului scheletic și rinichilor.

## **6.4. Metodele de lucru**

### ***6.4.1. Metode pentru determinarea valorilor biologice sangvine***

Pentru determinările biochimice din sângele prelevat și homogenatele preparate din organe s-au folosit metode standardizate spectrofotometrice pentru evaluare. Probele de sânge au fost centrifugate la 3 000 de rpm timp de 5 min. Serul astfel obținut a fost utilizat pentru evaluarea

parametrilor metabolici. Au fost determinați următorii parametri serici: cortizolul, vitamina E, glicemia, hemoleucograma, hemoglobina glicozilată, aspartat-aminotransferaza, alaninaminotransferaza, fosfataza alcalină, trigliceride serice, colesterol total, HDL- colesterol, albumină, proteine totale, acid uric, uree, sodiu, capacitate antioxidantă totală. Determinarea cortizolului, a vitaminei E și a capacității antioxidante totale s-a realizat prin metodă ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, test imunisorbent legat de enzimă).

Examinarea histologică și imunohistochimică a țesuturilor

Principiul tehnicii histopatologice presupune transformarea unui prelevat dintr-un organ sau țesut dintr-o masă tisulară opacă, într-un preparat fin, translucid, ce permite vizualizarea microscopică a detaliilor structurale tisulare și celulare.

**Anticorpul, CD8a** s-a utilizat pentru a studia prezența elementelor de infiltrat inflamator tisular iar **anticorpul TYP 47** a fost utilizat pentru a studia sinteza picăturilor neutre de grăsime.

## 7. STUDIUL PILOT

### 7.1. Introducere la studiul pilot

Stilul de viață modern se caracterizează prin sedentarism și exces caloric. Schimbarea stilului de viață, prin practicarea sportului și adoptarea dietei mediteraniene reprezintă principalele metode de prevenire ale complicațiilor din obezitate. Se pune întrebarea dacă pe lângă această abordare, administrarea unor suplimente poate aduce beneficii?

La ora actuală există dovezi științifice atât pentru acizii grași omega-3, cât și pentru vitamina E, care administrate sub formă de suplimente, la subiecții obezi, aduc beneficii pentru sănătate.

Astfel, vitamina E:

- are efect dovedit antioxidant, antidislipidemic, antiinflamator;
- are forme diferite de administrare orală, fie sub formă de gelule, fie sub formă de nanoparticule PLGA; administrarea sub formă de nanoparticule necesită doze mai mici pentru același efect ca cea din gelule, are efect restant, are tropism tisular hepatic și splenic;
- nu are efecte toxice.

De asemenea, acizii grași omega-3 (AG  $\omega$ -3):

- au efecte antidislipidemice, antiinflamatorii și antioxidante;

### **Ipoteza de lucru a studiului pilot**

În acest studiu pilot se pune întrebarea dacă prin combinarea celor două suplimente descrise, Vitamina E sub formă de nanoparticule PLGA, AG- $\omega$ 3 și asocierea lor unei diete obezogene, se pot obține efecte sinergice, de prevenire a efectelor dismetabolice.

### **Obiective specifice ale studiului pilot:**

1. Compararea efectelor metabolice și tisulare determinate de dieta obezogenă versus dieta standard
2. Evaluarea potențialului efect benefic al AG  $\omega$ -3, administrați oral, sub formă de ulei de pește, Lysi, asociat dietei obezogene
3. Evaluarea potențialului efect benefic al vitaminei E sub formă de nanoparticule PLGA asociată alimentației obezogene
4. Evaluarea unui posibil efect sinergic benefic, al combinației celor două suplimente nutritive asociate dietei obezogene

### **7.2. Materiale și metodă studiul pilot**



Pentru studiu pilot au fost utilizați cei 40 de șobolani Wistar masculini tineri, cu vârstă de 3 luni, crescuți în condiții de habitat/dietă standard.

Acești șobolani au fost randomizați în 2 grupuri egale și timp de 7 săptămâni au primit, fie dietă standard (3.5 kcal/g), constituind grupul standard, fie dietă hipercalorică/hiperlipidică (5.15 kcal/g, prin adăugarea a 4 g ciocolată albă, 8 g unt 80% grăsime, zilnic, excesul caloric fiind de 170kcal/animal/zi), constituind grupul pe dietă obezogenă. Cu 3 săptămâni înainte de sacrificare,

în fiecare grup, la dietă s-au asociat diverse suplimente nutritive prin gavaj. Astfel grupurile au fost subîmpărțite în grupuri, fiecare a 5 șobolani:

#### **Grupul standard**

- grupul S nu a primit nici un supliment asociat dietei
- grupul SN a primit vitamina E sub formă nanoparticule PLGA (1 mg/kgc)
- grupul U a primit AG-3 sub formă de ulei de pește, Lysi (1 ml/kgc)
- grupul T a primit atât AG-3 sub formă de ulei de pește Lysi (1 ml/kgc) cât și vitamina E sub formă nanoparticule PLGA (1 mg/kgc)

#### **Grupul pe dietă obezogenă**

- grupul O nu a primit nici un supliment asociat dietei
- grupul ON a primit vitamina E sub formă nanoparticule PLGA (1 mg/kgc)
- grupul L a primit AG-3 sub formă de ulei de pește, Lysi (1 ml/kgc)
- grupul M a primit atât AG-3 sub formă de ulei de pește Lysi (1 ml/kgc) cât și vitamina E sub formă nanoparticule PLGA (1 mg/kgc)

Șobolani Wistar au fost analgosedati cu ketamină, intramuscular(50 mg/kgc) și apoi au fost cântăriți.

Sacrificarea s-a realizat prin decapitare (dislocare cervicală) cu prelevare de sânge carotidian pentru teste biochimice. Parametrii biochimici determinați au fost: glicemia, colesterolemia, trigliceridemia, proteinemia totală, activitatea transaminazelor, activitatea GGT, creatininemia, ureea serică și cystatina C serică.

Organele interne au fost recoltate și au avut dublă destinație. O parte a fost depozitată în soluție de formol 10%, în vederea examinării histopatologice și imunohistologice și o parte a fost utilizată pentru determinarea valorilor de stres oxidativ intratisular(homogenate), adică valoarea tiolilor totali tisulari (marker antioxidant) versus valoarea malondialdehidei tisulare (marker de stres oxidativ).

#### **7.4. Concluziile studiului pilot**

Șobolani Wistar, masculi, tineri, în vârstă de 3 luni, hrăniți cu dietă obezogenă, timp de 7 săptămâni versus cei cu dietă standard: au luat mai mult în greutate, au devenit dislipidemici, au dezvoltat leziuni tisulare hepatice, splenice, renale și pancreatice, au exprimat mai mult marker

CD 8a, un marker limfocitar, de inflamație și mai multă perilipină 3, marker de încărcare grasă celulară, au avut stres oxidativ tisular crescut.

La șobolanii la care s-a menținut dieta obezogenă, asocierea unor suplimente, timp de trei săptămâni, fie sub formă de AG  $\omega$ -3, fie sub formă de vitamină E încorporată în nanoparticule PLGA, sau ambele, a relevat că:

- AG  $\omega$ -3 administrați ca supliment unic sau asociați nanoparticulelor PLGA încărcate cu vitamina E **au prevenit creșterea greutateii corporale**
- Vitamina E administrată sub formă de nanoparticule PLGA și/ sau AG  $\omega$ -3 nu au avut influență asupra glicemiei a jeun și nici asupra activității transaminazelor
- Fiecare dintre suplimente, fie vitamina E administrată sub formă de nanoparticule PLGA, fie AG  $\omega$ -3 sau asocierea lor **au prevenit apariția profilului dislipidemic**
- Atât vitamina E administrată sub formă de nanoparticule PLGA cât și AG  $\omega$ -3, sau ambele au protejat ficatul, splina, rinichiul și pancreasul exocrin de efectele lezante celulare ale dietei obezogene pe acestea.
- Vitamina E administrată sub formă de nanoparticule PLGA a prevenit creșterea stresului oxidativ tisular determinat de dieta obezogenă, contracarând peroxidarea lipidică renală și cardiacă și crescând apărarea antioxidantă tisulară
- Vitamina E administrată sub formă de nanoparticule PLGA a fost eficientă, pe celula cardiacă și renală, reducând inflamația și încărcarea grasă celulară

Asocierea celor 2 suplimente, vitamina E administrată sub formă de nanoparticule PLGA și AG  $\omega$ -3, a demonstrat efectele benefice, sinergice ale acestora. Pe de o parte, vitamina E administrată sub formă de nanoparticule PLGA a protejat cu predilecție țesuturile de efectele lezante tisulare ale dietei obezogene, iar pe de altă parte, AG  $\omega$ -3 au prevenit creșterea în greutate și dezvoltarea dislipidemieii.

Rezultatele imunohistochimice au fost în concordanță cu rezultatele histologice și biochimice.

## 8. STUDIUL PROPRIU-ZIS

### **8.1. Introducere în studiul propriu-zis**

Cu toate că, datele privind creșterea numărului de subiecți obezi sunt alarmante, soluțiile oferite pentru stoparea cercului vicios dintre sedentarism/dietă hipercalorică și obezitate sunt mediocre. Se știe că, obezitatea determină dezechilibre metabolice, endocrine, cardiovasculare, autoimune etc. Cortizolul endogen crescut, aspectul Cushingoid al obezității tip „măr”, pilozitate scăzută, sunt doar câteva exemple de modificări endocrine la un subiect obez (Mohora, M., 2019).

Utilizarea glucocorticoizilor ca medicament cu efect important antiinflamator, antiproliferativ, antiangiogenic, imunomodulator se derulează de 80 de ani cu succes, dar cu multiple efecte adverse cunoscute drept sindrom metabolic cortisonic indus, miopatie cortisonică, cataractă și glaucom.

Cert este că, medicina nu se poate dispensa de tratamentul cu Cortizol. Curios este faptul că, până acum, nu au fost propuse modalități eficiente de reducere ale reacțiilor adverse ale glucocorticoizilor sau soluții de combinare ale cortizolului cu „altceva”, astfel încât să putem reduce doza de antiinflamator pentru același efect terapeutic. Reducând doza de cortizol, scad și reacțiile adverse.

În această teză, s-a propus combinarea administrării cortizolului cu vitamina E, diverse forme (sintetică/gelule sau sub formă de nanoparticule PLGA), la șobolanii Wistar în vârstă de un an, hrăniți hipercaloric. De asemenea, s-au mai testat și efectul altor suplimente, înlocuind vitamina E cu luteina sau cu nucile.

Odată cu descoperirea Vitaminei E a fost subliniată calitatea ei de vitamină a fertilității. Dar, relativ recent au apărut publicații despre noi „virtuți” ale acestei vitamine liposolubile, antioxidante. Prima observație despre rolul său în semnalizarea celulară, cu efecte antiinflamatorii, a fost publicată de grupul Angelo Azzi. Astfel, cercetătorii au subliniat că vitamina E, independent de rolul ei antioxidant, poate inhiba proliferarea celulelor musculare netede prin stoparea cascadei de reacții via PKC (protein kinaza C). PKC este inhibată în monocite, neutrofile, fibroblaste și celulele mezangiale pe model animal, la concentrații plasmatice ale vitaminei E, comparabile celor existente la om (Azzi et al., 2001). De asemenea, Vitamina E a fost propusă ca adjuvant pentru prevenirea efectelor secundare induse de antiinflamatoarele nonsteroidiene (Jiang et al., 2009). Prin combinarea celor două, se poate obține același efect antiinflamator, la doze mai mici de

medicament antiinflamator nonsteroidian, reacțiile adverse ale acestuia din urmă, fiind mult reduse. Apare totuși, un inconvenient, deoarece mai puțin de jumătate din vitamina E sintetică, administrată oral, se absoarbe sistemic, din tubul digestiv (Herrera and Barbas, 2001). Soluția pentru această problemă a fost oferită de nanomedicină. Vitamina E, încărcată în nanoparticule PLGA, administrată oral, este mult mai bine absorbită, ajunge și în medii hidrofile, are tropism hepatic și splenic și are efect restant (Jingyan Li and Sabliov Cristina, 2013).

Se știe că, luteina, fie din aportul alimentar ridicat, fie din extractul clasic are efect antioxidant, protectiv față de radicalii oxigenului, mai ales pentru cristalini și tunicile ochiului (Manayi et al., 2016).

### **Ipotezele de lucru ale studiului propriu-zis**

Sumând datele de mai sus, ipotezele studiului propriu-zis se conturează astfel:

- a. administrarea vitaminei E sub formă de nanoparticule PLGA poate îmbunătăți biodisponibilitatea și eficiența acesteia.
- b. administrarea orală a vitaminei E, sub diferite forme (sintetică/gelule sau încărcată în nanoparticule PLGA), în paralel cu tratamentul glucocorticoid cronic, suprapus dietei obezogene, ar putea preveni unele dintre efectele secundare metabolice ale cortizolului;
- c. asocierea vitaminei E la tratamentul cronic cu prednison ar putea potența efectul antiinflamator al glucocorticoizilor, pe model animal, permițând reducerea dozelor de antiinflamator steroidian pentru același efect terapeutic;
- d. administrarea orală a luteinei sub formă de nanoparticule PLGA ar putea avea un rol protectiv ocular față de efectul cataractogen al cortizolului și de asemenea, ar putea avea și efecte sistemice benefice;
- e. administrarea nucilor bogate în PUFA și în vitamină E, naturală, prin efectul lor antiinflamator și antioxidant ar putea preveni unele dintre reacțiile adverse determinate de administrarea cronică a predisonului, asociat dietei obezogene.

### **Obiectivele specifice ale studiului propriu-zis**

1. compararea efectelor metabolice și tisulare determinate de dieta obezogenă, la care s-a asociat sau nu, prednison, versus dietă standard, la șobolani adulți, Wistar;

2. evaluarea potențialului benefic al vitaminei E, administrată oral, sub mai multe forme, asociată prednisonului, la animale Wistar, ținute sub dietă obezogenă;
3. evaluarea potențialului protectiv ocular al luteinei, sub formă de nanoparticule PLGA, administrată concomitent cu prednison, la animale Wistar, ținute sub dietă obezogenă;
4. evaluarea potențialului benefic, tisular și sistemic, al nucilor, bogate în acizi grași  $\omega$ -3 și vitamina E, asociate tratamentului cortizolic, la animale Wistar, ținute sub dietă obezogenă

## 8.2 Material și metodă pentru studiul propriu-zis



Studiul a fost efectuat pe 70 șobolani Wistar masculi, cu vârsta de 10-12 luni având greutatea între 380 - 410 g la Biobaza și în condițiile menționate la materialele și metodele generale. Șobolani au fost randomizați în 2 grupuri a câte 30 respectiv 40 de șobolani fiecare: un grup standard, care a primit dietă standard și un grup la care, pe lângă dieta standard, s-a adăugat o dietă hiperlipidică, hipercalorică metodologie anterior descrisă. Concomitent cu dieta, animalele au primit prin gavaj: prednison (0.8 ml/zi, adică 0.4 mg/zi, echivalentul a 1 mg/kgc la un șobolan de aproximativ 400 g) și diferite suplimente nutritive timp de 6 săptămâni, după cum urmează:

**GRUPUL STANDARD** a fost alcătuit din 30 șobolani Wistar, au primit dietă standard (3.5 kcal/zi) și au fost împărțiți în grupuri a câte 5 șobolani:

-grupul M: niciun supliment, martor

-grupul SP: prednison 1 mg/kgc (0.4 mg/zi)

-grupul SN: prednison 1 mg/kgc (0.4 mg/zi) + vitamina E sub formă de nanoparticule PLGA(1 ml/zi)

-grupul SE: prednison 1 mg/kgc/zi (0.4 mg/zi) + vitamina E (din capsule)

-grupul SS: prednison 0.8 ml/zi (0.4 mg/zi) + arahide/nuci (15 g/zi= 85 kcal)

-grupul SA: doar arahide/nuci (15 g/zi= 85 kcal)

**GRUPUL DE OBEZI** a fost alcătuit din 40 șobolani Wistar, care au primit dietă hiperlipidică, hipercalorică (5.15 kcal/zi) ce au fost împărțiți în subgrupuri a câte 5 șobolani:

- grupul OM: niciun remediu
- grupul OP: prednison 0.8 ml/zi (0.4 mg/zi)
- grupul ON: prednison 0.8 ml/zi (0.4 mg/zi)+ vitamina E sub formă de nanoparticule PLGA (1 ml/zi)
- grupul OE: prednison 0.8 ml/zi (0.4 mg/zi) + vitamina E (din capsule)
- grupul OD: prednison 0.8 ml/zi (0.4 mg/zi) + doză dublă de vitamina E nanoparticule PLGA (2 ml/zi)
- grupul OA: prednison 0.8 ml/zi (0.4 mg/zi)+ arahide/nuci (15 g/zi= 85 kcal)
- grupul OS: doar arahide/nuci (15 g/zi= 85 kcal)
- grupul OL: prednison 0.8 ml/zi (0.4 mg/zi) + luteină (1 mg/kgc)

Tehnica de recoltare a probelor biochimice și organelor pentru examinare a fost descrisă în metodologia generală a cercetării. Examinarea oftalmologică a fost efectuată de către doi specialiști oftalmologi.

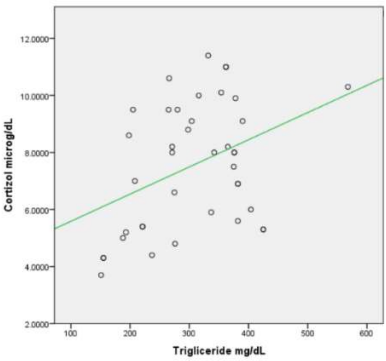
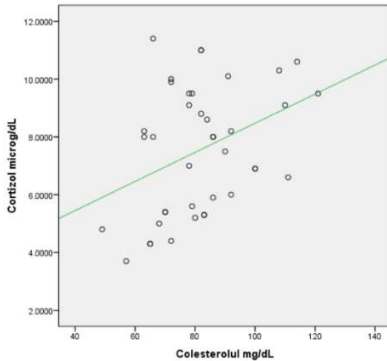
Studiul propriu-zis este unul experimental, pe șobolani supraponderali, pe dietă obezogenă și prednison încearcă să simuleze echivalentul uman de subiect cu sindrom metabolic, sub tratament cu cortizol.

Astfel, animalele Wistar, aflate sub dietă obezogenă, au fost tratate cu prednison, cu excepția grupului martor (OM, care este numai sub dietă obezogenă). Având în vedere că, în acest studiu, suplimentele asociate tratamentului cu cortizol au fost multiple: vitamina E, sub forme și doze diferite, luteina și nucile, grupurile aferente sunt numeroase. Pentru a facilita înțelegerea efectelor acestor suplimente, rezultatele sunt prezentate în tabele și figuri care grupează un număr mic de grupuri, din care, nu lipsesc grupuri OM (animale sub dietă obezogenă) și OP(animale sub dietă obezogenă și prednison), față de care se face raportarea. Astfel, pentru fiecare valoare biologică

analizată (de exemplu, trigliceridemie, glicemie, cortisolemie etc), apare grupajul de 4 grafice și tabele, care subliniază:

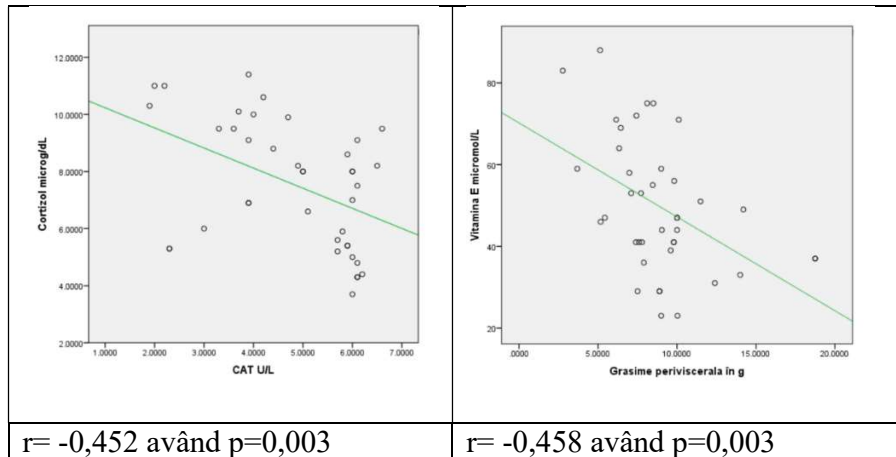
- efectul asocierii **vitaminei E, sub două forme**, fie sub formă sintetică/gelule (lot OE), fie sub formă de nanoparticule PLGA (lot ON);
- efectul asocierii **vitaminei E** strict sub formă de **nanoparticule PLGA (PLGA-NPs)**, dar, fie în **doză simplă**, 1mg/kg corp (lot ON), fie în **doză dublă** (lot OD);
- efectul asocierii **luteinei** sub formă de **nanoparticule PLGA (PLGA-NPs)**;
- efectul asocierii **nucilor**; în loturile grupate există lotul OS, care cuprinde animale pe dietă obezogenă, cu supliment alune, dar fără cortizol asociat; reamintim că lotul OA, spre deosebire de OS, primește prednison.

**Tabel 1. Corelația cortizolemiei cu trigliceridemia și cu colesterolemia, în grupurile „obezogene”, corelație pozitivă**

Corelația Pearson pozitivă între valorile nivelului seric de cortizol și cel al trigliceridelor	Corelația Pearson obținută între valorile nivelului seric de cortizol și cel al colesterolului
	
r=0,392, având semnificație statistică p=0,012	r=0,37 având semnificație statistică p=0,019

**Tabel 2. Corelația dintre cortizolul seric și capacitatea totală antioxidantă serică stanga, iar dreapta vitaminei E serice cu grăsimea periviscerală în grupurile „obezogene”, este negativă**

Corelația Pearson obținută între valorile nivelului seric de cortizol și cel al CAT	Corelația Pearson obținută între valorile nivelului vitaminei E seric și cel al grăsimii periviscerale



### Corelația glucozei a jeun cu hemoglobina glicată în grupurile „obezogene”

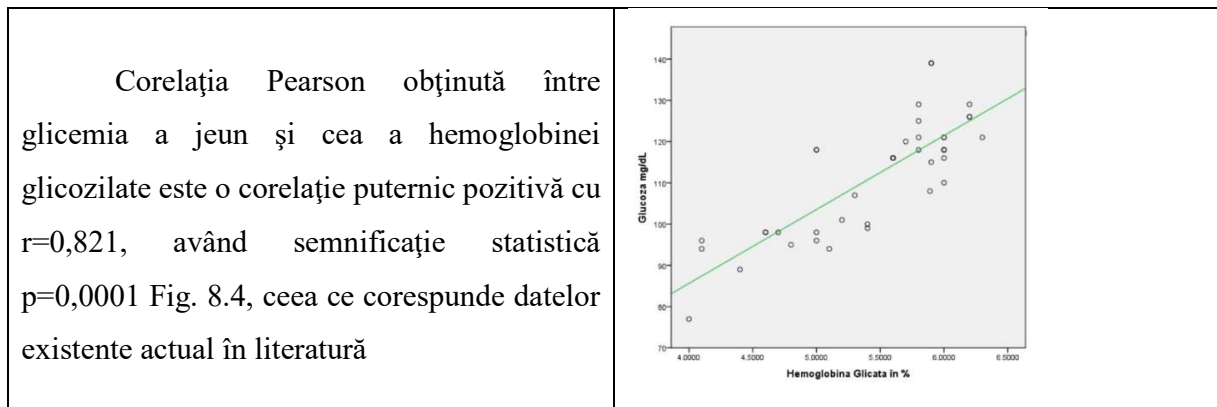


Fig 8.4 Scutter plot ce arată corelația dintre glicemia a jeun și hemoglobina glicată

**Tabel.VIII.47 Aspectul clinic al ochiului în grupurile studiate**

Examinare	M standard martor	SP standard Prednison	OM obez martor	OP obez Prednison	OL obez Luteină
1.					
2.					
Diagnostic	Lentilă transparentă	Cataractă uveită și rubeoză iriană	Cataractă și uveită anterioară	Glaucom, cataractă și rubeoză iriană	Aspect aproape normal

### **Efecte paradoxale înregistrate:**

- Doza dublă de vitamina E sub formă de nanoparticule PLGA a crescut nivelul plasmatic de colesterol total, dar și pe cel al HDL colesterolului în grupurile cu dietă obezogenă + prednison
- Doza dublă de vitamina E sub formă de PLGA NPs a înregistrat cea mai scăzută valoare medie capacității totale antioxidante plasmatice.
- Doza dublă de vitamină E sub formă de nanoparticule PLGA a determinat cel mai mic nivel seric al vitaminei E
- Prednisonul asociat dietei hipercalorice a produs paradoxal scăderea mediei greutatei corporale în comparație cu grupurile martor obez sau standard, iar administrarea de suplimente a prevenit pierderea în greutate
- Nuciele în ciuda dietei puternic hipercalorice (de trei ori+ kcal) au menținut nivelul plasmatic de HDL colesterol.

### **Concluzii**

Studiul privind implicațiile biochimice și efectele metabolice, ale unor suplimente nutritive, asociate **dietei obezogene, în terapia cu glucocorticoizi**, timp de șase săptămâni, la șobolani Wistar masculi, în vârstă de 10-12 luni, relevă particularități ale răspunsurilor tisulare și sistemice.

Astfel, **vitamina E sub formă de nanoparticule PLGA, în doză de 1mg/kg:**

1. a prevenit creșterea trigliceridelor plasmatice, a menținut nivelul plasmatic pentru capacitatea antioxidantă totală (CAT), albumină și acid uric;
2. a menținut un nivel scăzut al numărului de leucocite sangvine;
3. a prevenit modificările inflamatorii/structurale la nivelul rinichiului, cordului, mușchiului scheletic;
4. a prevenit lipidoza tisulară;
5. în doză dublă, a crescut paradoxal colesterolul, dar și HDL-colesterolul, a menținut nivelul antioxidant seric prin uricemii mai mari;

6. a protejat structura mușchiului scheletic;
7. a prevenit, parțial, creșterea masei corporale generale și a grăsimii viscerale.

**Vitamina E sub formă de gelule, în doză de 1mg/kg:**

1. a crescut nivelul plasmatic de vitamină E, a menținut nivelul plasmatic al HDL-colesterolului, a menținut capacitatea totală antioxidantă (CAT) și uricemia;
2. a prevenit parțial apariția modificărilor structurale la nivel cardiac, renal, muscular scheletic;
3. a prevenit inflamația în țesutul cardiac;
4. a prevenit creșterea grăsimii viscerale.

**Luteina sub formă de nanoparticule PLGA, în doză de 1mg/kg:**

1. a prevenit creșterea numărului de leucocite;
2. a menținut nivelul plasmatic pentru albumină și acid uric, principalii antioxidanți tisulari;
3. a protejat puternic țesutul cardiac și ochiul;
4. a prevenit, parțial, inflamația în miocard;
5. a prevenit depunerile de țesut adipos visceral.

**Nucile/arahide, bogate în AG omega 3, vitamina E și alți antioxidanți, aport de 85 kcal peste 275 kcal dietei „obezogene”**

1. au prevenit scăderea hemoglobinei;
2. au prevenit creșterea numărului de leucocite;
3. au prevenit scăderea HDL-colesterolului, a statusului antioxidant prin acid uric;
4. au prevenit apariția modificărilor tisulare la nivel miocardic, muscular scheletic;
5. au redus procesul inflamator intracardiac și intrarenal;
6. au prevenit dezvoltarea adipozității viscerale.

Observând corelațiile Pearson pozitive, înregistrate în acest studiu, menționăm relația:

- dintre glicemie a jeun și hemoglobină glicozilată
- dintre cortisolemie și colesterolemie
- dintre cortisolemie și trigliceridemie.

Observând corelațiile Pearson negative, înregistrate în acest studiu, menționăm relația:

- dintre colesterolemie și capacitatea antioxidantă totală plasmatică

-dintre nivelul plasmatic de vitamină E și cantitatea de grăsime viscerală dezvoltată

De remarcat că, rezultatele studiului sunt validate prin faptul că, rezultatele imunohistochimice sunt la unison cu cele histologice și concordă cu cele biochimice.

### **Elemente de originalitate**

Cu toate că se publică tot mai multe ghiduri despre un stil de viață sănătos, sedentarismul și excesul caloric rămân tare ale societății moderne. Varianta mai comodă, agreată de multe persoane este de a găsi niște suplimente „miraculoase”, în dauna schimbării stilului de viață (sport, dieta adecvată etc).

Mecanismele patogenice din obezitate sunt inflamația, stresul oxidativ și rezistența la insulină. De menționat că, obezitatea se asociază și cu valori mai mari ale cortizolului seric. Dar, acest hormon favorizează dezvoltarea comorbidităților din obezitate, deci, între obezitate și cortizol există o relație bidirecțională.

De asemenea, glucocorticoizii sunt frecvent utilizați în diverse afecțiuni, cu toate că au multiple reacții adverse. Ideea studiului a pornit de la necesitatea realizării unui echilibru. Pe de o parte, cortizolul și excesul caloric care întrețin mecanismele patogenice din obezitate și, de cealaltă parte, antioxidanții, acizii grași nesaturați care încearcă să mențină starea de sănătate. La ora actuală, ținând cont că nanomedicina, ca ramură a nanotehnologiei, se extinde în tot mai multe specialități medicale, devine accesibilă din punct de vedere financiar, costurile unui tratament cu nanoparticule nefiind atât de mare, am inclus în teză antioxidanți și vitamine încapsulate PLGA. Încapsularea asigură o biodisponibilitate crescută a acestor componente.

Studiul de față este original, cuprinde multe suplimente cu proprietăți antioxidante și antiinflamatorii, administrate în paralel cu dieta obezogenă, la care s-a asociat sau nu, Prednisonul. Suplimentele utilizate au fost fie sub formă naturală (nucile), fie sub formă de gelule (vitamina E sintetică), fie încapsulate în nanoparticule PLGA (luteina, vitamina E) sau sub formă concentrată, lichidă (acizii grași omega-3). Parametrii biologici testați au fost numeroși (profil glicemic, profil lipidic, capacitatea totală antioxidantă serică, etc). Efectele benefice tisulare ale administrării suplimentelor au fost demonstrate histopatologic (colorație hematoxilină-eozină), validate imunohistochimic, cu folosirea markerilor de inflamație și lipidoză, argumentate prin scăderea peroxidării lipidice tisulare.

Tastând cuvintele cheie “ obesity, cortisol, nanomedicine, supplements” în bazele de date medicale indexate nu s-au găsit cercetări publicate cu tema studiului nostru. S-au găsit numai 3 studii internaționale și 2 naționale legate de utilizarea vitaminei E, gelule, sintetice, asociate administrării de glucocorticoizi la șobolani Wistar obezi.

**Elementele de originalitate** pot fi enumerate astfel:

1.complexitatea tezei:

-există un studiu pilot (șobolani tineri, pe dietă obezogenă sau standard) și un studiu propriu-zis (șobolani maturi, pe dietă obezogenă, cu sau fără Prednison)

-suplimente numeroase, în forme și doze diferite

-evaluări biochimice, histopatologice, imunohistochimice

-organe diferite studiate: cord, rinichi, mușchi, ochi, ficat, pancreas și splină

2. este studiu unic, comparativ, al efectelor protectoare, cardiace și renale, ale vitaminei E, administrate fie sub formă de gelule, fie sub formă de nanoparticule PLGA, pe model animal, aflat pe dietă obezogenă și terapie cu prednison;

3. în premieră, luteina sub formă de nanoparticule PLGA, a fost administrată sistemic la șobolanii la care s-au indus leziuni oculare;

4. pentru prima dată, efectele benefice cardiace ale curei zilnice de nuci, în condițiile unui tratament prednisonic, asociat dietei hipercalorice au fost studiate prin metode histopatologice și imunohistochimice;

5. particularizarea și ierarhizarea recomandărilor unor suplimente antioxidante în funcție de organele sensibile la dieta obezogenă și tratamentul îndelungat cu cortizol.

### **Concluzii finale-**

În condițiile unei diete obezogene la care s-a adăugat sau nu Prednison, s-au înregistrat leziuni tisulare și modificări biologice de dismetabolism.

Asocierea unor suplimente la dieta obezogenă a avut ca efecte:

1. menținerea profilului lipidic în limite normale;

-efect dovedit pentru nuci, AG omega-3 și vitamina E, ambele forme

2.- menținerea statusului antioxidant în limite normale

-efect dovedit pentru nuci, AG omega-3 și vitamina E, ambele forme, și luteină

### 3.- protejarea cordului

- efect puternic, dovedit pentru luteină vitamina E gelule și AG omega-3
- efect mai slab, dovedit pentru nuci, vitamina E încărcată pe nanoparticule PLGA și

### 4. protejarea rinichiului

- efect moderat dovedit de vitamina E, ambele forme și AG omega-3

### 5. protejarea ochiului

- efect dovedit de luteină

### 6. protejarea mușchiului scheletic

- efect dovedit de vitamina E ambele forme, ambele doze

### 7. prevenirea creșterii greutatei corporale și a dezvoltării țesutului adipos perivisceral

- efect puternic, dovedit atât pentru vitamina E cât și pentru luteină, încărcate pe nanoparticule
- efect parțial, demonstrat de AG omega-3 și de vitamina E sub formă de gelule

#### **Bibliografie selectată:**

- Ahmed, T.A., Aljaeid, B.M., 2017. A potential in situ gel formulation loaded with novel fabricated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for enhancing and sustaining the ophthalmic delivery of ketoconazole. *Int J Nanomedicine* 12, 1863–1875. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131850>
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.C., 2008. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* 5, 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Arya, S.S., Salve, A.R., Chauhan, S., 2016. Peanuts as functional food: a review. *J Food Sci Technol* 53, 31–41. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2007-9>
- Astete, C.E., 2010. ANTIOXIDANT NANOPARTICLES AS DELIVERY SYSTEMS. Louisiana State University.
- Azzi, A., Breyer, I., Feher, M., Ricciarelli, R., Stocker, A., Zimmer, S., Zingg, J.-M., 2001. Nonantioxidant Functions of  $\alpha$ -Tocopherol in Smooth Muscle Cells. *J Nutr* 131, 378S-381S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.378S>
- Buttgereit, F., Straub, R.H., Wehling, M., Burmester, G.-R., 2004. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: An update on the mechanisms of action. *Arthritis & Rheumatism* 50, 3408–3417. <https://doi.org/10.1002/art.20583>
- Carey, A.N., Poulouse, S.M., Shukitt-Hale, B., 2012. The beneficial effects of tree nuts on the aging brain. *Nutrition and Aging* 1, 55–67. <https://doi.org/10.3233/NUA-2012-0007>
- Catalgol, B., Ozer, N.K., 2012. Protective effects of vitamin E against hypercholesterolemia-induced age-related diseases. *Genes Nutr* 7, 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0235-9>
- Chast, F., 2013. Histoire de la corticothérapie. *La Revue de Médecine Interne* 34, 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2012.12.009>
- Connor, W.E., Duell, P.B., Kean, R., Wang, Y., 2007. The Prime Role of HDL to Transport Lutein into the Retina: Evidence from HDL-Deficient WHAM Chicks Having a Mutant ABCA1 Transporter. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4226–4231. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1275>
- Dillen, K., Vandervoort, J., Van den Mooter, G., Verheyden, L., Ludwig, A., 2004. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 275, 171–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.033>
- Gao, Y., Wang, C., Pan, T., Luo, L., Gao, Y., Wang, C., Pan, T., Luo, L., 2014. Impact of metformin treatment and swimming exercise on visfatin levels in high-fat-induced obesity rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 58, 42–47. <https://doi.org/10.1590/0004-2730000002840>

- Giannouris TL., 2020. Prescription Fish Oil: 5 Things to Know [WWW Document]. Medscape. URL <http://www.medscape.com/viewarticle/923751> (accessed 7.5.20).
- Giordano E. and Quadro L, 2018. Lutein, zeaxanthin and mammalian development: metabolism, functions and implications for health 647, 33–40.
- Guyton A.C. and Hall J. E., 2006. Textbook of medical Physiology, eleventh Ed. ed. Elsevier 2006, India.
- Herrera, E., Barbas, C., 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.* 57, 43–56.
- Ionica E, Costache M, 2014. Elena Ionica - Biochimie generala, vol. III - Vitamine si elemente minerale [WWW Document]. editura ARS DOCENDI Bucuresti. URL [https://www.librariaeminescu.ro:443/ro/isbn/973-558-767-3/Elena-Ionica\\_\\_Biochimie-general-a-vol-III-Vitamine-si-elemente-minerale.html](https://www.librariaeminescu.ro:443/ro/isbn/973-558-767-3/Elena-Ionica__Biochimie-general-a-vol-III-Vitamine-si-elemente-minerale.html) (accessed 7.9.20).
- Jiang, Q., Moreland, M., Ames, B.N., Yin, X., 2009. A combination of aspirin and gamma-tocopherol is better than that of aspirin and alpha-tocopherol in anti-inflammatory action and attenuating aspirin-caused adverse effects. *J Nutr Biochem* 20, 894–900. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.08.004>
- Jingyan Li, Sabliov Cristina, 2013. PLA/PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Nanotechnol Rev* 2(3), 241–257.
- Lorenzo, A.D., Martinoli, R., Vaia, F., Renzo, L.D., 2006. Normal weight obese (NWO) women: An evaluation of a candidate new syndrome 513–523.
- Manayi, A., Abdollahi, M., Raman, T., Nabavi, S.F., Habtemariam, S., Daglia, M., Nabavi, S.M., 2016. Lutein and cataract: from bench to bedside. *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 829–839. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1049510>
- Mares-Perlman J. A. et al, 2002. The Body of Evidence to Support a Protective Role for Lutein and Zeaxanthin in Delaying Chronic Disease. *Overview* 132, 518S–524S.
- Miloslavsky, E.M., Naden, R.P., Bijlsma, J.W.J., Brogan, P.A., Brown, E.S., Brunetta, P., Buttgerit, F., Choi, H.K., DiCaire, J.-F., Gelfand, J.M., Heaney, L.G., Lightstone, L., Lu, N., Murrell, D.F., Petri, M., Rosenbaum, J.T., Saag, K.S., Urowitz, M.B., Winthrop, K.L., Stone, J.H., 2017. Development of a Glucocorticoid Toxicity Index (GTI) using multicriteria decision analysis. *Ann Rheum Dis* 76, 543–546. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210002>
- Mitrea N, 2008. biochimie, Editura didactica si pedagogica, R. A. ed.
- Mohora, M., 2019. ‘Hormoni.’, in *Biochimie Medicală*, Ediția a-6-a. ed. Editura Niculescu, Bucuresti.
- Morgan, S.A., McCabe, E.L., Gathercole, L.L., Hassan-Smith, Z.K., Lerner, D.P., Bujalska, I.J., Stewart, P.M., Tomlinson, J.W., Lavery, G.G., 2014. 11 $\beta$ -HSD1 is the major regulator of the tissue-specific effects of circulating glucocorticoid excess. *PNAS* 111, E2482–E2491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323681111>
- O’Carroll, A.-M., Lolait, S.J., Harris, L.E., Pope, G.R., 2013. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *Journal of Endocrinology* 219, R13–R35. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0227>
- Pataky Z et al, 2010. Un patient obèse peut-il être métaboliquement normal ? *Revue Médicale Suisse* 6, 656–658.
- Pereira, S., Alvarez-Leite, J., 2014. Adipokines: biological functions and metabolically healthy obese profile. *JRLCR* 15. <https://doi.org/10.2147/JRLCR.S36060>
- Poiana C. et Fica S., 2015. *Endocrinologie pentru studenti si rezidenti*. Ed. Universitara Carol Davila, Bucuresti.
- Radulescu E, 2015. *Alimentatie inteligenta*, 9th ed. Viata si sanatate, Pantelimon.
- Romero-Corral, A., Somers, V.K., Sierra-Johnson, J., Thomas, R.J., Bailey, K.R., Collazo-Clavell, M.L., Allison, T.G., Korinek, J., Batsis, J.A., Lopez-Jimenez, F., 2008. Accuracy of Body Mass Index to Diagnose Obesity In the US Adult Population. *Int J Obes (Lond)* 32, 959–966. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.11>
- Rossum, E.F.C. van, 2017. Obesity and cortisol: New perspectives on an old theme. *Obesity* 25, 500–501. <https://doi.org/10.1002/oby.21774>
- Scanlon, G., 2011. *Macular Pigment: Practical Implications for Optometric Practice in Preventative Health Care and Visual Performance Enhancement*. Masters. <https://doi.org/10.21427/D7SP54>
- Schaal, S., Kaplan, H., 2008. CHAPTER 12 - Ocular Inflammation in Anterior Segment, in: Yorio, T., Clark, A.F., Wax, M.B. (Eds.), *Ocular Therapeutics*. Academic Press, London, pp. 275–300. <https://doi.org/10.1016/B978-012370585-3.50014-5>
- Sen, C.K., Khanna, S., Roy, S., 2006. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Sci* 78, 2088–2098. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.001>

- Traber, M.G., Mah, E., Leonard, S.W., Bobe, G., Bruno, R.S., 2017. Metabolic syndrome increases dietary  $\alpha$ -tocopherol requirements as assessed using urinary and plasma vitamin E catabolites: a double-blind, crossover clinical trial. *Am J Clin Nutr* 105, 571–579. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.138495>
- Trpkovic A. et al, 2015. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. *Journal Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 52, 70–85.
- Tuzcu M. et al, 2017. Lutein and zeaxanthin isomers modulates lipid metabolism and the inflammatory state of retina in obesity-induced high-fat diet rodent model. *BMC Ophthalmology*.
- Vachali, P.P., Besch, B.M., Bernstein, P.S., 2014. Chapter 8 - Carotenoids and Age-Related Macular Degeneration, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Handbook of Nutrition, Diet and the Eye*. Academic Press, San Diego, pp. 77–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401717-7.00008-3>
- Van der Valk, E.S., Savas, M., van Rossum, E.F.C., 2018. Stress and Obesity: Are There More Susceptible Individuals? *Curr Obes Rep* 7, 193–203. <https://doi.org/10.1007/s13679-018-0306-y>
- Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), 2015. *Bioactive nutraceuticals and dietary supplements in neurological and brain disease: prevention and therapy*. Elsevier AP, Amsterdam.
- Yoshida, M., Kimura, H., Kyuki, K., Ito, M., 2004. Combined Effect of Vitamin E and Insulin on Cataracts of Diabetic Rats Fed a High Cholesterol Diet. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 338–344. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.338>
- Zelena D. et al, 2015. Steroids: The physiologic and pharmacologic effects of glucocorticoids. *Orv. Hetil* 156 (35), 1415–1425.

## LISTA CU LUCRARI STIINTIFICE PUBLICATE

### Articole prim autor:

1. Factor de impact BDI, B+/ISI: 2019: 1.755 **Adriana Dinu**, *Bogdana Virgolici*, *Daniela Miricescu*, *Alexandra Totan*, *Elvira Gagniuc*, *Horia Virgolici*, *Daciana Costina Stefan*, *Maria Greabu*, *Maria Mohora* Renoprotective Effects of PLGA Nanoparticles Loaded with Vitamin E in Wistar Rats, on Hypercaloric Diet (Efectele renoprotective ale nanoparticulelor PLGA încărcate cu vitamin E la șobolani Wistar cu dietă hipercalorică) *Revista de Chimie(București)*.2020; 71[6]: 230-237; Factor de Impact 2019: 1.755

<https://www.revistadechimie.ro/Articles.asp?ID=8187>

2. Factor de impact BDI: B+ **Adriana Dinu**, *Bogdana Virgolici*, *Daniela Miricescu*, *Alexandra Totan*, *Horia Virgolici*, *Maria Greabu*, *Maria Mohora*, The ocular protective effects of PLGA nanoparticles loaded with lutein, in fat diet Wistar rats, treated with systemic glucocorticoids(Efectele protective ale nanoparticulelor PLGA încărcate cu luteină pe șobolani cu dietă grasă tratați cu glucocorticoizi) *Mediaci practice* vol XV, Nr 1(70) 2020

<https://rjimp.com.ro/rpm-vol-xv-nr-1-an-2020/>

### Articole coautor:

3. Factor de impact ISI: *Mihaela Balaban*, *Bogdana Virgolici*, **Adriana Dinu**, *Alexandra Totan*, *Daniela Miricescu*, *Daciana Stefan*, *Maria Greabu*, *Maria Mohora*. Metabolic Parameters in Wistar Rats Treated with

Glucocorticosteroids and Vitamin E-Charged Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) *Nanoparticles* (Parametrii metabolici pe șobolani Wistar tratați cu glucocorticoizi și vitamin E încarcată pe nanoparticule Acid poli-lactic-co glycolic-PLGA) REVISTA DE CHIMIE (București). 2019; 70 [4]: 1315-1318; Factor de Impact 2018-19: 1.605. <https://www.revistadechimie.ro/RCRevChimie.asp>.

4. Factor de impact BDI: Clinical aspects of cutaneous adverse effects induced by glucocorticosteroids *Mihaela Balaban, Cătălin Mihai Popescu, Raluca Popescu, Gabriela Turcu, Alice Brînzea, Roxana Ioana Nedelcu, Adriana Dinu, Bogdana Virgolici, Maria Mohora* Acta Medica Transilvanica. 2018; vol.23, no. 4: 28-31; Incadrare B+.

<http://www.amtsibiu.ro/arhiva-revista>

Participări la congrese și conferințe:

#### **Postere**

1. **Adriana Dinu, Mihaela Balaban, Bogdana Virgolici, Bogdan Calenic, Ramona Barac, Iuliana Ionaseu, Stefan Daciana Costina, Miricescu Daniela, Totan Alexandra, Maria Mohora.** The ocular protective effects of PLGA lutein nanoparticles in the obese Wistar rats treated with systemic glucocorticoids (Efectul protectiv al PLGA-NPs încărcate cu luteină pe șobolani Wistar obezi tratați systemic cu glucocorticoizi) The 3<sup>rd</sup> International Conference; New Trends on Sensing- Monitoring- Teliagnosis for Life Science NT-SMT-LS. 07/09/2017, București, România.

2. **Adriana Dinu, Bogdana Virgolici, Bogdan Calenic, Alexandra Totan, Daniela Miricescu, Elvira Gubgeac, Horia Virgolici, Maria Greabu, Maria Mohora** Reno-and cerebro-protective effects of nanoparticles charged with vitamin E in a high fat diet rat model (Efectul reno-cerebro-protectiv al nanoparticulelor încărcate cu vitamin E pe model șobolan cu dietă grasă) The 2nd National Conference of AMLR, 10- 13.05.2017, Timișoara, România.

3. **Adriana Dinu, Bogdana Virgolici, Alexandra Totan, Elvira Gubgeac, Daniela Miricescu, Horia Virgolici, Bogdan Calenic, Maria Mohora.** The synergic Renoprotective effect of fish oil and nanoparticles charged with vitamin E in the obese high fat diet Wistar rats Congress of the University of Medicine and pharmacy Carol Davila, Bucharest, the 5th Edition, 29- 31.05.2017, București, România.

4. **Dinu Adriana, Dinu Giulia Adelina, Balaban Mihaela, Virgolici Bogdana, Miricescu Daniela, Totan Alexandra, Greabu Maria, Mohora Maria** Comparative effect of natural, synthetic vitamin E and vitamin E charged in nanoparticles on visceral fat (Efectul comparativ al vitamin E naturale, sintetice și încărcate în nanoparticule asupra grăsimii viscerale). The 3rd Conference of AMLR, 05- 07.06.2019, Iași, România.

#### **Coautor**

1. *Mihaela Balaban, **Adriana Dinu**, Bogdana Virgolici, Elvira Gagniuc, Daniela Miricescu, Alexandra Totan, Greabu Maria, Dinu Giulia Adelina, Mohora Maria* Vitamin E-PLGA -NPs associated to prednisone treatment had hepatoprotective effect in high fat diet wistar rats (Efectul hepatoprotector al PLGA-NP

- încărcate cu vitamina E, asociate tratamentului cu prednison la șobolani Wistar hrăniți cu o dietă hiperlipidică). The 3rd Conference of AMLR, 05-07.06.2019, Iași, România.
2. *Balaban Mihaela, **Dinu Adriana**, Virgolici Bogdana, Totan Alexandra, Gubceag Elvira, Miricescu Daniela, Virgolici Horia, Calenic Bogdan, Mohora Maria* Nanoparticule incarcate cu vitamin E administrate la sobolani Wistar obezi hraniti cu o dieta hiperlipidica (Nanoparticule încărcate cu vitamina E administrate la șobolani Wistar obezi hrăniți cu o dietă hiperlipidică). The 11th Anual Congress of Medical Romanian Association (AMR), 20-22.04.2017, București, România.
  3. *Mihaela Balaban, Bogdana Virgolici, Roxana Ioana Nedelcu, Alice Brînzea, Carinna Morlova, **Adriana Dinu**, Maria Mohora* Metabolic syndrome in a patient with chronic psoriasis: case report (Sindrom metabolic la un pacient cu psoriazis vulgar: prezentare de caz). Congress of the University of Medicine and Pharmacy Carol Davila, the 5th Edition, 29-31.05.2017, București, România.
  4. *Mihaela Balaban, **Adriana Dinu**, Bogdana Virgolici, Alexandra Totan, Daniela Miricescu, Bogdan Calenic, Maria Mohora* Effect of two forms of vitamin E delivery systems in prednisone treated wistar rats (Efectele administrării de vitamină E în două forme diferite la șobolani Wistar tratați cu prednison). The 2nd National Congress of The Romanian Association of Laboratory Medicine with international participation, 09-11.05.2018, București, România.

**Participare conferinta nationala coauthor:**

*Bogdana Virgolici, M Balaban **A Dinu**, D Miricescu, A Totan, Elvira Gubceag, Maria Greabu, Maria Mohora* Effects of vitamin e on visceral fat- experimental study “New Trends on Sensing-Monitoring-Telediagnosis for Life Sciences” – NT SMT–LS 2020