

TEZĂ DE ABILITARE

**CERCETĂRI ȘI CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA DE METODE
MODERNE DE EVALUARE A STRESSULUI ȘI LA CARACTERIZAREA
UNOR PRODUSE CU ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ**

REZUMAT

Prezenta Teză de Abilitare, intitulată **Cercetări și contribuții la dezvoltarea de metode moderne de evaluare a stressului și la caracterizarea unor produse cu activitate antioxidantă** a fost realizată după mai mult de douăzeci ani de la susținerea tezei de doctorat și obținerea titlului de doctor. Ea prezintă în mod documentat principalele realizări profesionale, contribuțiile științifice și rezultatele originale obținute pe parcursul acestei perioade de timp. Aceste rezultate au fost diseminate în peste 40 de lucrări științifice publicate în reviste de specialitate ISI și BDI.

Prima parte este reprezentată de rezumatul tezei de abilitare în limbile engleză și română (A), iar partea a doua este reprezentată de contribuțiile științifice și profesionale (B). Cea de-a doua parte a tezei este, la rândul ei, structurată în secțiunile B1, B2 - Realizările științifice și profesionale și C - Planuri pentru evoluția și dezvoltarea carierei.

Realizările științifice și profesionale care au stat la baza prezentei lucrări corespund perioadei ulterioare susținerii tezei de doctorat, respectiv octombrie 1998, și cuprind cele mai relevante rezultate științifice publicate sub formă de articole în periodice cu largă vizibilitate internațională (ISI, BDI).

O scurtă descriere a realizărilor mele din perioada menționată cuprinde două domenii principale: activitatea didactică academică și activitatea de cercetare științifică.

În domeniul activității didactice am susținut în calitate de titular și/sau coordonator ore de curs și lucrări practice și am realizat suporturile de studiu la următoarele discipline din domeniul farmaceutic: Biochimie farmaceutică, Medicamente biologice, Istoria farmaciei. Conex cu aceste activități, am coordonat peste 50 lucrări de cercetare studentescă, finalizate prin lucrări de

licență în domeniul Sănătate și prin lucrări prezentate la sesiunile de comunicări științifice studentești.

Activitatea de cercetare științifică se bazează pe experiența acumulată în peste 30 de ani de muncă, mai întâi în domeniul cercetării medicale veterinare, iar apoi, timp de peste 25 ani, în învățământul superior, la facultatea de Farmacie din Constanța.

În decursul acestui timp am fost implicată în 10 proiecte naționale de cercetare, în calitate de director/responsabil sau membru în echipă și într-un proiect cu finanțare internațională în calitate de membru în echipă. Rezultatele s-au concretizat prin publicarea de articole in extenso în reviste științifice ISI sau BDI, monografiile și prin obținerea mai multor brevete de invenție.

Nu în ultimul rând, am fost implicată direct în activități de management universitar (șef de catedră, secretar științific al Senatului Universității Ovidius din Constanța (2004-2008), membru în Consiliul Facultății de Farmacie), fapt care mi-a oferit posibilitatea de a cunoaște îndeaproape toate aspectele specifice mediului academic.

Pe parcursul timpului, activitatea de cercetare a cuprins două sfere de preocupare predilecte:

- Dezvoltarea și verificarea unor metode de evaluare a nivelului de stress metabolic al organismului uman prin parametri sanguini chimici și biochimici;
- Evaluarea acțiunilor biologice în conexiune cu proprietățile antioxidante ale unor produse destinate consumului uman și ale unor extracte vegetale.

BI. Metode moderne pentru evaluarea stressului metabolic

I. Metoda de evaluare a nivelului de stress, elaborată și verificată prin numeroase experimente ale căror rezultate au fost publicate în reviste științifice ISI sau BDI sau comunicate la manifestări științifice internaționale, este rodul muncii într-o echipă internațională, condusă de profesorul universitar dr. Sepp Porta de la Universitatea din Graz, Austria. Ea se bazează pe alterarea valorilor unor parametri sanguini chimici și biochimici sub acțiunea catecolaminelor, recunoscute ca hormoni de stress.

Este cunoscut faptul că unul din sistemele principale de reacție ale organismului la stimulii de stress îl constituie sistemul hormonal adrenomedular, cu cele două molecule efectoare adrenalina și nor-adrenalina (catecolaminele). Acestea mai sunt cunoscute și ca hormoni de stress cu efect rapid, care pregătesc organismul pentru activități intense, fizice sau psihice. Unul dintre rolurile importante ale nor-adrenalinei constă în elaborarea răspunsului de tip luptă sau

fugi de către organism. Pe scurt, datorită stimulului/stimulilor pe care subiectul uman îl/îi percepe ca pe o amenințare, catecolaminele secretate pregătesc organismul pentru ripostă. Acțiunea asupra sistemului nervos simpatic se traduce printr-o serie de modificări funcționale și biochimice, cum ar fi: creșterea concentrației de glucoză din sânge, creșterea consumului de oxigen, creșterea temperaturii corpului, accelerarea bătăilor inimii, creșterea presiunii sanguine, bronhodilatație, accelerarea ritmului respirator. La nivel metabolic, acțiunea catecolaminelor se traduce prin creșterea consumului de energie și prin mobilizarea rezervelor energetice.

Deși există metode directe de măsurare a concentrației sanguine de catecolamine, acestea sunt, pe de o parte costisitoare și de durată, iar pe de altă parte conferă rezultate imprecise, datorate timpului de viață scurt al acestor molecule. Modificarea concentrației ionilor bicarbonat în sânge (rezerva alcalină), acidului lactic, glucozei sub acțiunea catecolaminelor poate fi mult mai ușor măsurată și cuantificată, concentrațiile acestor ioni și molecule fiind într-o relație de proporționalitate directă cu nivelul de catecolamine secretat. Astfel, prin măsurarea a 10 parametri sanguini, aflați în legătură directă cu concentrația de catecolamine din sânge, se poate elabora un model de variație al acestor parametri pentru diferite nivele și tipuri de stress. pe baza experimentelor efectuate s-a putut constata că procedeu de evaluare propus poate face diferența între stressul acut și cel cronic, intensitatea stressului, durata sa, oferind de asemenea informații cu privire la capacitatea organismului de a face față stimulului stressant. În metoda propusă efectul hormonilor de stress este măsurat prin evaluarea modificărilor de pH sanguin și ale componentelor sistemului sanguin de homeostazie al pH-ului, ale metabolismului glucidic și ale metabolismului electroliților. Toate aceste variații generează modele distincte pentru diferite tipuri și intensități de stress, calculate în urma a numeroase experimente, pe baza unui program statistic special.

Pentru verificarea și punerea la punct a metodei au fost făcute numeroase experimente în care s-a testat variația celor 10 parametri sanguini aleși, în funcție de diferite tipuri de activități sau de anumite situații care implică discomfort (exemplu: antrenamente fizice, regim de viață neconform, efort fizic la persoane sedentare, tensiune psihică, tratamente balneare, disfuncții metabolice grave, etc.). Rezultatele obținute în urma studiilor asupra acestui subiect s-au concretizat în publicarea a mai multor articole în publicații cotate ISI, ca autor principal sau coautor. De asemenea, metoda de evaluare a stresului metabolic utilizată în cadrul studiilor a fost

descrișă în două capitole de cărți publicate în edituri acreditate. În capitolul BI prezint în subcapitole următoarele:

1. Prezentarea generală a unei metode neinvazive de evaluare a nivelului de stress metabolic prin parametri biochimici;
2. Modificări ale unor parametri chimici și biochimici sanguini în diverse situații de stress;
3. Modificări ale concentrațiilor sanguine de Mg^{2+} și K^{+} survenite la subiecți de sex masculin și feminin înainte și după efort fizic;
4. Oboseala și deficitul de magneziu;
5. Tensiunea psihică: corelația dintre creșterea concentrației de magneziu ionic în sânge și markerii de stress;
6. Administrarea orală de suplimente de magneziu în doză mare: efecte semnificative în efortul fizic și în performanța sportivă;
7. Interdependența dintre concentrațiile de electroliți și parametrii metabolici în previzionarea performanței sportive;
8. Modificarea parametrilor metabolici și a concentrațiilor de electroliți în sânge în timpul recuperării post-efort fizic la subiecți cu pregătire pentru efort comparativ cu cei fără pregătire;
9. Interdependența dintre oxidarea proteinelor și activitatea peroxidazei și rezerva alcalină, concentrația de ioni bicarbonat, pH-ul sanguin și concentrația sanguină de Mg^{2+} în sângele venos și capilar uman.

BII. Contribuții în domeniul evidențierii acțiunilor biologice în conexiune cu proprietățile antioxidante ale unor preparate nutraceutice și ale unor produse destinate consumului uman

Activități biologice, cum sunt activitatea citotoxică, genotoxică sau/și antitumorală sunt de mare importanță, atât pentru utilizarea în scop terapeutic de noi produse, cât și pentru certificarea acțiunii unor produse deja cunoscute în medicina alternativă. Metodele *in vitro* pentru evaluarea acestor efecte sunt din ce în ce mai mult utilizate în experimente, ceea ce presupune eliminarea experimentului pe animale superioare și respectarea exigențelor privind etica în cercetare.

Testarea activității citotoxice și genotoxice se poate face prin metode *in vitro* pe culturi de celule standardizate (exemple: celule stem mezenchimale palatale, linii de celule epiteliale provenite din adenocarcinom cervical uman (HeLa) sau pe țesuturi vegetale embrionare (testul

Allium, testul *Triticum*). Aceste metode prezintă avantajul de a fi standardizate și de a putea oferi rezultate reproductibile și certe.

Testarea acțiunii antitumorale se poate face pe diferite linii de culturi de celule tumorale stabilizate și standardizate, metoda prezentând fiabilitate și reproductibilitatea, înlăturând în mare măsură determinările pe animale superioare.

Evidențierea proprietăților antioxidante ale unor preparate nutraceutice și a unor produse destinate consumului uman reprezintă o certificare a acțiunii benefice a acestora pentru sănătate.

Literatura de specialitate propune un număr relativ mare de metode puse la punct pentru evaluarea *in vitro* a activității antioxidante a diferitelor produse, cu precădere alimentare, bazate pe diferite principii de determinare. Măsurarea activității antioxidante a unui produs prin mai multe metode, în paralel, poate duce la rezultate confuzante, de foarte multe ori neputându-se face o legătură sau stabili o corelație între metode.

Metoda utilizată de firma Analytik Jena AG, Germania, propune *evaluarea activității antioxidante prin fotochemoluminescență pentru substanțe hidrosolubile (ACW)*, conform următorului principiu:

Radicalii liberi (anionii superoxid) sunt produși prin excitația optică (iradiere) a unei substanțe fotosensibilizatoare (colorant). Acești radicali sunt eliminați parțial din probă prin reacția cu antioxidanții prezenți. În tubul de măsurare radicalii rămași determină substanța detectoare să emită o cantitate luminoasă și astfel se poate măsura capacitatea antioxidantă a probei.

Capacitatea antioxidantă a probei se poate cuantifica prin comparare cu un standard (prin trasarea unei curbe de calibrare cu acid ascorbic) și se exprimă în unități echivalente ale standardului. Rezultatele se exprimă în n moli echiv. standard /volum probă (μL).

Metoda prezintă dezavantajul că rezultatele pot fi corelate destul de puțin cu rezultatele altor metode de evaluare a activității antioxidante și că reactivii necesari nu pot fi achiziționați decât de la firma care produce dispozitivul.

O altă metodă de măsurare a activității antioxidante, mult mai des abordată în studiile recente este *metoda cu DPPH*.

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) este unul dintre pușinii radicali organici cu azot stabili. Electronul de azot din molecula DPPH îi conferă o culoare purpurie, care devine incoloră în prezența antioxidanților. . Efectul său antioxidant este proporțional cu viteza de dispariție a sa

din mediul de reacție. În cursul reacției de oxidare culoarea mediului de reacție trece de la violet purpur la galben. Reacția este stoichiometrică, funcție de numărul de atomi de hidrogen primiți. Efectul antioxidant poate fi ușor evaluat urmărind scăderea absorbanței mediului de reacție la 517 nm. Aceasta este o metodă simplă, dar unele dezavantaje limitează aplicarea acesteia. Mulți antioxidanți care reacționează rapid cu radicalii peroxid pot avea o reacție foarte lentă la DPPH sau pot fi chiar inerti față de acesta.

Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power) evaluează activitatea antioxidantă printr-o reacție redox care are loc între substrat (donor de electroni) și ioni de Fe^{3+} (acceptor de electroni), producându-se ioni Fe^{2+} . Această reducere este monitorizată spectrofotometric prin modificarea culorii soluției de Fe^{3+} cu TPTZ (2,4,6-tri (2piridil) -s-triazină), care devine albastră și absoarbe radiația electromagnetică la o lungime de undă de 595 nm.

Metoda FRAP este capabilă să detecteze compușii care pot reduce fierul (III) la fier (II) și prezintă un potențial de reducere standard (E_0) sub 0,77 V. S-a demonstrat că testul FRAP este aplicabil unei game largi de antioxidanți, totuși viteza de reacție și randamentul final putând varia pentru fiecare compus antioxidant. . Reacția decurge la pH acid, ceea ce poate deveni un inconvenient pentru unele produse analizate.

Am determinat activitatea antioxidantă a numeroase produse, cu structuri și aplicații diverse (extracte vegetale, fructe proaspete, vinuri medicinale, complecși metalici ai rutinului și quercetolului, bere).

În ceea ce privește acțiunile biologice testate, s-au putut remarca legături între conținutul de compuși polifenolici și efectele antitumorale ale unor extracte vegetale. Au fost de asemenea evidențiate acțiuni genotoxice manifestate de complecși metalici ai flavonoidelor sau de extracte vegetale, care au prezentat în paralel o puternică acțiune antioxidantă.

Rezultatele obținute în urma studiilor asupra acestui subiect s-au concretizat în publicarea a numeroase articole în publicații cotate ISI, ca autor principal sau coautor.

Toate aceste realizări științifice le-am întreprins împreună cu cercetători valoroși din diverse domenii (farmacie, chimie, medicină, biologie), care se regăsesc în calitate de coautori în cadrul publicațiilor menționate în bibliografia acestei teze de abilitare.

Cercetările personale și-au propus:

-să realizeze o comparație între metodele de măsurare ale activității antioxidante descrise mai sus, în scopul identificării protocolului optim de evaluare a efectelor protectoare

antioxidante ale unor combinații coordinative ale flavonoidelor cu metale tranziționale, produselor nutraceutice (ceaiuri de fructe, extracte vegetale, vinuri medicinale), ale unor alimente (fructe) sau băuturi (bere);

-să realizeze posibile corelații între efectele antitumorale, citotoxice, și/sau genotoxice și acțiunea antioxidantă a produselor descrise.

În subcapitolul BII prezint succinct următoarele:

1. Determinarea activității antioxidante și a citotoxicității unui extract din fructe de soc (*Sambucus nigra*);

2. Proprietățile unor complecși ai Zn(II) și Cu (II) cu quercetin și rutin: proprietăți antioxidante și capacitatea de protecție UV;

3. Studiul activităților citotoxice ale complecșilor rutinului cu Zn(II) și Cu (II) cu ajutorul testelor *Allium* și *Triticum*;

4. Evaluarea activităților antioxidantă, citotoxică și antitumorală pentru un extract polifenolic din flori de *Robinia pseudoacacia* L.;

5. Activitățile antioxidantă, de protecție împotriva radiațiilor UV, citotoxice și antitumorale ale unui extract din flori de *Helichrysum arenarium* (L.);

6. Corelarea dintre activitatea antioxidantă și conținutul polifenolic și de microelemente din produse nutraceutice (ceaiuri de fructe);

7. Influența ambalajelor asupra conținutului polifenolic și activității antioxidante pentru mai multe tipuri de bere industrială.

În ceea ce privește cariera mea profesională, obținerea calității de conducător de doctorat îmi va permite implicarea și participarea activă la consolidarea domeniului Farmacie pe plan național și internațional.

Privind planurile de evoluție și de dezvoltare a carierei în plan științific prezint direcțiile de cercetare:

-punerea la punct a unei metode neinvazive de evaluare a nivelului de stress metabolic și stress oxidativ prin parametrii salivari;

-crearea unui protocol de lucru bazat pe o baterie de teste de citotoxicitate *in vitro*, realizate în paralel pe pe celule vegetale și celule animale în culturi stabilizate, care să poată descrie cât mai complet efectele citotoxice și/sau genotoxice și să clarifice mecanismele

moleculare implicate. Un astfel de protocol ar putea reduce foarte mult experimentele făcute pe animale superioare, respectând tendințele actuale privind etica în cercetarea științifică.

Privind planul de evoluție și de dezvoltarea a carierei în plan academic, prezint câteva proiecte și direcții astfel:

-dezvoltarea de metode noi de abordare teoretică și practică a biochimiei tegumentului pentru studenții secției *Cosmetică medicală, tehnologia produsului cosmetic cosmetică medicală, tehnologia produsului cosmetic;*

- introducerea în curricula programului de studii Farmacie a unor teme de actualitate, cum ar fi: *Aspecte biochimice în gerontopatologie, Aspecte biochimice correlative între stressul oxidativ și maladiile degenerative.*

Ca moduri de acțiune vizate pentru punerea în practică a planurilor de evoluție mă voi orienta către:

-acesarea de platforme electronice în vederea obținerii informațiilor științifice de primă actualitate;

-continuarea activității Centrului de cercetare în domeniul stressului, pe care îl coordonez și care ființează în cadrul Facultății de farmacie;

-constituirea unei platforme electronice de tip eLearning cuprinzând informații aduse la zi privind temele curriculare ale disciplinelor *Biochimie farmaceutică și Biochimia tegumentului.*

Totodată, abordarea științifică a managementului calității procesului de învățământ și de cercetare în domeniul Sănătate vor face parte din preocupările mele viitoare.

A treia secțiune a tezei de abilitare prezintă referințele bibliografice asociate primelor două secțiuni.