



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

*Studii privind efectele toxice induse de stresul
oxidativ în afecțiunile metabolice*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. MARGINĂ DENISA

Student-doctorand:

DIMA ELENA-INES

2018

INTRODUCERE	7
I. PARTEA GENERALĂ	10
1. DIABETUL ZAHARAT ÎN CONTEXTUL SOCIAL ACTUAL	10
1.1 CARACTERISTICI GENERALE ALE DIABETULUI ZAHARAT	10
1.2 PREVALENȚA ACTUALĂ ȘI PREVIZIUNI PRIVIND PREVALENȚA	11
1.3 IMPLICAȚIILE DIABETULUI ZAHARAT ASUPRA VIEȚII BOLNAVULUI	11
1.4 TRATAMENTUL DIABETULUI ZAHARAT DE TIP 2	13
2. STRESUL OXIDATIV CA FACTOR DETERMINANT PENTRU DIABETUL ZAHARAT DE TIP 2	16
2.1 PEROXIDAREA LIPIDICĂ.....	18
2.2 CARBONILAREA PROTEICĂ.....	19
2.3 PERTURBAREA MECANISMELOR ANTIOXIDANTE ÎN DIABETUL ZAHARAT DE TIP 2	24
3. STRESUL OXIDATIV ȘI ROLUL POTENȚIAL ANTIOXIDANT AL NANOPARTICULELOR DE SELENIU	25
3.1 PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA SeNPS	25
3.2 EFECTE BENEFICE ȘI POTENȚIALE UTILIZĂRI ALE SeNPS ÎN TERAPIE	28
II. CERCETĂRI PERSONALE	31
4. EVALUAREA PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICĂ A PROTEINELOR CARBONILATE CA BIOMARKER DE STRES OXIDATIV	31
4.1 INTRODUCERE	31
4.1.1 Ipoteze de lucru	31
4.1.2 Obiective specifice	33
4.2 MATERIALE ȘI METODE	33
4.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII	42
4.3.1 Determinarea spectrofotometrică a carbonililor proteici generați <i>in vitro</i> pe BSA.....	42
4.3.2 Stabilirea capacității de carbonilare a sistemelor de degradare <i>in vitro</i> asupra BSA	45
4.3.3 Stabilirea capacității de carbonilare a sistemelor de degradare <i>in vitro</i> asupra HSA.....	49
4.3.4 Determinarea oxidării proteice la nivelul grupelor tiol libere	50
4.4 CONCLUZII	51
5. INVESTIGAREA COMPORTAMENTULUI PROTEINELOR ÎN CURSUL PROCESULUI DE CARBONILARE PRIN TEHNICA ELECTROFOREZEI CAPILARE	52
5.1 INTRODUCERE	52
5.1.1 Ipoteze de lucru	52

5.1.2	Obiective specifice	52
5.2	MATERIALE ȘI METODE	53
5.3	REZULTATE ȘI DISCUȚII	58
5.3.1	Investigarea modelului de carbonilare a HSA	58
5.3.2	Investigarea modelului de carbonilare la pacienții diabetici	60
5.3.3	Analiza statistică a rezultatelor obținute	63
5.4	CONCLUZII	65
6.	STUDIUL PROCESULUI DE CARBONILARE PRIN ELECTROFOREZĂ PE GEL	67
6.1	INTRODUCERE	67
6.1.1	Ipoteza de lucru.....	67
6.1.2	Obiective specifice	68
6.2	MATERIALE ȘI METODE	69
6.3	REZULTATE ȘI DISCUȚII	72
6.3.1	Analiza probelor degradate <i>in vitro</i>	72
6.3.2	Analiza probelor de ser de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2.....	79
6.3.3	Analiza statistică a rezultatelor obținute pentru probele de ser provenite de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2	101
6.4	CONCLUZII	106
7.	ADERENȚA LA TRATAMENTUL DIABETULUI ZAHARAT DE TIP 2 (DZ2) – ETAPĂ ÎN EVALUAREA EVOLUȚIEI DEZECHILIBRELOR REDOX ASOCIATE ACESTEI PATOLOGII	107
7.1	INTRODUCERE	107
7.1.1	Ipoteza de lucru.....	107
7.1.2	Obiective specifice	108
7.2	MATERIALE ȘI METODE	108
7.3	REZULTATE ȘI DISCUȚII	110
7.4	CONCLUZII	117
8.	SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE SELENIU – NOI DIRECȚII DE COMBATERE A DEZECHILIBRELOR REDOX LA PACIENȚII CU DIABET ZAHARAT DE TIP 2.....	118
8.1	INTRODUCERE	118
8.1.1	Ipoteza de lucru.....	118
8.1.2	Obiective specifice	119
8.2	MATERIALE ȘI METODE	120
8.3	REZULTATE ȘI DISCUȚII	125
8.3.1	Sinteza SeNPs prin metoda chemogenică.....	125
8.3.2	Caracterizarea SeNPs prin AFM	125

8.3.3	Caracterizarea SeNPs prin SEM.....	132
8.4	CONCLUZII.....	134
9.	TESTAREA <i>IN VITRO</i> A NANOPARTICULELOR DE SELENIU SINTETIZATE PRIN METODA CHEMOGENICĂ	136
9.1	INTRODUCERE	136
9.1.1	Ipoteze de lucru	136
9.1.2	Obiective specifice	137
9.2	MATERIALE ȘI METODE	137
9.3	REZULTATE ȘI DISCUȚII	147
9.3.1	Evaluarea citotoxicității consecutive tratamentului cu SeNPs aplicat celulelor PANC-1...	147
9.3.2	Evaluarea viabilității celulare consecutive tratamentului cu SeNPs aplicat celulelor PANC-1 148	
9.3.3	Evaluarea comparativă a viabilității celulare consecutive tratamentului cu SeNPs sau selenit de sodiu aplicat celulelor PANC-1.....	150
9.3.4	Analizarea modificărilor morfologiei celulelor MRC-5 consecutive tratamentului cu SeNPs și selenit de sodiu.....	152
9.3.5	Evaluarea citotoxicității consecutive tratamentului cu SeNPs sau selenit de sodiu aplicat celulelor MRC-5.....	154
9.3.6	Evaluarea comparativă a viabilității celulare consecutive tratamentului cu SeNPs sau selenit de sodiu aplicat celulelor MRC-5.....	157
9.3.7	Dozarea speciilor reactive de oxigen generate intracelular, după expunerea celulelor la mediu hiperglicemic și tratarea cu SeNPs și Na ₂ SeO ₃	160
9.4	CONCLUZII.....	163
	CONCLUZII GENERALE.....	164
	<u>BIBLIOGRAFIE</u>	<u>170</u>
	<u>ANEXE.....</u>	<u>181</u>

I. Partea generală

1. Diabetul zaharat în contextul social actual

Conform definiției Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) „Diabetul zaharat este o boală cronică cauzată de deficiența moștenită și/sau dobândită în producerea de insulină de către pancreas, sau de ineficiența insulinei produse.”

DZ2 este o maladie complexă, determinată atât de mutații la nivelul mai multor gene, cât și de factorii de mediu. DZ2 este puternic corelat cu ereditatea, dar, în ultimii ani, au fost descoperite și unele gene a căror expresie este strâns corelată cu creșterea riscului de dezvoltare a acestei patologii. În România, diabetul este responsabil de 1% dintre decesele de orice cauză, dar bolile cardiovasculare, frecvent declanșate sau accentuate de diabet, conduc la 58% dintre decese. Incidența diabetului în populația țării este de 8,4%, iar factorii de risc majori pentru această maladie, supraponderalitatea, obezitatea și sedentarismul, corespund la respectiv 60,8%, 23,4 % și 26,5%.

În ceea ce privește simptomatologia, se întâmplă frecvent ca în DZ2 să fie slab reprezentată sau chiar absentă în primii ani de boală. Simptomele apar când complicațiile sunt deja instalate. Diabetul nu afectează calitatea vieții atât direct, cât prin complicațiile asociate. Decesele cauzate direct de diabet, la nivel mondial, au totalizat aproximativ 1,6 milioane, la nivelul anului 2015.

Medicamentele antidiabetice utilizate actualmente tratează efectele dereglărilor existente în DZ2. DZ2 este asociat stresului oxidativ, chiar dacă simptomatologia apare târziu după dezechilibrarea balanței redox biochimice. Terapia farmacologică existentă vizează doar consecințele stresului oxidativ și creșterii nivelului de radicali liberi, ce au repercursiuni asupra organelor și țesuturilor, din punct de vedere anatomic și fiziologic.

2. Stresul oxidativ ca factor determinant pentru diabetul zaharat de tip 2

Stresul oxidativ (SO) este rezultatul dezechilibrului dintre sistemele prooxidante și antioxidante ce intervin în anumite etape ale proceselor metabolice, în favoarea celor din urmă. Există numeroase afecțiuni corelate cu SO, cele mai frecvente fiind ateroscleroza și diabetul zaharat.

ROS pot declanșa procese ce alterează metabolismul celular, precum leziuni oxidative ale ADN-ului sau pierderea integrității membranei ca urmare a peroxidării lipidelor constitutive ale acesteia. ROS intervin inclusiv asupra structurii chimice a proteinelor sau carbohidraților (Ilie and Margina, 2012). Degradările produse conduc în timp la manifestări clinice, precum creșterea permeabilității capilare, disfuncția hematiilor, sau chiar la boli cronice, cum este cazul diabetului zaharat de tip 1 și de tip 2 (Cai *et al.*, 2004).

Diabetul și rezistența la insulină pot fi cauzate și de producerea în exces a NO și a aducților săi. Glicemia mare, cu caracter acut sau cronic, conduce la generarea unei cantități mari de ROS ce activează apoptoza la nivelul celulelor beta pancreatice, responsabile de secreția insulinei.

Mecanisme biochimice implicate provoacă o stare de inflamație ușoară, dar permanentă, care stă practic la baza complicațiilor diabetului. Controlul bolii în sine, dar și a patologiilor ce apar drept consecințe, poate fi obținut prin reducerea SO indus de hiperglicemie prin intervenirea asupra PKC și NADPH-oxidazei. Există ipoteze conform cărora inhibitorii utilizați pentru managementul SO și angiogenezei în complicațiile diabetice pot fi întrebuințate și pentru controlul morții celulare patologice din diabet sau din alte patologii.

O supraproducție de ROS conduce la modificări de tip oxidativ și la nivelul proteinelor. Carbonilarea proteinelor reprezintă introducerea grupărilor carbonil (aldehidică sau cetonică) în structura proteinelor, aceasta realizându-se prin mai multe mecanisme. Există un *pattern* al carbonilării, în sensul că doar anumite proteine pot suferi acest proces, iar structura proteică este cea care determină locurile preferențiale de carbonilare.

În cazul diabetului zaharat, stresul oxidativ apare consecutiv hiperglicemiei persistente, ROS generate conducând la modificări structurale ale proteinelor (inclusiv carbonilare), la inhibiție enzimatică și ulterior la afectarea statusului imun.

Literatura menționează determinarea grupărilor carbonil proteice în plasma pacienților cu diabet zaharat (Dayanand *et al.*, 2012; Telci *et al.*, 2000), sau la nivelul umorii vitroase la pacienții cu retionopatie diabetică (Loukovaara *et al.*, 2013), una din principalele complicații ale acestei boli. Evaluarea grupărilor carbonil proteice prezintă un mare avantaj, deoarece este un marker care apare în stadiile timpurii ale patologiei și rămâne în circulația sanguină timp îndelungat, comparativ cu alți biomarkeri ai stresului oxidativ (ca malondialdehida, 4-hidroxi-2-nonenal, glutatiionul redus). Totodată, îndeplinește cele 4 condiții ale biomarkerului ideal al stresului oxidativ: (1) indică cu acuratețe nivelul

degradării oxidative proteice; (2) este un indicator timpuriu al patologiei generate; (3) este un indicator al evoluției patologiei și (4) evaluează eficacitatea terapiei antioxidante.

Din evaluarea globală a stadiului actual al cercetărilor, putem concluziona că sunt dezvoltate un număr redus de metode CE pentru detecția grupărilor carbonil proteice, acestea fiind aplicate exclusiv doar în testele preclinice și pe țesuturi inaccesibile în practica clinică (hipocamp, musculatura striată). Este deci necesară dezvoltarea unor metode mai accesibile, de testare a proteinelor carbonilate în practica curentă.

3. Stresul oxidativ și rolul potențial antioxidant al nanoparticulelor de seleniu

Una dintre direcțiile actuale prin care se vizează reducerea nivelului stresului oxidativ este utilizarea nanoparticulelor drept purtători de antioxidanți, ce țintesc celulele și țesuturile afectate. Un caz special este seleniul (Se) sub formă de nanoparticule (SeNPs), deoarece acestuia i s-a atribuit un efect antioxidant propriu.

SeNPs au fost studiate pentru efectele **antiinflamatoare** în patologii cu etiologii și manifestări diferite (Malhotra *et al.*, 2015). Referitor la rolul lor **imunomodulator**, s-a observat că SeNPs sintetizate pe cale biogenică dau rezultate net superioare celor rezultate din chemosinteză (Yazdi *et al.*, 2015).

Deoarece s-a evidențiat o deosebită selectivitate a SeNPs pentru **celulele canceroase** față de cele normale în ceea ce privește citotoxicitatea și apoptoza celulară, s-a investigat rolul SeNPs, în **chemoprevenție și chemoterapie** (Chen *et al.*, 2008). SeNPs a indus o creștere doză-dependentă a potențialului electric al membranei mitocondriale, generând apoptoza celulară în adenocarcinomul mamar (Feng *et al.*, 2014) sau celulele de melanom uman, prin disfuncție mitocondrială (Chen *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2012). Cancerul de prostată deja beneficiază de un tratament adjuvant cu SeNPs (Gao, 2011).

Practic, majoritatea efectelor atribuite SeNPs derivă din **proprietățile antioxidante**. Se comportă ca *scavengeri* de ROS, astfel reducând nivelul SO intracelular. Spre deosebire de celulele normale, cele bacteriene sau canceroase sunt atacate tocmai prin hiperproducția de ROS declanșată, ce conduce la afectarea mitocondriei și moartea celulară. Capacitatea antioxidantă a nanoparticulelor de Se a fost demonstrată și în cadrul unor studii *in vivo* (Dkhill *et al.*, 2016).

Toate cele de mai sus conduc spre ideea că SeNPs ar putea constitui un aliat important al terapiei unor maladii asociate cu stresul oxidativ.

II. Cercetări personale

4. Evaluarea prin metoda spectrofotometrică proteinelor carbonilate ca biomarker de stres oxidativ

4.1 Introducere

4.1.1 Ipoteze de lucru

Procesul de carbonilare a proteinelor constă în inserarea unor grupări carbonil la structura primară a proteinei, cu generare de structuri de tip aldehydă sau cetonă. Mecanismele acestui proces chimic sunt multiple. Față de alte procese asociate stresului oxidativ (de exemplu, comparativ cu formarea legăturii disulfurice la nivelul resturilor de cisteină), carbonilarea este un proces ireversibil, cu formarea de compuși incapabili să îndeplinească funcțiile proteinei necarbonilate. Formarea precoce, remanența îndelungată, accesibilitatea clinică și stabilitatea chimică (până la 3 luni la -80°C , în mai multe materiale biologice) creează premisele dozării carbonililor proteici ca analiză de laborator curentă (Griffiths, 2000).

4.1.2 Obiective specifice

Scopul testărilor personale a fost studierea procesului de carbonilare *in vitro* și *ex vivo* în vederea evidențierii precoce a efectelor stresului oxidativ asupra proteinelor serice la pacienții diabetici. În acest sens, etapele experimentului au fost: oxidarea BSA *in vitro*, derivatizarea carbonililor obținuți și analizarea probelor prin spectrofotometrie cu detecție în vizibil; stabilirea capacității de carbonilare a sistemelor de degradare *in vitro* asupra BSA; stabilirea capacității de carbonilare a sistemelor de degradare *in vitro* asupra HSA; Determinarea oxidării proteice la nivelul grupelor tiol libere.

4.2 Materiale și metode

Pentru formarea grupărilor carbonil la nivelul punților metilenice din catena proteică, am realizat experimente de oxidare *in vitro*. În acest sens, am testat capacitatea oxidantă a trei sisteme chimice, și anume: clorură ferică/ascorbat de sodiu (Bautista, 1998), acid

ascorbic/sulfat feros (Bansal and Bilaspuri, 2007), peroxid de hidrogen/sulfat de cupru (Kocha, 1997). Măsură capacității oxidante a fost dată de nivelul de derivați carbonili formați, evaluați folosind metoda lui Levine (Levine et al., 1990). Astfel, prin reacția carbonililor cu gruparea amino liberă a DNPH se formează hidrazone, ce pot fi cuantificate spectrofotometric. Am investigat și un alt proces ce are loc în timpul oxidării proteice, anume reducerea numărului de grupe tiol libere. În acest sens, am folosit o metodă spectrofotometrică, dozând grupele tiol din HSA nedegradat, respectiv degradat, metoda Ellman.

4.3 Rezultate și discuții

4.3.1 Determinarea spectrofotometrică a carbonililor proteici generați *in vitro* pe BSA

În urma experimentelor repetate, am stabilit ca interval de lungimi de undă atribuite hidrazonelor intervalul 367–381 nm. Această bandă largă sugerează prezența unui amestec de fracții carbonilate.

4.3.2 Stabilirea capacității de carbonilare a sistemelor de degradare *in vitro* asupra BSA

Am evaluat comparativ concentrațiile de proteine carbonilate obținute pentru fiecare din cele trei sisteme oxidante testate. Rezultatele obținute au evidențiat faptul că ordinea descrescătoare a capacității de carbonilare proteică a sistemelor oxidante folosite a este: clorură ferică/ascorbat de sodiu > acid ascorbic/sulfat feros > sulfat de cupru/peroxid de hidrogen. Deci, cel mai eficient sistem de degradarea prin carbonilare a BSA s-a remarcat a fi sistemul FeCl₃/ascorbat de sodiu (Purdel et al., 2015, Purdel, N. C., 2014, Dima, 2014). Conținutul de carbonili (> 30 nmol/ mg proteină) a fost semnificativ mai ridicat decât cel fiziologic, care are valori sub 1 nmol/mg proteină (Dalle-Donne et al., 2003).

Am studiat, de asemenea, dinamica procesului de carbonilare pentru cele trei sisteme oxidante alese. Am evidențiat prin experimente faptul că, pentru sistemul oxidant cel mai potent, FeCl₃/ascorbat de sodiu, în primele 9 ore de incubare la 37⁰C există o dependență directă a nivelului proteinelor carbonilate de timp. Prelungirea duratei de incubare în aceleași condiții (până la 18 h) imprimă o tendință de scădere a nivelului de carbonili, indiferent de sistemul oxidant, datorită instabilității în timp a acestora.

4.3.3 Stabilirea capacității de carbonilare a sistemelor de degradare *in vitro* asupra HSA

Întrucât ținta cercetării noastre a fost analiza cantitativă a carbonililor proteici din serul uman, următoarea etapă firească după analiza BSA a fost testarea impactului celor trei sisteme oxidante asupra albuminei serice umane (HSA), privind generarea de carbonili. Am constatat că spectrele probelor de HSA degradate și derivatizate la hidrazone cu DNPH sunt foarte asemănătoare celor provenite de la BSA. Probele de HSA au fost de asemenea cel mai intens oxidate cu sistemul FeCl₃/ascorbat de sodiu.

4.3.4 Determinarea oxidării proteice la nivelul grupelor tiol libere

Am obținut dreapta de regresie pentru un etalon de cisteină prin măsurarea absorbanțelor a șase concentrații din acest aminoacid cu grupare tiol (0,5, 1, 2, 3, 4, 5 mg %). Rezultatul a confirmat oxidarea puternică ce are loc *in vitro* folosind sistemul FeCl₃/ascorbat de sodiu asupra substratului proteic reprezentat de HSA.

4.4 Concluzii

Am investigat degradarea *in vitro* a albuminei serice bovine și a celei umane. Carbonilii rezultați au fost derivatizați, iar compușii obținuți au fost cuantificați printr-o metodă spectrofotometrică cu detecție în vizibil. În urma experimentelor repetate, am **optimizat metoda Levine pentru a genera un randament mai mare în obținerea derivaților finali colorimetrabili de tip hidrazone**, reducând numărul spălărilor intermediare succesive cu amestecul acetat de etil/etanol (1:1) și respectiv scurtând timpul de solubilizare cu guanidină clorhidrică.

A rezultat că **sistemul oxidant FeCl₃/ascorbat de sodiu a fost cel mai potent, conducând la cea mai mare concentrație de carbonili într-un timp relativ scurt**. Rezultatele obținute pentru albumina serică umană au fost aceleași ca în cazul albuminei serice bovine, cea mai intensă carbonilare fiind obținută cu FeCl₃/ascorbat de sodiu. Această observație aduce **avantajul utilizării unor concentrații mici de substrat proteic pentru generarea carbonililor și analiza acestora**.

Am studiat și un alt fenomen ce are loc în timpul acțiunii oxidante asupra proteinelor, și anume formarea legăturilor disulfidice dintre grupările tiolice ale resturilor de aminoacizi

cu sulf, din compoziția proteinelor. Am constatat o **scădere a grupelor tiol libere, tradusă ca o altă consecință a impactului oxidant, alături de carbonilare.**

5. Investigarea comportamentului proteinelor în cursul procesului de carbonilare prin tehnica electroforezei capilare

5.1 Introducere

5.1.1 Ipoteze de lucru

În privința efectelor stresului oxidativ asupra proteinelor, numai unele pot fi carbonilate, iar situsurile sunt determinate de structura proteică; aminoacizii la nivelul cărora carbonilarea este cel mai susceptibilă sunt: arginina, lizina, prolina, treonina (Temple, 2006). Este deci posibilă existența unui model (*pattern*) de carbonilare pentru o anumită patologie. Electroforeza capilară oferă informații despre fiecare fracție carbonilată, reprezentată printr-un peak individual pe electroforegramă, spre deosebire de metodele spectrofotometrice, de exemplu, care cuantifică totalul carbonililor.

5.1.2 Obiective specifice

În această etapă a studiilor, am încercat identificarea unor premise pentru stabilirea unui *pattern* al carbonilării *in vitro* a probelor de albumină serică umană respectiv a unor probe (ser) provenite de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2, printr-o metodă de electroforeză capilară. În acest sens, etapele experimentului au fost: oxidarea HSA *in vitro*, derivatizarea carbonililor obținuți și analizarea probelor prin electroforeză capilară; derivatizarea probelor de ser provenit de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2, conținând proteine carbonilate *in vivo*, și analizarea acestora prin electroforeză capilară (CE); aplicarea de calcule statistice pentru stabilirea claselor de proteine din serurile de pacienți cu diabet zaharat de tip 2; interpretarea rezultatelor statistice și extragerea concluziilor privind metoda de analiză prin electroforeză capilară studiată și premisele pentru stabilirea unui model de carbonilare proteică.

5.2 Materiale și metode

Se generează proteine carbonilate *in vitro*, pornind de la HSA 20 g/L, oxidat cu sistemul FeCl₃/ascorbat de sodiu. Pentru studierea carbonilării generate *in vivo*, se folosesc probe de ser provenite de la pacienți diabetici (17 pacienți). Probele de sânge din care s-a obținut serul au fost de tip deșeu de laborator, epuizate după realizarea testelor solicitate de medicul ce a dispus recoltarea. Derivatizarea proteinelor carbonilate, indiferent de originea lor, la hidrazone se face cu DNPH, după protocolul descris în capitolul anterior. Modificările aduse metodei stabilite de Levine (Levine et al., 1990) pentru a crește randamentul au constat în reducerea numărului spălărilor succesive cu amestec acetat de etil/ alcool etilic (1:1) de la trei la două, și menținerea probelor la 37°C timp de 60 min în loc de 12h.

Se realizează preconditionarea coloanei capilare, înainte de începerea analizei, cu NaOH 0.1 M timp de 60 min, apoi cu apă distilată HPLC 30 min. La începutul fiecărei analize a unei probe (derivate din HSA sau ser uman), are loc o recondiționare a coloanei capilare, prin spălare cu NaOH 0.1 M timp de 5 minute, apoi cu apă distilată grad HPLC 5 minute și cu soluția de dextran 70 15% în tampon borat 20 mM 10 min. Această etapă asigură încărcarea electrică a mediului de migrare și distribuția uniformă a dextranului 70 pe suprafața interioară a capilarei. Dextranul 70 reduce interacțiunile dintre proteină și peretele capilarei și controlează fluxul electroosmotic, asigurând însă separarea derivaților cu DNPH pe criteriul masei lor moleculare, chiar și când valorile sunt foarte apropiate.

Detecția se face spectrofotometric, la 370 și 365 nm, pentru confirmarea structurii de hidrazonă, și 214 nm pentru confirmarea structurii proteice. Separarea electroforetică se face la pH=9, generat de tamponul borat 20 mM. Pe tot parcursul analizei, coloana este termostată la 25°C.

5.3 Rezultate și discuții

5.3.1 Investigarea modelului de carbonilare a HSA

Se constată faptul că toți derivații cu DNPH, indiferent de proveniența proteinelor carbonilate, au migrat în analiza prin metoda de CE în mai puțin de 32 de minute, ceea ce dovedește o bună viteză. Aceasta furnizează informații despre mărimea moleculelor proteice, corelându-se cu mase moleculare mici sau medii. Pentru detecția derivaților proteici cu DNPH, metoda de CE-DAD a arătat specificitate și sensibilitate superioare spectrofotometriei clasice.

5.3.2 Investigarea modelului de carbonilare la pacienții diabetici

Am utilizat probe de ser provenit de la pacienți diabetici, pentru a analiza dinamica procesului de carbonilare *in vivo*. De asemenea, un alt obiectiv a fost evaluarea comparativă a carbonilării generate *in vivo* și *in vitro*, pentru a aprecia dacă HSA este un surogat potrivit pentru cercetarea carbonilării *in vivo*.

Analiza CE-DAD cu detecție la 365 nm a confirmat prezența a 11 derivați cu DNPH care au migrat în 35 de minute, indicând faptul că și în acest caz este vorba despre specii proteice cu mase moleculare mici sau medii. 5 dintre acești derivați se regăsesc și în profilul de carbonilare al HSA. În Fig.5.2, se remarcă prezența acelorași derivați în 3 probe diferite de ser provenite de la pacienți diabetici.

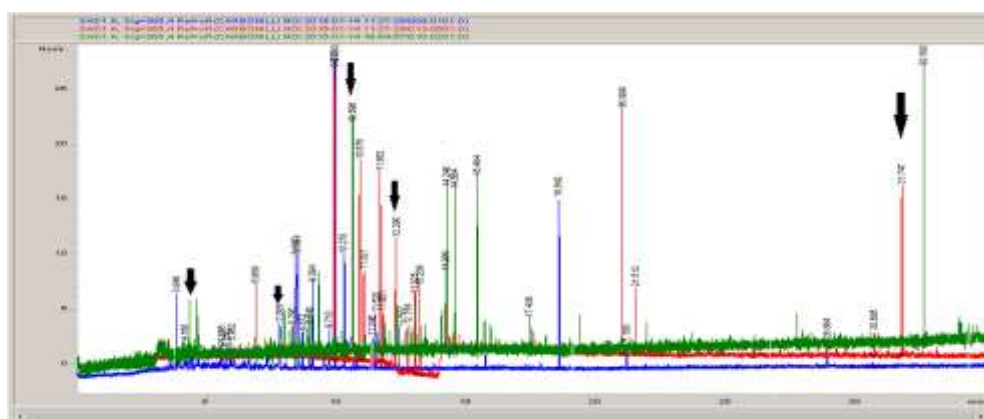


Fig.5.2. Electroforegrame suprapuse ale proteinelor carbonilate și derivatizate cu DNPH, corespunzătoare la 3 pacienți cu diabet zaharat de tip 2 (detecție la 365 nm)

Comparând electroforegramele corespunzătoare unei probe de ser de pacient diabetic, una cu detecție la 365 nm, cealaltă la 370 nm, am observat un înalt grad de similitudine, confirmându-se pe această cale natura de hidrazonă a compușilor migrați.

Semnalul obținut prin detecția la 370 nm a celor 17 probe de ser aferente celor 17 subiecți diabetici, a relevat, un număr diferit de peak-uri, cu diferite valori ale RT. Valorile RT obținute în cazul detecției la 365 nm au fost similare celor de la 370, confirmându-se faptul că semnalul este atribuit structurilor de hidrazonă, pentru întreg lotul de probe. Impactul diferit pe care carbonilarea îl are asupra proteinelor serice este vizibil prin numărul variabil de peak-uri detectate la 365 și 370 nm, număr cuprins între 1 și 34.

5.3.3 Analiza statistică a rezultatelor obținute

Valorile RT ale peak-urilor selectate au fost repartizate în 10 clase, astfel încât dispersia valorilor dintr-o clasă să fie minimă. Consecutiv analizei prin algoritmul de analiză de *clusteri* de tip *k-means*, se poate deduce că procesul de carbonilare, în diabetul zaharat de tip 2, decurge cel mai adesea la nivelul fracțiilor mici.

Studierea proteinelor carbonilate în raport cu timpul de eluție, prin valorile RT, a sugerat o dinamică specifică a fragmentării. O ipoteză poate fi faptul că, în momentul în care acționează ROS asupra proteinelor, mai întâi are loc carbonilare, și abia ulterior oxidarea conduce la liza lanțului proteic, cu scăderea masei moleculare, dar menținerea relativ constantă a numărului de specii carbonilate. Deviația standard relativă furnizează informații despre gradul de „împrăștiere” a valorilor RT, față de valoarea lor medie, dintr-o clasă de RT. 7 din 10 clase (clasele 4-10) au avut un RSD mai mic de 5%, ceea ce presupune o serie de valori foarte compactă.

5.4 Concluzii

În cursul acestei etape a experimentelor, **am dezvoltat o nouă metodă de electroforeză capilară cu detecție DAD pentru evaluarea proteinelor carbonilate în diferite probe biologice.** Condițiile electroforetice stabilite sunt: coloană capilară cu diametru intern de 75 μm, tampon borat 20 mM, injectarea în sistem hidrodinamic, la 0.5 psi timp de 10 secunde, fiind aplicată o tensiune de 25 kV. **Noua metodă de CE-DAD dezvoltată a confirmat existența unui amestec complex de 19 proteine carbonilate derivatizate cu DNPH.** Derivații separați au migrat în mai puțin de 35 de minute, dovedind **o bună viteză și implicit mase moleculare mici sau medii ale acestora.**

Utilizând aceleași condiții experimentale cu scopul identificării modelului de carbonilare *in vivo* în trei probe de ser provenite de la pacient diabetic, analiza de CE-DAD cu detecție la 365 nm a evidențiat și separat 11 derivați cu DNPH care au migrat în maxim 35 de minute, sugerând și în acest caz faptul că masele lor moleculare sunt mici sau medii. Trebuie subliniat aici faptul că procesul de carbonilare *in vitro* este mult mai agresiv decât cel *in vivo* indus de stresul oxidativ, acesta din urmă implicând și alte proteine serice în afara albuminei.

Carbonilarea proteică este un proces complex ce reflectă nivelul de stres oxidativ. Prin experimentele realizate pe probe de ser de diabetic, **am evidențiat că există premise**

pentru stabilirea unui model de carbonilare proteică folosind o nouă metodă de electroforeză capilară. Asemănarea *pattern*-urilor obținute prin electroforeză capilară pentru HSA degradată *in vitro* și proteine serice oxidate *in vivo* sugerează posibilitatea utilizării acestor modele pentru studierea efectului stresului oxidativ asupra proteinelor provenite din serul pacienților cu diabet zaharat de tip 2.

6. Studiul procesului de carbonilare prin electroforeză pe gel

6.1 Introducere

6.1.1 Ipoteza de lucru

Electroforeza pe gel este o metodă utilă pentru separarea și analiza macromoleculilor de tipul proteinelor, ADN-ului sau ARN-ului, dar și a fragmentelor acestora. Separarea se face pe criteriul greutatei moleculare și al sarcinii electrice (Kryndushkin et al., 2003). Întrucât tema studiată în cadrul acestei lucrări s-a centrat pe efectele stresului oxidativ asupra proteinelor, am ales pentru analiză metoda de electroforeză unidimensională pe gel de poliacrilamidă. Această metodă furnizează informații calitative despre identitatea proteinelor degradate prin carbonilare în funcție de greutatea lor moleculară.

6.1.2 Obiective specifice

În prezentul studiu, am avut scopul de a verifica și adapta o metodă de electroforeză pe gel pentru analiza unor probe de proteine de degradate sub impactul stresului oxidativ, cu accent pe carbonilare. De asemenea, am încercat identificarea unor caracteristici ale modului de degradare proteică *in vivo* la pacientul cu diabet zaharat de tip 2, pentru stabilirea ulterioară a unor ipoteze privind modelul de carbonilare proteică în această patologie cronică. În acest sens, etapele experimentului au fost: oxidarea BSA și HSA *in vitro*, derivatizarea carbonililor obținuți și analizarea probelor prin electroforeză pe gel; analizarea probelor de HSA și BSA degradate *in vitro*, dar nederivatizate, prin electroforeză pe gel; analizarea probelor de ser provenit de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2, nederivatizate, prin electroforeză pe gel; aplicarea de calcule statistice pentru stabilirea claselor de proteine din serurile analizate și interpretarea rezultatelor statistice cu extragerea concluziilor privind metoda de analiză studiată.

6.2 Materiale și metode

Se carbonilează *in vitro* probe de BSA și HSA, conform protocolului prezentat în capitolul 4. Serul este separat din sânge. Sângele a fost recoltat à jeun, de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2, în vacutainere cu activator de tromb. Probele de sânge din care s-a obținut serul au fost de tip deșeu de laborator, epuizate după realizarea testelor solicitate de medicul ce a dispus recoltarea. Probele au fost încărcate în gelul de poliacrilamidă. Masa de proteină injectată pe godeu a fost de 2 ng. Probele nu au fost denaturate termic.

Gelul de migrare/separare conține 10% poliacrilamidă, iar gelul de concentrare – 4%. Ambele geluri conțin acrilamidă - bisacrilamidă, tampon Tris/HCl/SDS de concentrații diferite, adus la valori de pH distincte, persulfat de amoniu și TEMED. După polimerizarea gelului, s-au încărcat în fiecare godeu 2 μg proteină din fiecare probă. Markerul de masă moleculară (MK) a fost See Blue Plus2 Prestained Standard 1x. Migrarea proteinelor s-a realizat cu ajutorul unui sistem de electroforeză la tensiunea constantă de 90 V, timp de 2 ore, la 25°C, în tampon de migrare 1X. După finalizarea migrării, gelul se colorează 30-60 min, apoi se decolorează.

6.3 Rezultate și discuții

6.3.1 Analiza probelor degradate *in vitro*

O modalitate prin care, în urma oxidării, se generează compuși cu GM mai mari decât ale celor inițiali, este realizarea de legături disulfurice, provenite de la grupările tiol ale resturilor de cisteină. Probele de HSA au format, prin oxidarea *in vitro*, predominant specii chimice cu GM mai mică decât a HSA, pe când oxidarea BSA a condus preponderent la formarea unui număr important de entități cu GM mai mari decât a BSA. Rezultă de aici că modul de oxidare al celor două tipuri de albumină este diferit. Spre deosebire de HSA, grupele funcționale apărute prin degradarea BSA permit realizarea de legături intermoleculare, rezultând compuși cu GM mai mare decât a BSA. În mediul biologic, în organismul uman, fenomenul poate fi analog cu glicarea proteinelor expuse pe perioade scurte de timp acțiunii unor concentrații crescute de glucoză. Dacă expunerea este cronică, durează un timp mai îndelungat, aducții inițiali de glicare suferă scindări, rearanjări moleculare, cu generarea de molecule de mai mici dimensiuni (Singh et al., 2014; Welsh, Kirkman and Sacks, 2016). Probabil în experimentul nostru, perioada de denaturare a

macromoleculilor proteice a permis doar formarea aducțiilor, nefiind urmată de fragmentarea acestora. Am observat totodată și că diluția avansată a proteinei în amestecul oxidant favorizează formarea unor niveluri mai mari de entități cu GM inferioare celei a proteinei de bază, și chiar a mai multor astfel de specii.

6.3.2 Analiza probelor de ser de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2

În primă fază, am dozat proteinele din serul de pacient, pentru a stabili gradul de diluție necesar fiecărui ser, astfel încât încărcarea godeului să se realizeze cu 2 μg proteine. Pentru a verifica dacă, la mase mai mari de proteină, sunt exprimate pe gel și alte fracții proteice, am preparat o scară etalon din serul unuia dintre pacienți, cu mase de proteine încărcate pe godeu între 2 și 20 μg . După examinarea rezultatului acestui experiment, am stabilit că masa de proteină cu care se obține exprimarea tuturor fracțiilor proteice, cu benzi de dimensiune adecvată, este de 8 μg . În consecință, am preparat diluții din toate serurile de pacient, astfel încât conținutul în proteine al volumului încărcat în godeu să fie de 8 μg , și le-am analizat prin metoda de electroforeză pe gel. De asemenea, prin aceeași tehnică, am studiat și serurile provenite de la indivizi sănătoși.

6.3.3 Analiza statistică a rezultatelor obținute pentru probele de ser provenite de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2

Numărul maxim de fracții proteice obținute prin analizarea unui ser de diabetic prin metoda de gel electroforeză a fost de 22, în cazul pacientului 9. Valorile GM ale fracțiilor proteice de la toate serurile de diabetici au fost grupate în 22 de clase. Delimitarea și constituirea claselor de valori ale GM proteice a fost făcută prin analiza de *clusteri* de tip *k-means*. Acest algoritm asigură o dispersie minimă a valorilor dintr-o anumită clasă. În urma analizei, putem aprecia că gradul cel mai mare de fragmentare are loc la nivelul proteinelor cu GM redusă. În cazul clasei 2 (GM = 36 - 36,55), există un grad foarte mic de dispersie a valorilor față de medie, ceea ce semnifică existența celor mai multor proteine cu GM foarte apropiate dintre toate clasele, în cadrul unui ser de diabetic. Referitor la dispersia valorilor GM, majoritatea claselor sunt caracterizate de RSD de până în 5%. Aceasta denotă un mare grad de apropiere a valorilor dintr-o clasă. Totodată, în clasele cu valori foarte apropiate ale GM, probabilitatea existenței și a proteinelor carbonilate este majoră.

6.4 Concluzii

În cadrul acestei părți a studiilor, **s-a explorat posibilitatea aplicării și adaptării unei metode de electroforeză pe gel pentru analiza unor probe de proteine degradate oxidativ în sensul carbonilării**. Gelurile obținute astfel și identificarea GM ale proteinelor separate au arătat că prezența fracțiilor proteice cu GM considerabil scăzute față de BSA și HSA se înregistrează numai la utilizarea SDS în compoziția gelului și tamponului de migrare, deci prin electroforeză în condiții denaturante. **Metoda astfel adaptată, a fost aplicată pe probe de ser uman provenite de la pacienți cu diabet zaharat de tip 2**. După identificarea GM ale fracțiilor separate, cu ajutorul tehnicilor de statistică și *data mining* s-a stabilit un profil de fragmentare al proteinelor serice ale pacienților cu diabet zaharat de tip 2. Așadar, **metoda utilizată se poate aplica atât pentru analiza unor probe de proteine carbonilate prin degradare *in vitro*, cât și pentru determinarea profilului de fragmentare proteic din serul uman provenit de la pacientul cu diabet zaharat de tip 2**. Din acest punct de vedere, s-a observat faptul că **proteinele cu GM mică se fragmentează cel mai tare, într-un mediu oxidant**. Totodată, **proteinele sunt mai susceptibile la fragmentare atunci când se află în concentrație mai mică**.

7. Aderența la tratamentul diabetului zaharat de tip 2 (DZ2) – etapă în evaluarea evoluției dezechilibrelor redox asociate acestei patologii

7.1 Introducere

7.1.1 Ipoteza de lucru

Majoritatea pacienților diabetici nu se confruntă doar cu diabetul zaharat în sine, ci și cu unele complicații ale acestei boli, cu localizare diversă, de exemplu cardiovasculară, metabolică sau renală.

Polimediția conduce la scăderea complianței pacientului, cu efecte directe asupra managementului hiperglicemiei. Non-aderența la terapia antidiabetică reprezintă o problemă de sănătate publică atât în statele dezvoltate, cât și în cele în curs de dezvoltare, cum este cazul României.

7.1.2 Obiective specifice

Scopul studiului a fost evaluarea gradului de aderență la terapia diabetului zaharat și patologiilor asociate, și identificarea cauzelor scăderii complianței pe fondul polipragmaziei. Etapele experimentului au fost: realizarea unui chestionar cu întrebări; completarea chestionarului pentru un număr de pacienți de ambele sexe și grupe de vârstă diferite, respectiv de indivizi sănătoși; analiza statistică a răspunsurilor primite de la cele două tipuri de subiecți, compararea extragerea concluziilor privind factorii, asumarea necesității și gradul aderenței la terapie ale pacientului diabetic.

7.2 Materiale și metode

- Chestionar individual
- Microsoft Office Excel versiunea 2013

Chestionarul a fost format din două părți. Prima parte a furnizat date antropometrice (sex, vârstă), data diagnosticării cu DZ2, informații despre principalele morbidități sau patologii asociate, dar și despre numărul de medicamente administrate pentru diabet și/sau boli coexistente. A doua parte a chestionarului a vizat chiar aderența pacientului la medicația antidiabetică. Chestionarul a fost completat în cadrul unui interviu în direct avut de către un farmacist clinician cu fiecare dintre cei 61 de pacienți (GS, grup de studiu). Chestionarul a fost completat și pentru 12 subiecți non-diabetici (GC, grup de control).

7.3 Rezultate și discuții

GC a fost format din femei în proporție de 59%, raportul femei (F)/ bărbați (M) fiind ușor schimbat în GS (42% femei). 61% din pacienții diabetici au avut vârste de 60 ani sau peste (Fig.7.3). Subiecții GC au avut vârste cuprinse între 22 și 35 de ani.

Cea mai mare parte a pacienților au fost diagnosticați cu DZ2 vara (41%), aproximativ un sfert toamna (26%), primăvara și iarna scăzând numărul celor diagnosticați (18%, respectiv 15%). Literatura de specialitate menționează faptul că incidența DZ2 și prevalența intoleranței la glucoză cresc odată cu temperatura exterioară (Blauw et al., 2017). Totodată, bolile cardiovasculare se acutizează vara, la consultul medical putându-se stabili și diagnosticul de DZ2, frecvent asociat lor (Lavigne et al., 2014, Lim, Kim and Hong, 2012).

S-a evaluat și prezența factorilor de risc la diabetici. Supraponderalitatea/ obezitatea de diverse grade a fost identificată la 30% din GS, 50% dintre aceștia având vârste sub 60 de ani. Procentul de femei supraponderale/ obeze a fost aproximativ dublu față de cel de bărbați supraponderali/obezi (36% vs. 20%). 14% dintre membrii GC au fost supraponderali/ obezi. O altă comorbiditate a DZ2 este fumatul. 16% dintre diabetici au fost fumători, față de 42% dintre indivizii sănătoși. Cercetările prospective au relevat faptul că 10.3% dintre cazurile de DZ2 la bărbați și 2.2% dintre cele de DZ2 la femei pot fi atribuite fumatului (Pan et al., 2015). 69% GS au suferit de minim o boală CV, iar 61% dintre ei - de dislipidemii. Toți diabeticii dislipidemici au fost și hipertensivi. Aproximativ 1 din 4 diabetici a avut două diagnostice CV.

Aproximativ jumătate din pacienții (29 din 61) din GS au deținut în terapie minim 6 medicamente, indiferent de indicația lor. 19% dintre diabeticii cu maxim 5 medicamente și 10% dintre cei cu mai mult de 5 au uitat să își administreze minim un antidiabetic o dată pe săptămână. Se extrage deci o observație interesantă, și anume că pacienții cu mai multe medicamente au fost mai atenți la administrarea antidiabeticelor. De altfel, pacienții ce luau mai mult de 5 medicamente s-au dovedit a fi mai prudenți cu posologia. 69% au declarat că întotdeauna țin cont de momentul zilei în care administrează antidiabeticile, spre deosebire de cei având sub 5 medicamente, la care procentul cu același răspuns a fost de numai 38%. Cei care doar uneori nu respectă acest parametru au constituit 31% din subiecții cu peste 5 medicamente, față de 53% din cealaltă categorie. Momentul administrării nu a constituit o regulă pentru 9% din pacienții ce aveau de luat maxim 5 medicamente zilnic (Fig.7.11.).

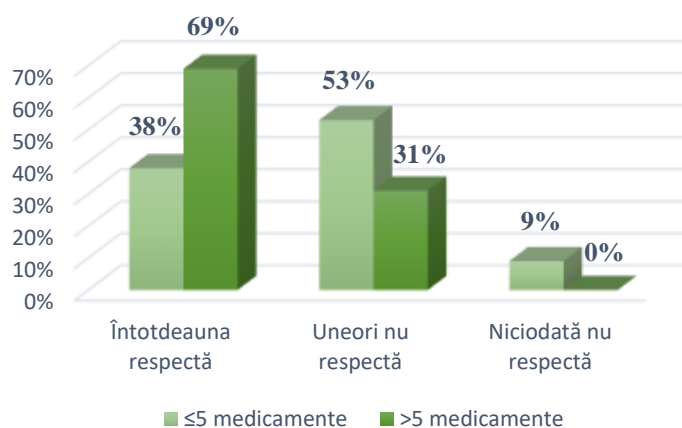


Fig.7.11. Respectarea momentului zilei indicat pentru administrarea terapiei antidiabetice

12% dintre pacienții cu maxim 5 medicamente în terapie și 3% din celălalt grup au sistat minim un antidiabetic atunci când s-a ameliorat simptomatologia specifică. Un singur pacient a întrerupt minim un antidiabetic la înrăutățirea stării fizice, făcând parte dintre cei cu mai mult de 5 medicamente prescrise.

7.4 Concluzii

Controlul incoerent sau inconstant al DZ2 favorizează toate dezechilibrele de la nivel celular, inclusiv redox, cu potențarea fenomenului de stres oxidativ. Polimedicația poate determina scăderea aderenței la terapia antidiabetică, și deci controlul glicemiei și al celorlalți parametri asociați acestei maladii. Studiul de față a arătat că **pacienții cu un număr mai mic de medicamente au avut o aderență diminuată față de cei cu terapie medicamentoasă foarte complexă**. Aderența joasă s-a tradus prin omiterea administrării sau nerespectarea momentului din zi când se administrează antidiabeticul, dar și prin renunțarea la terapia specifică atunci când simptomatologia s-a ameliorat.

Astfel, în contextul prezentei lucrări, putem concludiona că **pacienții cu diabet zaharat sunt susceptibili la dezechilibre biochimice și metabolice care pot genera fenomene toxice asociate cu stresul oxidativ**. Această observație confirmă **necesitatea investigării parametrilor care ilustrează stresul oxidativ la pacienții cu diabet zaharat**. De asemenea, se evidențiază în acest context **necesitatea introducerii în terapia pacienților a unor preparate care să combată stresul oxidativ**.

8. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de seleniu – noi direcții de combatere a dezechilibrelor redox la pacienții cu diabet zaharat de tip 2

8.1 Introducere

8.1.1 Ipoteza de lucru

Reducerea stresului oxidativ constituie o provocare majoră în terapia actuală. Una dintre direcțiile actuale pentru reducerea nivelului stresului oxidativ este utilizarea nanoparticulelor drept purtători de antioxidanți. Un caz special este seleniul de nanoparticule (SeNPs), deoarece acestuia i s-a atribuit un efect antioxidant propriu.

SeNPs au fost studiate pentru proprietățile antiinflamatoare (Malhotra, 2015), inclusiv la nivel visceral (Zhu, 2017) sau pentru capacitatea cicatrizantă (Ramya, 2015). SeNPs au demonstrat eficiență pentru acțiunea imunomodulatoare (Yazdi, 2015), antivirală (Ramya, 2015), antibacteriană (Stolzoff, 2016) și antifungică (Eswarapriya, 2015). Privind impactul asupra celulelor canceroase, rezultatele cercetărilor în acest sens au recomandat utilizarea SeNPs în chemoprevenție și chemoterapie (Chen, 2008; Liu, 2012; Feng, 2014). Interesante pentru tema prezentului studiu, stresul oxidativ asociat bolilor metabolice, sunt proprietățile antioxidante, confirmate de anumite surse din literatură (Dkhil, 2016).

8.1.2 Obiective specifice

Date fiind potențialele efecte terapeutice prezentate anterior, în cadrul acestei părți a experimentelor am dorit să sintetizăm și să caracterizăm nanoparticule de seleniu, etapele de lucru urmărind aceste scopuri.

8.2 Materiale și metode

Pentru sinteza SeNPs, am ales o cale chemogenică, accesibilă ca materiale, echipament și costuri experimentale. Metoda are la bază un proces redox, în care Na_2SeO_3 este redus la Se^0 de către glutatation (GSH). pH-ul soluției trebuie să fie slab bazic, asigurat de NaOH. Stabilizarea particulelor pentru prevenirea agregării se face cu albumină serică bovină (Fig.8.2.) (Johnson, 2008).

Am analizat SeNPs sintetizate folosind microscopia de forță atomică (*Atomic Force Microscopy*). Tehnica are drept principiu de funcționare măsurarea unei proprietăți locale (absorbție atomică, grad de înălțime), prin plasarea în imediata proximitate a stratului de probă a unei sonde sau a unui vârf. Distanța foarte redusă dintre sondă/vârf și probă permite efectuarea de determinări pe o suprafață mică. AFM-ul este o tehnică nedistructivă capabilă să investigheze suprafața unui corp indiferent dacă este conductor sau izolator.

Am analizat SeNPs folosind microscopia electronică (*Scanning Electron Microscopy*). Metoda permite determinarea formei și dimensiunilor particulelor, printr-o tehnică directă. Se pot obține și date despre compoziția sau structura internă a particulelor, cum ar fi detectarea razelor X caracteristice produse de interacțiunea dintre electroni și materialul de analizat, ori monitorizarea modului în care electronii sunt difracți.

8.3 Rezultate și discuții

8.3.1 Sinteza SeNPs prin metoda chemogenică

În urma sintezei, a rezultat o dispersie coloidală de culoare roșu-cărămiziu. Este notabilă uniformitatea dispersiei, fără separarea fazelor.

8.3.2 Caracterizarea SeNPs prin AFM

Toate nanoparticulele de Se au avut diametre de 45-55 nm. Aceasta dovedește o variabilitate redusă a dimensiunilor nanoparticulelor de Se din probă, deci omogenitatea materialului sintetizat. Stratul organic are o grosime de aproximativ 20 nm, factor util în menținerea nanoparticulelor dispersate, neaglomerate. Se remarcă o bună dispersare a în matricea organică cu care s-a făcut stabilizarea. Forma nanoparticulelor de Se, observată vizual, este sferică. Conform histogramei din Fig.8.18., aproximativ o treime dintre SeNPs au un diametru de 70-80 nm, fiind dimensiunea cel mai frecvent întâlnită în probă. În proporții foarte similare, de aproximativ 15%, sunt prezente particulele de 60-70, 80-90 și 90-100 nm. Diametre de peste 100 nm întâlnim la mai puțin de 10% dintre SeNPs.

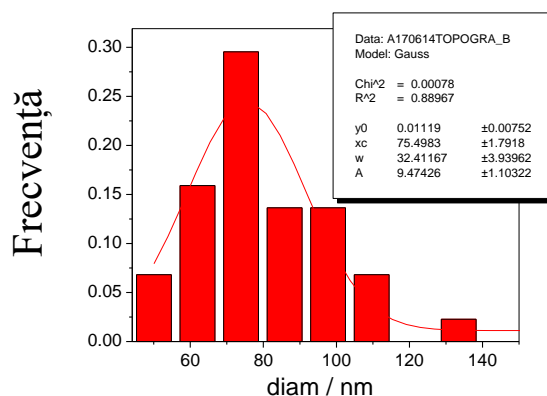


Fig.8.18. Histogramă reprezentând frecvența apariției nanoparticulelor de Se de diferite diametre

8.3.3 Caracterizarea SeNPs prin SEM

Notabilă este prezența a numeroase particule individualizate. S-a putut stabili și pe această cale că particulele au diametre sub 100 nm.

Din analiza imaginilor obținute la SEM, se confirmă faptul că diametrele particulelor măsurate au valori foarte apropiate, de dimensiuni nanometrice, sunt bine dispersate, cu tendință scăzută de aglomerare. Am putut concluziona că particulele sunt aproape sferice. Avantajul acestei forme este proporția constantă, nevariabilă, de nanoparticule de Se ajunse la interiorul celulei. Totodată, valoarea diametrelor, de 50-70 nm, se încadrează în dimensiunile de sub 100 nm interpretate anterior și care compun peste 80% din totalul de nanoparticule de Se din probă, conform histogramei.

8.4 Concluzii

Deși majoritatea antioxidantilor ce se pot administra sunt de natură organică, există și substanțe anorganice pentru care au fost descrise în literatură proprietăți reducătoare *in vivo*. **Un exemplu în acest sens sunt nanoparticulele de Se, care se deosebesc de alte nanoparticule printr-un efect antioxidant propriu, și nu doar de transportor al unor antioxidanți. Am sintetizat SeNPs folosind o metodă de sinteză chemogenică, avantajoasă din punct de vedere economic și relativ simplă din perspectiva materiilor prime și aparaturii de laborator folosite.**

Consecutiv sintetizării, stabilizării și condiționării, **proba a fost caracterizată prin intermediul unor tehnici de microscopie avansată de tip AFM și SEM.** Am putut observa astfel forma sferică a nanoparticulelor, dispersarea relativ omogenă a acestora în matricea organică, dar și gradul mic de variabilitate a dimensiunilor (mai mult de 80% în intervalul 50-100 nm). **Diametrele mici, cum este deci cazul celor sintetizate de noi, favorizează pătrunderea în celulă, în perspectiva unor studii *in vitro*.**

9. Testarea *in vitro* a nanoparticulelor de seleniu sintetizate prin metoda chemogenică

9.1 Introducere

9.1.1 Ipoteze de lucru

Multiplele beneficii terapeutice sugerate prin studii *in silico* sau *in vitro*, unele demonstrate chiar *in vivo*, califică nanoparticulele de seleniu (SeNPs) drept un candidat la statutul de remediu terapeutic pentru afecțiuni metabolice, canceroase, infecțioase, etc.

9.1.2 Obiective specifice

În prezentul studiu, ne-am propus evaluarea și cuantificarea efectului asupra celulelor manifestat de nanoparticulele de seleniu sintetizate de noi. Parametrii urmăriți au fost îndeosebi citotoxicitatea și viabilitatea celulară. Pentru aceasta, am testat mai multe concentrații de nanoparticule de seleniu între ele, dar am efectuat cercetări și comparativ cu selenitul de sodiu, un compus cu seleniu intens studiat pentru efectele biologice, benefice sau toxice. Am desfășurat experimente pe două linii celulare, una canceroasă (PANC-1), și una normală (MRC-5), pentru observarea diferențelor în comportamentul SeNPs față de cele două tipuri de celule.

9.2 Materiale și metode

Pentru testarea *in vitro* a SeNPs, am folosit celule PANC-1 (ATCC CRL-1469) - canceroase, respectiv celule MRC-5 (ATCC CCL-171) – normale, necanceroase.

Pentru efectuarea testului de citotoxicitate prin dozarea lactat dehidrogenazei, s-a utilizat un kit. LDH este o enzimă citoplasmatică stabilă prezentă în toate celulele, eliberată în supernatantul culturii celulare după ruperea membranei, ca urmare a expunerii celulelor la SeNP și selenit de sodiu. Astfel, intensitatea colorației imprimată de formazan, colorant hidrosolubil, este proporțională cu numărul de celule lizate. Detecția se face spectrofotometric, la 490/492 nm.

Pentru realizarea testului de viabilitate, metoda întrebuițează bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Celulele vii ce au un metabolism fiziologic pot transforma MTT într-un formazan colorat în violet. Absorbanta acestui compus este maximă în intervalul 570-630 nm, cel mai frecvent fiind folosite lungimile de undă de 590-600 nm. Odată cu moartea celulară, activitatea mitocondrială dispare, și nu mai este posibilă convertirea MTT în formazan.

Pentru inducerea formării de ROS la nivelul celulelor MRC-5, am folosit mediu de cultură hiperglicemic, cu 4,5 g glucoză/L (25 mM). Pentru dozarea ROS generate, am utilizat o sondă fluorescentă, 2',7' dicloro-dihidro-fluorescein diacetat (H₂DCFDA). Ajuns în celulă, compusul este parțial dezacetilat sub acțiunea esterazelor, compusul rezultat fiind nefluorescent. În celulă însă, forma nefluorescentă este oxidată de către ROS la forma oxidată, DCF, fluorescentă.

9.3 Rezultate și discuții

9.3.1 Evaluarea citotoxicității consecutive tratamentului cu SeNPs aplicat celulelor PANC-1

Celulele PANC-1 au fost tratate cu suspensii de SeNPs de următoarele concentrații: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$. Am observat că, pentru concentrația minimă testată de SeNPs de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, s-a înregistrat toxicitatea cea mai mare dintre godeurile cu celule tratate (88%). Concentrația maximă testată de SeNPs a indus un grad mai mic de toxicitate celulară (77%). Acest impact redus asupra biochimiei celulei este determinat chiar și de SeNPs de concentrații mai mici, începând cu 25 $\mu\text{g/mL}$ valorile citotoxicității rămânând relativ constante în intervalul de concentrații 25-75 $\mu\text{g/mL}$ (77-79%) (Fig.9.4.).

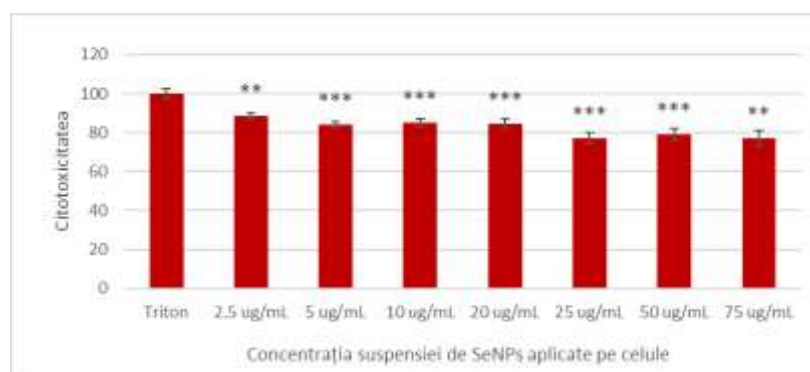


Fig.9.4. Citotoxicitatea indusă asupra celulelor PANC-1 de SeNPs de concentrații cuprinse între 2,5 și 75 $\mu\text{g/mL}$

9.3.2 Evaluarea viabilității celulare consecutive tratamentului cu SeNPs aplicat celulelor PANC-1

Moartea celulară s-a produs cel mai intens în cazul aplicării SeNPs 75 $\mu\text{g/mL}$, viabilitatea fiind redusă în acest caz la 42%. Pe măsură ce concentrația suspensiei de SeNPs a crescut, viabilitatea celulară a scăzut printr-o dependență constantă. Practic, la o concentrație scăzută de SeNPs, de doar 2,5 $\mu\text{g/mL}$, mai mult de un sfert dintre celulele canceroase au fost distruse, ceea ce constituie un rezultat promițător pentru posibila întrebuițare medicamentoasă a SeNPs.

9.3.3 Evaluarea comparativă a viabilității celulare consecutive tratamentului cu SeNPs sau selenit de sodiu aplicat celulelor PANC-1

Celulelor PANC-1 li s-au aplicat SeNPs în concentrații de 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 25 $\mu\text{g/mL}$. În paralel, celule au fost tratate cu Na_2SeO_3 (crește nivelul de stres oxidativ intracelular) de concentrații de 5 sau 10 ori mai mici în Se față de SeNPs. Am observat că și la concentrații de 25 de ori de mai mici decât cel mai mic nivel testat anterior (0,1 $\mu\text{g/mL}$ vs. 2,5 $\mu\text{g/mL}$), SeNPs au redus viabilitatea PANC-1 cu peste 12% în testul cu MTT. Efectul toxic celular crește odată cu creșterea concentrației de SeNPs din mediu; la 1 $\mu\text{g/mL}$ SeNPs, diminuarea viabilității celulare este de 2,5 ori mai mare decât cea obținută la concentrația de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ SeNPs. Pentru analiza comparativă a SeNPs și Na_2SeO_3 privind reducerea viabilității celulare, ne-am oprit asupra SeNPs 25 $\mu\text{g/mL}$. Concentrațiile Na_2SeO_3 au fost stabilite astfel încât conținutul în Se să fie la 1/10, respectiv 1/5 din cel al SeNPs (Fig.9.8.).

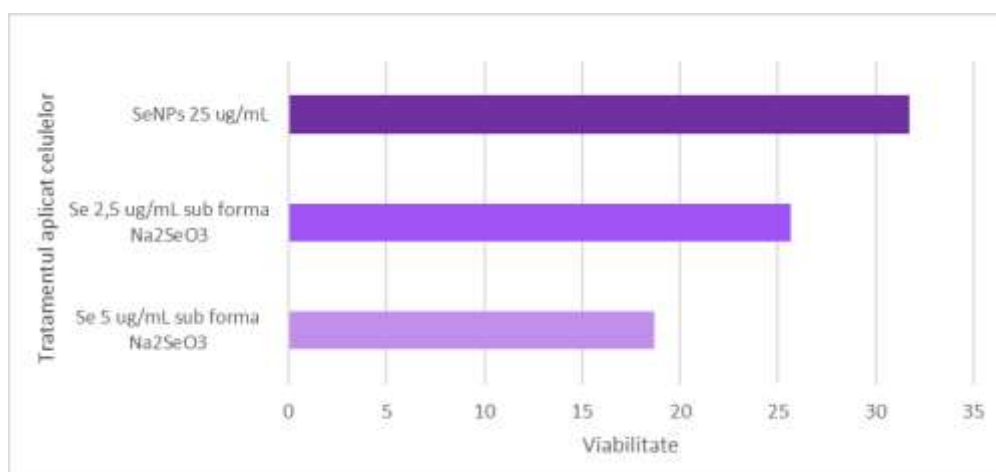


Fig.9.8. Impactul asupra viabilității celulelor PANC-1 al SeNPs 25 $\mu\text{g/mL}$ sau Na_2SeO_3 la 1/10 sau 1/5 în Se decât SeNPs

9.3.4 Analizarea modificărilor morfologiei celulelor MRC-5 consecutive tratamentului cu SeNPs și selenit de sodiu

La 24 h după aplicarea fie a SeNPs, fie a Na_2SeO_3 de concentrații de 5 ori mai mici în Se decât SeNPs, am examinat microscopic celulele, la obiectiv 20 x, pentru a observa eventuale diferențe morfologice. Na_2SeO_3 imprimă modificări morfologice după 24 h de contact cu celulele MRC-5, vizibile față de efectele SeNPs.

9.3.5 Evaluarea citotoxicității consecutive tratamentului cu SeNPs sau selenit de sodiu aplicat celulelor MRC-5

Celulele normale MRC-5 au fost tratate cu suspensii de SeNPs de următoarele concentrații: 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 25 $\mu\text{g/mL}$. Am remarcat faptul că valorile citotoxicității determinate de primele 5 concentrații testate de SeNPs (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 $\mu\text{g/mL}$) sunt foarte apropiate de valoarea controlului negativ (C) (67,18 % – 70,20 % față de 68,06 %). O citotoxicitate accentuată este însă indusă de SeNPs 25 $\mu\text{g/mL}$ (75,54%), dar chiar și la această concentrație, valoarea reprezintă $\frac{3}{4}$ din acțiunea Tritonului. Pentru SeNPs, în domeniul de concentrații 0,1 - 5 $\mu\text{g/mL}$, este notabilă deci lipsa citotoxicității în cazul liniei celulare MRC-5.

Am evaluat comparativ citotoxicitatea indusă asupra celulelor MRC-5 prin acțiunea SeNPs, Na_2SeO_3 de concentrații de 10, respectiv de 5 ori mai mici în seleniu decât SeNPs (Fig.9.14.). În urma studiului comparativ cu Na_2SeO_3 , a reieșit că SeNPs la concentrații de 2,5; 5 și 25 $\mu\text{g/mL}$ manifestă un grad de citotoxicitate aproape egal cu cel al unei soluții de Na_2SeO_3 cu un conținut în Se de 1:5 față de SeNPs corespunzătoare (SeNPs vs. Na_2SeO_3 1:5 - 67,18 % vs. 66,28 % pentru 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 70,19 % vs. 69,50 % pentru 5 $\mu\text{g/mL}$; 75,53 % vs. 75,72 % pentru 25 $\mu\text{g/mL}$). Se evidențiază astfel profilul redus de citotoxicitate asupra celulelor normale al SeNPs raportat la Na_2SeO_3 , la concentrații egale. Rezultatele obținute pentru SeNPs sunt însă apropiate de cele ale controlului negativ, ceea ce semnifică un efect toxic celular nesemnificativ în domeniul de concentrații 0,1 $\mu\text{g/mL}$ - 5 $\mu\text{g/mL}$.

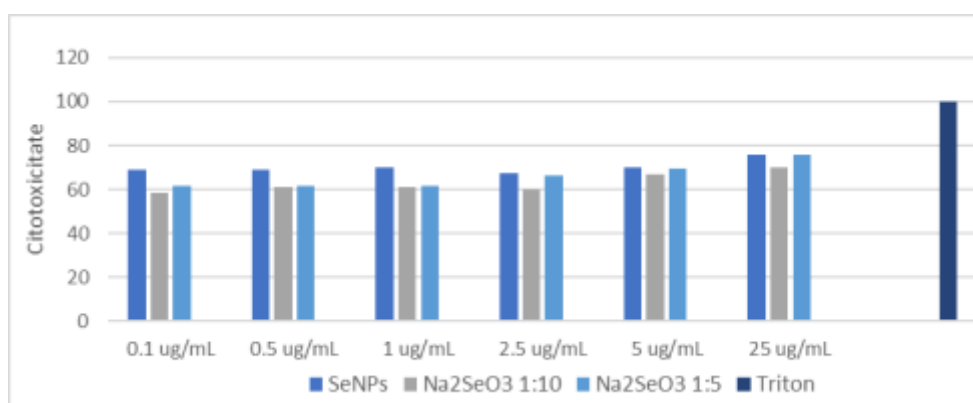


Fig.9.14. Analiza comparativă a citotoxicității induse asupra celulelor MRC-5 de SeNPs de concentrații cuprinse între 0,1 și 25 $\mu\text{g/mL}$ și de Na_2SeO_3 de concentrații de 10, respectiv de 5 ori mai mici în seleniu decât SeNPs corespunzătoare

9.3.6 Evaluarea comparativă a viabilității celulare consecutive tratamentului cu SeNPs sau selenit de sodiu aplicat celulelor MRC-5

Conform rezultatelor din testul cu MTT, viabilitatea celulelor a fost afectată doar într-o mică măsură de aplicarea SeNPs (Fig.9.16.). În domeniul de concentrații 0,1 – 5 $\mu\text{g/mL}$, viabilitatea a fost de minimum 86,2%. Concentrația maximă, 25 $\mu\text{g/mL}$, a determinat viabilitatea majorității celulelor (57% viabilitate). Pentru SeNPs 0,1-5 $\mu\text{g/mL}$, am obținut valori ale viabilității celulare sensibil egale cu cele ale matorului. Pentru SeNPs 0,1 $\mu\text{g/mL}$ și 0,5 $\mu\text{g/mL}$, viabilitatea celulelor a fost considerabil mai mare decât a celor tratate cu Na_2SeO_3 de concentrații de 10 ori mai mici în seleniu decât SeNPs (0,1 $\mu\text{g/mL}$ - 91,49% vs. 62,76%). Pentru toate concentrațiile de SeNPs testate, viabilitatea celulară a fost mai ridicată decât în cazul utilizării Na_2SeO_3 de concentrații de 5 ori mai mici în seleniu decât SeNPs (viabilitate de la 91,49 % la 57 % pentru SeNPs, vs. 62,76 % – 39,03 % pentru Na_2SeO_3 1:5). Studiile au arătat că, la concentrații în Se de 0,0045-0,45 $\mu\text{g/mL}$ (Zhu, Gray and Nettesheim, 1992), selenitul stimulează proliferarea celulară. În acest interval se încadrează Na_2SeO_3 cu un conținut în seleniu de 10 ori mai mic decât SeNPs 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, precum și Na_2SeO_3 cu un conținut în seleniu de 5 ori mai mic decât SeNPs 0,1; 0,5; 1; 2,5 $\mu\text{g/mL}$. O tendință negativă în proliferarea celulară a fost remarcată la Na_2SeO_3 având concentrații în Se de peste 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (Zhu, Gray and Nettesheim, 1992). Ne-am așteptat așadar să diminueze proliferarea celulară Na_2SeO_3 cu un conținut în seleniu de 10 ori mai mic decât SeNPs 25 $\mu\text{g/mL}$, dar și Na_2SeO_3 cu un conținut în seleniu de 5 ori mai mic decât SeNPs 5 $\mu\text{g/mL}$ și respectiv 25 $\mu\text{g/mL}$ (Fig.9.17.).

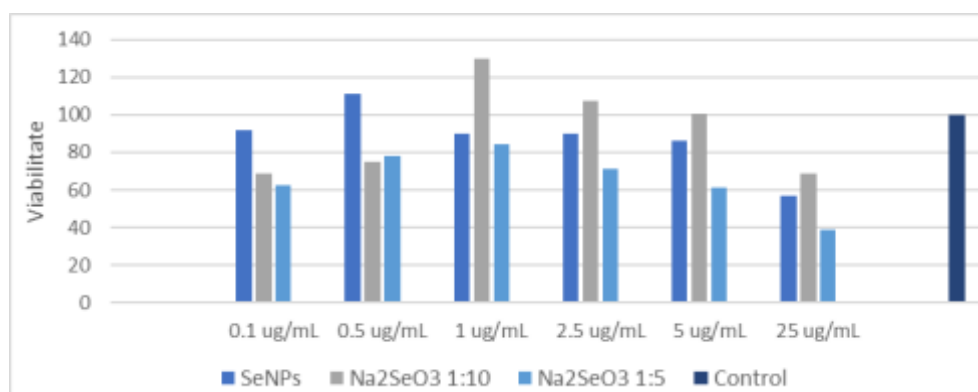


Fig.9.17. Analiza viabilității celulelor MRC-5 consecutive tratării cu SeNPs 0,1 - 25 $\mu\text{g/mL}$ sau cu Na_2SeO_3 cu Se la 1/10, respectiv 1/5 față de SeNPs corespunzătoare

9.3.7 Dozarea speciilor reactive de oxigen generate intracelular, după expunerea celulelor la mediu hiperglicemic și tratarea cu SeNPs și Na₂SeO₃

Celulele tratate cu SeNPs manifestă o creștere a nivelului de ROS față de control, însă în intervalul de concentrații 1 – 25 μg/mL, valorile absorbanțelor variază în limite foarte strânse (42,2; 43,01; 43,49 respectiv pentru 1 μg/mL, 5 μg/mL și 25 μg/mL) (Fig.9.18.). Se constată practic o fază de platou, ceea ce semnifică faptul că generarea de ROS indusă celulelor este limitată în cazul SeNPs, cel puțin în intervalul de concentrații testat.

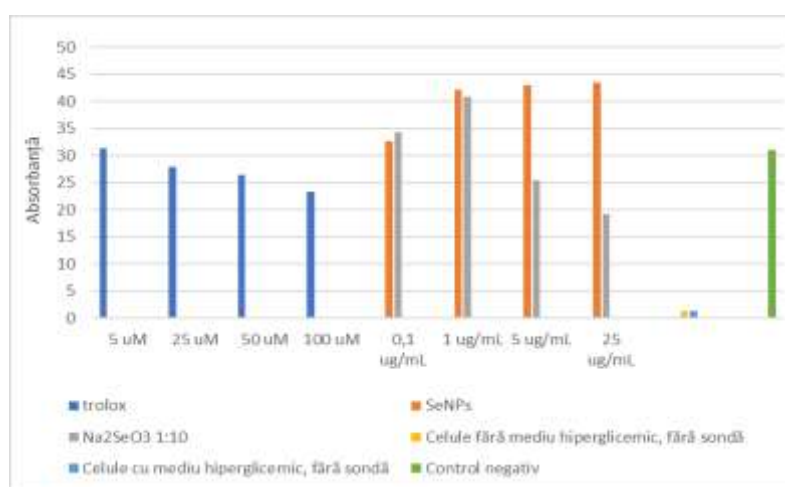


Fig.9.18. Testul ROS cu DCFDA - celule expuse mediului hiperglicemic și tratate cu SeNPs, respectiv cu Na₂SeO₃ cu Se la 1/10, respectiv 1/5 față de SeNPs

9.4 Concluzii

Citotoxicitatea este similară pentru toate concentrațiile de SeNPs testate, cu o ușoară tendință de variație invers proporțională cu doza utilizată, fără însă a se înregistra diferențe semnificative între efectul toxic indus de diferitele concentrații testate. Indiferent de doza la care au fost supuse celulele canceroase, SeNPs au indus o citotoxicitate de circa 80% în intervalul de concentrații 2,5-75 μg/mL. Metabolismul mitocondrial al celulelor canceroase este profund perturbat sub acțiunea SeNPs. Comparativ, viabilitatea celulelor canceroase PANC-1 și metabolismul lor mitocondrial au fost profund afectate și de selenitul de sodiu conținând seleniu în concentrații de 0,25-0,5 μg/mL.

Metabolismul celulelor normale (fibroblaste MRC-5) este puțin influențat de SeNPs. Efectele induse sunt similare pentru SeNPs 2,5-25 $\mu\text{g/mL}$ și selenitul de sodiu testat în concentrații în seleniu de 10 ori mai mici (0,25-2,5 $\mu\text{g/mL}$). De asemenea, metabolismul mitocondrial normal al fibroblastelor pulmonare nu este modificat de SeNPs în intervalul 0,1-5 $\mu\text{g/mL}$. La concentrații de 25 $\mu\text{g/mL}$, se înregistrează o reducere a viabilității celulare.

Concluzii generale

Am investigat degradarea *in vitro* a BSA și HSA printr-o metodă spectrofotometrică. Etapele asupra cărora am intervenit au fost: reducerea numărului spălărilor intermediare succesive cu amestecul acetat de etil/etanol (1:1) de la trei la două, respectiv scurtarea timpului de solubilizare cu soluție de guanidină clorhidrică, de la 12 ore la 1 oră. Rezultatele pe HSA au fost aceleași ca în cazul BSA, cea mai intensă carbonilare fiind obținută prin oxidarea *in vitro* cu sistemul clorură ferică/ascorbat de sodiu.

Am dezvoltat o nouă metodă de electroforeză capilară cu detecție DAD de evaluare a proteinelor carbonilate în diferite probe. Condițiile electroforetice stabilite sunt: coloană capilară cu diametru intern de 75 μm , tampon borat 20 mM, injectarea în sistem hidrodinamic, la 0.5 psi timp de 10 secunde, fiind aplicată o tensiune de 25 kV. Noua metodă de CE-DAD dezvoltată a confirmat existența unui amestec complex de 19 proteine carbonilate derivate cu DNPH, consecutiv oxidării HSA. Derivații separați au migrat în mai puțin de 35 de minute, dovedind mase moleculare mici sau medii ale acestora. Compararea electroforegramelor corespunzătoare serurilor de pacienți cu DZ2 cu cele ale HSA degradat *in vitro* a condus la observația conform căreia cinci derivați cu DNPH au timpi de migrare similari. Am testat ulterior prin metoda de electroforeză capilară probe de la 17 pacienți diagnosticați cu DZ2 conform criteriilor ADA. Am dedus că procesul de carbonilare, în DZ2, decurge cel mai adesea la nivelul fracțiilor proteice cu mase mici. Acest lucru poate sugera o dinamică specifică a fragmentării. O ipoteză poate fi faptul că, în momentul în care speciile reactive de oxigen acționează asupra proteinelor, mai întâi are loc carbonilarea, și abia ulterior oxidarea conduce la liza lanțului proteic, cu scăderea masei moleculare, dar menținerea relativ constantă a numărului de specii carbonilate.

Analiza repetată prin electroforeză pe gel a proteinelor carbonilate și derivatizate analog metodelor descrise anterior a condus la adaptarea metodei, folosind ulterior aceleași concentrații de BSA și HSA, carbonilate în aceleași condiții, dar netransformate în

hidrazone. Metoda astfel adaptată a fost aplicată pe probe de ser uman provenite de la pacienți cu DZ2. După identificarea GM ale fracțiilor separate, cu ajutorul tehnicilor de statistică și *data mining*, s-a stabilit un profil de fragmentare al proteinelor din serul pacienților cu DZ 2. S-a observat că proteinele cu GM mică se fragmentează cel mai tare, într-un mediu oxidant. Totodată, proteinele sunt mai susceptibile la fragmentare atunci când se află în concentrație mai mică în mediul din care sunt dozate.

Polimedicația constituie un factor ce poate determina scăderea aderenței la terapia antidiabetică, și deci controlul glicemiei și ai celorlalți parametri asociați acestei maladii. Aderența redusă s-a tradus prin omiterea administrării sau nerespectarea momentului din zi când se administrează antidiabeticul oral sau insulina, dar și prin renunțarea la terapia specifică antidiabetică atunci când simptomatologia s-a ameliorat, fenomene ce cresc nivelul stresului oxidativ din organism.

Pornind de la proprietatea antioxidantă, dar și de la alte caracteristici benefice terapeutice ale SeNPs, am procedat la sintetizarea lor. Proba de SeNPs obținută a fost caracterizată prin intermediul unor tehnici de microscopie avansată de tip AFM și SEM. Conform histogramei, acestea se află majoritar (mai mult de 80%) în intervalul 50-100 nm.

Am realizat câteva cercetări *in vitro*, pe două tipuri de celule, tratate cu SeNPs. Citotoxicitatea este similară pentru toate concentrațiile de SeNPs testate, cu o ușoară tendință de variație invers proporțională cu doza utilizată, fără însă a se înregistra diferențe semnificative între efectul toxic indus de diferitele concentrații testate. Indiferent de doza la care au fost supuse celulele canceroase, SeNPs au indus o citotoxicitate de circa 80% în intervalul de concentrații 2,5-75 $\mu\text{g/mL}$. Metabolismul mitocondrial al celulelor canceroase este profund perturbat sub acțiunea SeNPs. Astfel, tratarea celulelor canceroase PANC-1 cu SeNPs determină reducerea viabilității celulare, producând afectarea respirației celulare, într-o manieră dependentă de doză, în intervalul 2,5-75 $\mu\text{g/mL}$. Același tip de efect dependent de doză se observă și prin extinderea domeniului de concentrații până la 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Metabolismul celulelor normale (fibroblaste MRC-5) este puțin influențat de SeNPs. Astfel, SeNPs în intervalul de concentrații 0,1-25 $\mu\text{g/mL}$ induce citotoxicitate comparabilă cu controlul negativ reprezentat de celule netratate, deci nu modifică viabilitatea celulară. Efectele induse sunt similare pentru SeNPs 2,5-25 $\mu\text{g/mL}$ și selenitul de sodiu testat în concentrații în seleniu de 10 ori mai mici (0,25-2,5 $\mu\text{g/mL}$). De asemenea, metabolismul mitocondrial normal al fibroblastelor pulmonare nu este modificat de SeNPs în intervalul 0,1-5 $\mu\text{g/mL}$. La concentrații de 25 $\mu\text{g/mL}$, se înregistrează o reducere a viabilității celulare.

Bibliografie selectivă

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1-2), pp.23-38

Dima, E.I. (2014). Spectrophotometric assay of oxidative protein degradation in human plasma, prezentat la International Congress “Medespera”, 5th Edition, Chişinău, 14-16 mai 2014

Dima, E.I., Purdel, N.C. (2016), *Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences*, cap.1: Insights in the capillary electrophoresis of proteins, pp. 7-18, Transilvania University Press, Brasov, 2016, ISBN 978-606-19-1768-7

Dima, I., Purdel, C., Margina, D., Gradinaru, D., Danciulescu Miulescu, R., Ilie, M. (2015). Comparative assessment of protein carbonyls in vitro and in vivo in samples from patients with type 2 diabetes. *Interdisciplinary Approaches In Diabetic Chronic Kidney Disease*, pp.166-175, Editura Niculescu Bucureşti, pentru 1st International Conference on Interdisciplinary Management of Diabetes Mellitus and its Complications (INTERDIAB) Bucharest, ROMANIA

Ilie, M. and Margina, D. (2012). Trends in the Evaluation of Lipid Peroxidation Processes. *Lipid Peroxidation*, [online] pp.111-130.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, pp.464–478.

Purdel, C., **Dima, I.**, Margina, D., Gradinaru, D., Ilie, M. (2015). Investigation of the Carbonylation Process of Protein Induced “in vitro” by Different Hydroxyl Radical Generating Systems. *Rev. Chim.*, 66(3), pp.320-323.

Purdel, N. C., **Dima, I.**, Margina, D., Gradinaru, D., Ilie, M. (2014). Comparative assessment of protein carbonyls in biological samples, poster prezentat la 50-th Congress of the European Societies of Toxicology, Eurotox 2014, Edinburgh, UK, rezumat publicat în *Toxicology Letters* 229, S97-S98

Purdel, N.C., **Dima, I.**, Margina, D., Gradinaru, D. and Ilie, M., (2014). Current methods used in the protein carbonyl assay. *Annual Research & Review in Biology*, 4(12), pp.2015-2026.

Lista lucrărilor științifice elaborate în cadrul studiilor de doctorat

A. Cărți și capitole în cărți:

1. **Dima E.I.**, Purdel C.N., Insights in the Capillary Electrophoresis of Proteins, in Biophysics for Biomedical and Environmental Sciences, Florescu M. (Ed.), 2016, Transilvania University Press, Brasov, 7-18

B. Lucrări indexate ISI/BDI:

1. **Adam-Dima, E.I.**, Ilie, M., Purdel, C. (2018). Premises for the therapeutic use of selenium nanoparticles in oxidative stress-associated diseases. Romanian Journal of Materials, 48 (3), pp.290 – 300. Factor de impact: 0,661. <http://solacolu.chim.upb.ro/p290-300.pdf>
2. **Dima, I.**, Firulescu, S., Purdel C.N., Margină D., Ilie M., Lupuliasa D. (2016). Drug Interactions in Critical Patient with Multiple Pathology and Polymedication in a Surgery Hospital. Pharmacologia, 7(4), pp.223-228. <http://docsdrive.com/pdfs/pharmacologia/2016/223-228.pdf>
3. Văleanu A., Ilie M., **Dima I.**, Purdel C. (2016). K nearest neighbours analysis of human serum carbonyl proteins using capillary electrophoregrams. Romanian Journal of Biophysics, 26(1), pp.1-10. <https://www.rjb.ro/articles/435/art01%20II.pdf>
4. Purdel, C., **Dima, I.**, Margină, D., Grădinaru, D., Ilie, M. (2015). Investigation of the carbonylation process of protein induced “*in vitro*” by different hydroxyl radical generating systems. Revista de Chimie, 66(3), pp.320-333. <http://www.revistadechimie.ro/pdf/PURDEL%20C.pdf%203%2015.pdf>

C. Lucrări indexate ISI/BDI publicate în reviste și volume de conferințe cu referenți (neindexate):

1. **Adam-Dima, E.I.**, Purdel, C., Ilie, M. (2018). Capillary electrophoresis for the evaluation of the carbonylation pattern in type 2 diabetes mellitus. Which are the premises?, „Surgical Crossroads with Diabetes Mellitus”, InterDIAB 2018 Book

Series: International Conference on Interdisciplinary Management of Diabetes Mellitus and its Complications, editori C. Serafinceanu, O. Negoită, V. Elian, Ed. Niculescu, București, ISSN-L 2393-3488, pp. 268-276

2. Văleanu, A., Margină, D.M., Grădinaru, D., Ilie, M., **Dima, I.E.**, Purdel, C.N., Dănciulescu-Miulescu, R. (2016). Diabetic retinopathy and inflammation: a comparative statistical study on relevant blood serum parameters, „Diabetes Mellitus as Cardiovascular Disease”, InterDIAB 2016 Book Series: International Conference on Interdisciplinary Management of Diabetes Mellitus and its Complications, editori C. Serafinceanu, O. Negoită, V. Elian, Ed. Niculescu, București, ISSN-L 2393-3488, pp. 166-175
3. **Dima, I.**, Purdel, C., Margină, D., Grădinaru, D., Dănciulescu-Miulescu. R., Ilie, M. (2015). Comparative assessment of protein carbonyls in vitro and in vivo in samples from patients with type 2 diabetes, „Interdisciplinary Approaches in Diabetic Chronic Kidney Disease”, InterDIAB 2016 Book Series: International Conference on Interdisciplinary Management of Diabetes Mellitus and its Complications, editori C. Serafinceanu, O. Negoită, V. Elian, Ed. Niculescu, București, ISSN-L 2393-3488, pp. 166-175