

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

**Cercetări toxicologice comparative
privind nicotina și cotinina**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. DANIELA GRĂDINARU**

**Student-doctorand:
NUME PRENUME: VLĂDĂU
(CĂS. VLĂSCEANU) ANA-MARIA**

ANUL 2019

CUPRINS

1. INTRODUCERE	1
1.1. Motivarea alegerii temei	1
1.2. Premise și ipoteze de lucru	3
A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
2. ASPECTE GENERALE PRIVIND TUTUNUL ȘI FUMATUL	6
3. NICOTINA – PROFIL TOXICOLOGIC	16
3.1. Structură chimică. Proprietăți fizico-chimice	16
3.2. Toxicocinetica nicotinei	21
3.3. Toxicodinamia nicotinei	29
3.4. Patologii cauzate de fumat	31
3.5. Intoxicația cu nicotină - simptomatologie și tratament	33
4. EFECTE BENEFICE ALE NICOTINEI ȘI COTININEI	39
4.1. Implicațiile nicotinei în neuroprotecție. Mecanisme de acțiune	39
4.2. Nicotina și cotinina - proprietăți psihoactive	45
4.3. Nicotina și cotinina în relație cu stresul oxidativ	48
B. PARTEA EXPERIMENTALĂ. CONTRIBUȚII PERSONALE	50
5. EVALUAREA TOXICITĂȚII NICOTINEI ȘI COTININEI PRIN TESTE <i>IN VITRO</i>	51
5.1. Justificarea experimentelor	51
5.2. Materiale și metode	54
5.3. Rezultate și discuții	57
5.3.1. Screeningul dozei (selectarea concentrației de lucru)	57
5.3.2. Evaluarea potențialului proliferativ	57
5.4. Concluzii	61

6. INVESTIGAREA TOXICITĂȚII NICOTINEI ȘI COTININEI PRIN TESTE PE CELULA VEGETALĂ (testul <i>Triticum</i>, testul <i>Lactuca</i>)	
6.1. Justificarea experimentelor	62
6.2. Evaluarea toxicității nicotinei și cotininei prin testul <i>Triticum</i>	63
6.2.1. Materiale și metode	63
6.2.2. Rezultate și discuții	64
6.3. Evaluarea toxicității nicotinei și cotininei prin testul <i>Lactuca</i>	68
6.3.1. Materiale și metode	69
6.3.2. Rezultate și discuții	70
6.4. Concluzii	75
7. CERCETAREA TOXICITĂȚII NICOTINEI ȘI COTININEI ASUPRA CRUSTACEULUI <i>DAPHNIA MAGNA</i>	76
7.1. Justificarea experimentelor	76
7.2. Stabilirea curbelor concentrație-letalitate	77
7.2.1. Materiale și metode	77
7.2.2. Rezultate și discuții	79
7.3. Evaluarea bioacumulării nicotinei și cotininei de către crustaceul <i>Daphnia magna</i>	83
7.3.1. Materiale și metode	83
7.3.2. Rezultate și discuții	84
7.4. Concluzii	88
8. INVESTIGAREA PROPRIETĂȚILOR PSIHOACTIVE ALE NICOTINEI ȘI COTININEI PRIN STUDII <i>IN VIVO</i> LA ȘOARECE	89
8.1. Justificarea experimentelor	89
8.2. Materiale și metode	90
8.3. Rezultate și discuții	93
8.4. Concluzii	111

9. EVALUAREA INFLUENȚEI FUMATULUI ASUPRA STATUSULUI ANTIOXIDANT LA PACIENȚI CU PATOLOGIE PSIHIATRICĂ	112
9.1. Justificarea experimentelor	112
9.2. Materiale și metode	114
9.3. Rezultate și discuții	121
9.4. Concluzii	126
10. STUDII DE TOXICOLOGIE ANALITICĂ	127
10.1. Metodă HPTLC pentru analiza simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice	127
10.1.1. Justificarea experimentelor	127
10.1.2. Materiale și metode	130
10.1.3. Rezultate și discuții	137
10.2. Metodă HPLC pentru analiza simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice	139
10.2.1. Justificarea experimentelor	139
10.2.2. Materiale și metode	140
10.2.3. Rezultate și discuții	141
10.3. Analiza nicotinei și cotininei în plasmă la pacienți cu patologie psihiatrică	155
10.3.1. Justificarea experimentelor	155
10.3.2. Materiale și metode	157
10.3.3. Rezultate și discuții	158
10.4. Concluzii	169
11. CONCLUZII GENERALE	172
BIBLIOGRAFIE	178
ANEXE	194

1. INTRODUCERE

1.1. Motivarea alegerii temei

Fumatul și alte forme de consum al tutunului și nicotinei, având dimensiuni epidemice, reprezintă una dintre cele mai mari amenințări pentru sănătatea publică, ucigând mai mult de 8 milioane de oameni pe an. Mai mult de 7 milioane de decese sunt rezultatul utilizării directe a tutunului, în timp ce aproximativ 1,2 milioane de decese sunt rezultatul expunerii nefumătorilor la fumul de tutun (OMS, 2017).

Se apreciază că nu există un nivel sigur de expunere în cazul fumatului pasiv. S-a arătat că, la adulți, fumatul pasiv provoacă boli cardiovasculare și respiratorii grave, incluzând boală coronariană și cancer pulmonar. La copii, fumatul pasiv crește riscul apariției sindromului de deces brusc la sugari, iar la femeile gravide, provoacă complicații ale sarcinii și greutate mică la naștere a nou-născutului. Aproape jumătate dintre copii respiră în mod obișnuit aerul poluat de fumul de tutun în locurile publice. Fumatul pasiv se consideră că provoacă peste 1,2 milioane de decese premature pe an și 65 000 de copii mor anual din cauza bolilor determinate de expunerea la fumul de tutun.

În prezent, sunt disponibile o multitudine de studii epidemiologice și statistice referitoare la fumat, pe baza cărora s-a formulat concluzia că nicotinismul (tabagismul) constituie, indiscutabil, unul din factorii favorizanți sau agravanți pentru numeroase boli. Fumul de tutun poate fi considerat ca un agent lezional direct și eficient, care are rolul de vector al substanțelor chimice nocive care alterează, cu timpul, dinamica celulară și provoacă diverse patologii.

Cercetările focalizate asupra compusului major din frunzele de tutun, nicotina, nu numai că au relevat multe dintre efectele acestui alcaloid asupra sistemul nervos, dar au contribuit în mod esențial la înțelegerea caracterul complex și dinamic al neurotransmisiei colinergice (Papke, 2014). De fapt, beneficiind de peste 100 de ani de interes științific, nicotinei i-au fost atribuite multe dintre efectele observate în cazul consumului de tutun, atât benefice, cât și nocive, cu excepția carcinogenității determinată de nitrozamina specifică tutunului. Totuși, relativ recent, atenția științifică a început să se extindă de la nicotină la metabolitul ei principal, cotinina, rezultat prin oxidare pe calea citocromului P450. Astfel, cotinina a s-a dovedit a avea o mare parte din proprietățile terapeutice benefice ale nicotinei evidențiate de curând (de exemplu, acțiunea neuroprotectoare cu implicații pozitive în boala Parkinson și Alzheimer), fără reacțiile adverse, de exemplu cardiovasculare, ale nicotinei și fără risc de dependență.

1.2. Premise și ipoteze de lucru

Având în vedere aspectele prezentate în ”Motivarea alegerii temei”, cercetările prezentei teze au fost concentrate asupra investigării toxicologice comparative a nicotinei și metabolitului ei cotinina. Astfel, obiectivul a fost acela de a aprofunda și a completa profilul toxicologic al cotininei, într-un studiu complex, derulat pornind de la cercetări *in vitro*, pe culturi celulare, continuând cu studii asupra celulei vegetale, apoi asupra nevertebratelor și încheind cu cercetări în experiment animal și respectiv investigații privind corelația fumatului cu stresul oxidativ în studii la pacienți.

În pofida faptului că, într-o serie de cercetări, au fost evidențiate efectele citotoxice ale nicotinei în diferite sisteme experimentale *in vitro*, există date limitate referitoare la efectele citotoxice ale cotininei. În acest sens, ne-am propus să investigăm comparativ efectele citotoxice ale nicotinei și cotininei exercitate *in vitro* asupra celulelor normale, respectiv asupra liniei de fibroblaști MRC-5.

Având în vedere că, materialul vegetal constituie un reactiv mult mai convenabil investigațiilor și uneori este chiar mai sensibil, iar testarea fitobiologică a început să dobândească importanță în paralel cu cercetarea nonlinică, pe animal, am urmărit să cercetăm acțiunea nicotinei și cotininei pe celula vegetală, prin aplicarea testelor *Triticum* și respectiv *Lactuca*).

Cunoscând faptul că, în ultima perioadă s-a demonstrat că utilizarea biotestelor pe nevertebrate prezintă un grad mare de corelație cu toxicitatea acută *in vivo*, fiind, în același timp predictiv pentru citotoxicitatea asupra culturilor de celule umane, am recurs la biotestul care utilizează crustaceul *Daphnia magna* pentru a cerceta comparativ toxicitatea nicotinei și cotininei asupra acestui nevertebrat. Modelul experimental care utilizează *D. magna* reprezintă, de asemenea, un test pentru evaluarea toxicității în studiile de ecotoxicologie.

Considerând numeroasele cercetări ale ultimelor decenii, care sugerează proprietăți psihoactive ale nicotinei și cotininei la om și la animale, ne-am propus să cercetăm profilul efectelor psihotrope ale cotininei, comparativ cu nicotina, în experiment acut și subacut la șoarece.

Date din literatura recentă asociază tot mai frecvent fumatul cu stresul oxidativ și subliniază implicarea speciilor reactive de oxigen generate în urma fumatului, în declanșarea unui număr mare de procese patologice. În acest context, am urmărit să evaluăm impactul consumului de tutun asupra unor biomarkeri de stres oxidativ, evaluați la nivel sistemic, precum

și corelația acestora cu nivelul plasmatic de cotinină, biomarkerul pentru fumat, la un lot de pacienți cu boli psihice.

Având în vedere că, modificarea structurală apărută în urma oxidării nicotinei la cotinină conduce la două structuri relativ asemănătoare, dar cu un comportament analitic destul de diferit (ca urmare a creșterii polarității, prin oxidare), am considerat important ca o parte a cercetărilor să o dedicăm dezvoltării de metode analitice pentru analiza simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice. Am avut în vedere atât metode simple și mai puțin costisitoare (precum cromatografia în strat subțire, cu utilitate ca metodă de screening în cazuri de intoxicații acute), cât și metode performante, precum HPLC-DAD și LC-MS. Utilizând metode de acest tip, ne-am propus, pe de o parte să evaluăm bioacumularea nicotinei și cotininei de către *D.magna* și, pe de altă parte să determinăm nivelurile plasmatice de nicotină și cotinină, precum și raportul acestora și eventuala influență a medicației administrate, la un lot de pacienți cu patologie psihiatrică, cunoscând faptul că fumatul intens este bine documentat în rândul pacienților cu tulburări mintale.

Având în vedere toxicitatea nicotinei și nocivitatea în ansamblu a fumatului asupra organismului, precum și evidențierea, în ultimii ani a unor noi direcții de acțiune ale nicotinei, cu rol în neuroprotecție și cu eficacitate în bolile neurodegenerative, tutunul și nicotina se mențin în atenția cercetătorilor. Mai mult, cercetările sunt în prezent îndreptate și spre definirea profilului toxicologic al cotininei, principalul metabolit al nicotinei, care și-a conturat utilitatea ca biomarker de expunere pentru fumat, inclusiv pentru cel pasiv. Datele privind mecanismele de acțiune și toxicitatea cotininei sunt, în prezent, controversate. Au fost relevate importante proprietăți psihoactive ale cotininei (de exemplu, antidepressive și anxiolitice) și, pe baza cercetărilor preclinice, au fost propuse roluri în îmbunătățirea abilităților cognitive.

A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

2. Aspecte generale privind tutunul și fumatul

La nivel mondial, consumul de tutun ucide anual aproximativ 6 milioane de oameni, din care 600 de mii sunt nefumători, expuși fumatului pasiv. Estimarea este că, până în 2030, consumul de tutun va determina direct sau indirect mai mult de 8 milioane de decese în fiecare an, iar mai mult de 80% dintre acestea vor fi înregistrate în țările slab dezvoltate.

3. Nicotina – profil toxicologic

3.1. Structură chimică. Proprietăți fizico-chimice

Molecula nicotinei este alcătuită dintr-un nucleu piridinic legat de un nucleu pirolidinic. Tutunul conține și alte tipuri de alcaloizi cu structuri asemănătoare– anabazină, nornicotină, nicotirină, anatabină, nicotelină – dar fiindcă se găsesc în cantități mici, au importanță toxicologică scăzută (Baconi, 2008).

3.2. Toxicocinetica nicotinei

Datorită volatilității și caracteristicilor sale de liposolubilitate și hidrosolubilitate, nicotina pătrunde în organism pe toate căile: respiratorie, cutanată, digestivă. La nivelul mucoasei bucale se absoarbe instantaneu, în timp ce la nivel gastric se absoarbe mai greu, deoarece în urma ingestiei are efect iritativ, provocând greață și prin mecanism central (nu numai iritativ), cu eliminarea unei părți considerabile din cantitatea ingerată. Absorbția cutanată este, de cele mai multe ori, mai rapidă pentru alcaloidul liber, decât pentru sărurile sale cu acizii. Se distribuția în sânge este rapidă, traversând bariera hematoencefalică (Lupușoru, 2010).

La nivel pulmonar (principala cale de pătrundere) nicotina se absoarbe rapid, cu o viteză similară celei i.v. Difuzează și se localizează în toate țesuturile, dar mai ales la nivel pulmonar, hepatic și renal; 80-90% din nicotina absorbită se biotransformă (Figura 3.5.) la aceste niveluri, (predominant în ficat) (Baconi, 2008).

3.3. Toxicodinamia nicotinei

Nicotina este o substanță cu acțiune simpatomimetică ce stimulează eliberarea de catecolamine, crește debitul cardiac, are acțiune vasoconstrictoare la nivelul vaselor de sangvine, cu creșterea tensiunii arteriale, scade sensibilitatea la insulină cu agravarea sau precipitarea diabetului. Aceste efecte ale nicotinei la nivel cardiovascular ar putea, teoretic, să promoveze aterogeneza și să agraveze unele afecțiuni ischemice acute în cazul subiecților ce suferă de boală coronariană (Eliasson, 2003).

Nicotina nu este un agent cancerigen direct, dar poate fi un promotor al tumorii.

3.4. Patologii cauzate de fumat

Fumatul este răspunzător de apariția bolilor la nivel vascular coronar și periferic, pulmonar, gastric, reproducător.

Nicotina poate contribui la boala asociată tutunului, dar nu s-a stabilit o relație cauzală deoarece nicotina este preluată simultan cu o multitudine de alte substanțe cu potențial nociv existente în fumul de tutun.

3.5. Intoxicația cu nicotină – simptomatologie și tratament

Simptomele intoxicației acute apar brusc și se caracterizează prin: greață, vărsături, diaree însoțită de dureri abdominale, astenie, contracții musculare involuntare, transpirații, tahicardie.

Intoxicația acută nu are antidot. Moartea survine prin stop respirator.

Intoxicația cronică (tabagism, nicotinism) este asociată cu fumatul. Principalele organe afectate sunt plămânii, inima și vasele de sânge. Efectele care apar imediat sunt creșterea frecvenței cardiace și a tensiunii arteriale, iar în timp poate să apară cancerul pulmonar și alte afecțiuni.

Există o serie de forme farmaceutice (plasture, spray, gumă de mestecat, comprimat) utilizate în tratamentul dependenței de tutun cu scopul de a satifa nevoile pacienților și de a putea folosi produsul potrivit în funcție de mecanismul de cedare al substanței active.

Cu ajutorul farmacoterapiei se tratează dependența de tutun și sindromul de abstenență care se manifestă prin anxietate, furie, dificultăți de concentrare, tulburări de somn și creștere în greutate (Huges, 1986).

4. Efecte benefice ale nicotinei și cotininei

4.1. Implicațiile nicotinei în neuroprotecție. Mecanisme de acțiune

Recent, două afecțiuni neurologice au fost studiate în ceea ce privește relația cu fumatul: boala Parkinson și maladia Alzheimer. Riscul raportat de apariție a maladiei Alzheimer sau a bolii Parkinson este la nefumatori în general de aproximativ două ori mai mare decât al fumătorilor. Din punct de vedere statistic această asociere negativă a fost interpretată ca efect neuroprotector al nicotinei împotriva dezvoltării maladiei Alzheimer și a bolii Parkinson. Ipoteza este că fumatul ar putea exercita o influență biologică, neuroprotectivă împotriva neurodegenerării (Almeida OP, 2002).

4.2. Nicotina și cotinina – proprietăți psihoactive

Deși sunt o serie de componente ale tutunului, pe lângă nicotină, care pot contribui la proprietățile adictive ale țigărilor, cercetarea privind dependența de tutun s-a axat în pe efectele de reîntărire ale nicotinei.

Stimularea nAChR-lor centrali de către nicotină are ca rezultat eliberarea unei varietăți de neurotransmițători în creier, cel mai important dintre aceștia fiind dopamina. Nicotina provoacă eliberarea de dopamina în zona mezolimbică, striatum și cortexul frontal. O importanță deosebită este atribuită neuronilor dopaminergici din zona tegmentală ventrală a creierului mijlociu și eliberării dopaminei la nivelul învelișului exterior al nucleului accumbens, deoarece această cale pare să stea la baza activării circuitului de recompensă indus de droguri (Dani J.A., 2001).

4.3. Nicotina și cotinina în relație cu stresul oxidativ

Menținerea unui echilibru între oxidanți și antioxidanți este o provocare pentru oricine în condițiile actuale de mediu, extrem de virulente și care ar putea produce o modificare a echilibrului prin acumularea de specii reactive de oxigen (ROS), care generează în continuare "stres oxidativ".

ROS rezultă dintr-o serie de surse endogene și exogene, cum ar fi procesele inflamatorii, radiațiile, fumatul, etc și se crede că acestea sunt cauza principală pentru apariția a numeroase afecțiuni (Halliwell B, 1999).

B. PARTEA EXPERIMENTALĂ. CONTRIBUȚII PERSONALE

5. Evaluarea toxicității nicotinei și cotininei prin teste *in vitro*

5.1. Justificarea experimentelor

Ne-am propus investigarea efectelor *in vitro* ale nicotinei și cotininei asupra culturii de celule MRC-5. Aceasta este o cultură de celule umane diploide compusă din fibroblaste derivate din țesutul plămânului normal recoltate de la un fetus masculin de 14 săptămâni.

5.2. Materiale și metode

1. Modelul celular *in vitro* : Experimentele au fost realizate pe linia celulară continuă de fibroblaste pulmonare umane MRC-5 (ATCC – American Type Culture Collection).

2. Testul MTT: Citotoxicitatea a fost determinată prin testul spectrofotometric cantitativ, MTT (Sigma-Aldrich, cod M5655).

5.3. Rezultate și discuții

5.3.1. Screeningul dozei (selectarea concentrației de lucru)

Screeningul concentrației pentru nicotină a arătat că, folosirea concentrației de 2 mM scade viabilitatea celulelor cu mai mult de 50% față de controlul netratat, iar tratamentul cu concentrații mai mici sau egale cu 750 μ M nu induce modificări ale viabilității celulare (Figura 5.4.). Viabilitatea culturii de fibroblaste pulmonare MRC-5 nu a fost afectată de tratamentul cu nicotină în concentrație de 1 μ M – 750 μ M. În consecință, în urma screeningului de doză, **concentrația de nicotină de 1 mM** în mediu de cultură a fost selectată pentru un studiul ulterior de evaluare a proliferării celulare.

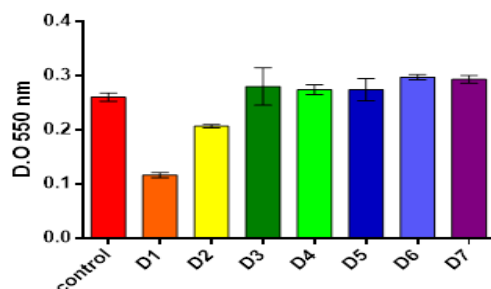


Figura 5.4. Viabilitatea celulelor MRC-5 tratate *in vitro* cu nicotină, timp de 24 ore (D1 = 2 mM, D2 = 1 mM, D3 = 750 µM, D4 = 500 µM, D5 = 100 µM, D6 = 10 µM și D7 = 1 µM în mediu de cultură)

Viabilitatea celulelor tratate cu cotinină nu a fost afectată într-un domeniu de concentrații de 1µM – 1 mM (Figura 5.4). S-a dovedit că, cotinina e mai puțin toxică decât nicotina pe celule MRC-5. Screeningul dozei pentru cotinină arată că, folosirea unei doze mai mici sau egală cu 1 mM nu produce modificări ale viabilității celulare. În consecință, în urma screeningului de doză, **concentrația de cotinină de 2 mM** în mediu de cultură a fost selectată pentru un studiul ulterior de evaluare a proliferării celulare.

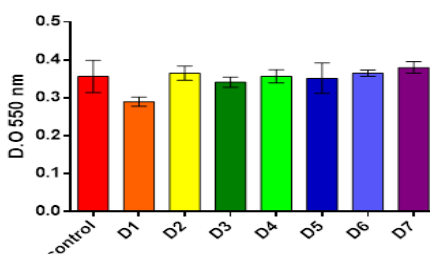


Figura 5.5. Viabilitatea celulelor MRC-5 tratate *in vitro* cu cotinină, timp de 24 ore (D1 = 2 mM, D2 = 1 mM, D3 = 750 µM, D4 = 500 µM, D5 = 100 µM, D6 = 10 µM și D7 = 1 µM în mediu de cultură)

5.3.2. Evaluarea potențialului proliferativ

Evaluarea potențialului proliferativ a arătat că, celulele MRC-5 netratate proliferază statistic semnificativ ($p < 0.0001$) în cultură, timp de 48 de ore (Figura 5.6.). O dată expuse tratamentului cu nicotină 1 mM, potențialul proliferativ al celulelor MRC-5 este inhibat, însă nu au fost detectate modificări statistic semnificative între viabilitatea celulelor tratate cu 1 mM

nicotină timp de 24 sau 48 de ore. În ceea ce privește tratamentul cu cotinină în concentrație de 2 mM, potențialul proliferativ al celulelor MRC-5 este inhibat în comparație cu cele control, netratate, dar au fost evidențiate diferențe statistic semnificative ($p < 0.05$) între viabilitatea celulelor tratate cu cotinină timp de 24 sau 48 de ore (Figura 5.6).

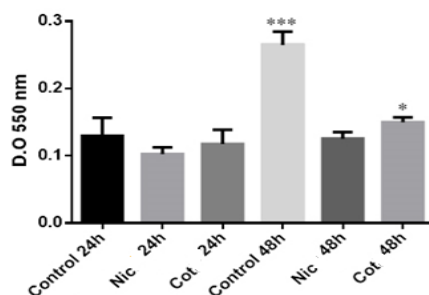


Figura 5.6. Potențialul proliferativ al celulelor MRC-5 timp de 24 și 48 de ore tratate cu nicotină 1 mM și cotinină 2mM (Nic = Nicotină; Cot= Cotinină)

(*** $p < 0.0001$ control 48h versus control 24h; * $p < 0.05$ cotinină 48h versus cotinină 24h)

Rezultatele au arătat că celulele MRC-5 tratate cu nicotină 1mM nu proliferază după 48 de ore de tratare, spre deosebire de cele tratate cu cotinină 2 mM, care mențin un potențial proliferativ și după 48 de ore de tratament.

Discuții

Prezentul studiul actual a avut ca obiectiv evaluarea toxicității nicotinei și a metabolitului său cotinina pe celule pulmonare umane normale MRC-5.

Rezultatele studiului nostru indică faptul că, la concentrații mari (2 mM), nicotina produce moartea celulelor MRC-5 (aproximativ 50% din cultura de celule). Rezultate similare au fost raportate în experimente pe cultura de celule alveolare (A549). S-a demonstrat că nicotina exercită efecte dependente de concentrație asupra celulelor pulmonare A 549, iar concentrațiile începând cu 4mM au un efect toxic semnificativ asupra viabilității celulelor (Liu, 2017).

Cotinina a fost mai puțin toxică decât nicotina pe cultura de celule MRC-5. Rezultatele indică faptul că, celulele MRC-5 tratate cu 1mM nicotină nu mai proliferază după 48 de ore de tratament, spre deosebire de cele tratate cu cotinină 2mM care mențin un slab potențial proliferative dacă sunt tratate timp de 48 ore.

6. Investigarea toxicității nicotinei și cotininei pe celula vegetală (testul *Triticum*, testul *Lactuca*)

6.1. Justificarea experimentelor

Investigarea efectelor nicotinei și cotininei asupra proliferării fibroblaștilor umani normali MRC-5 a evidențiat efecte inhibitoare ale acestor compuși la nivelul proliferării celulare, în funcție de concentrație și de timpul de expunere. Aceste rezultate ne-au sugerat evaluarea comparativă a efectelor nicotinei și cotininei și asupra celulei vegetale.

6.2. Evaluarea toxicității nicotinei și cotininei prin testul *Triticum*

Principiul metodei constă în determinarea diluției active maxime (concentrației minime) a substanței studiate care, în funcție de durata de acțiune, influențează alungirea radiculară și filmul cariokinetic.

6.2.1. Materiale și metode

Protocolul experimental aplicat este cel descris de Constantinescu și colab. (1963), modificat (Popescu, 2008; Olaru, 2013; Socea, 2017; Drăgoi, 2018). Modificările se referă la determinarea inhibării, și nu a stimulării creșterii radiculare (ca în metoda originală) și la utilizarea unei tehnici moderne de achiziție și prelucrare a imaginii, precum și la pregătirea materialului biologic.

Protocolul experimental

Am testat acțiunea nicotinei și cotininei în domeniul de concentrații 0,1 - 100 μ M. Am testat câte 7 concentrații din cele două substanțe.

6.2.2. Rezultate și discuții

Conform valorilor $E_{fi}\%$ se observă că atât nicotina cât și cotinina nu au indus o inhibiție mai mare de 33% comparativ cu lotul martor. De asemenea, efectele inhibitorii/efectul stimulator obținute nu sunt semnificative din punct de vedere statistic la analiza prin testul Kruskal-Wallis urmat de testul Dunn. La nicotină se observă o ușoară semnificație statistică la analiza globală a datelor, aceasta nemaifiind confirmată la aplicarea post-testului Dunn.

Având în vedere rezultatele obținute, nu s-au putut calcula CI_{50} pentru nicotină și cotinină.

Nicotina și cotinina nu induc efecte de inhibiție sau de stimulare semnificative asupra dezvoltării radiculei de *Triticum vulgare* la concentrațiile testate. Rezultatele obținute ne permit

să afirmăm că acest test fitobiologic nu poate fi aplicat cu succes pentru identificarea unor efecte toxice ale celor două substanțe asupra celulei vegetale la concentrații $\leq 100 \mu\text{M}$.

6.3. Evaluarea toxicității nicotinei și cotininei prin testul *Lactuca*

Testul fitobiologic *Lactuca sativa* reprezintă o metodă simplă, rapidă, reproductibilă și cu costuri reduse (Lopez, 2008) folosită în general pentru evaluarea toxicității în ecotoxicologie (Sánchez-Meza, 2007), precum și în screeningul toxicității compușilor naturali și a extractelor vegetale (Diaz, 2013).

Principiul metodei constă în determinarea diluției maxime active a substanței de cercetat care influențează alungirea radiculară (Lopez, 2008).

Toxicitatea reflectată prin determinarea concentrației medii inhibitoare (CI_{50}), indicator al toxicității, dar și al activității biologice (Mazoir, 2008; Șeremet, 2014).

6.3.1. Materiale și metode

Material biologic: rădăcinile embrionare de *Lactuca sativa* L. (*Asteraceae*) cultură ecologică 2013, provenit din județul Teleorman.

Substanțe de testat: (-)-nicotină ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) și (-)-cotinină ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich)

6.3.2. Rezultate și discuții

Rezultatele obținute variază în limite mult mai largi comparativ cu testul *Triticum*.

Valorile $\text{Ef}\%$ sunt prezentate în tabelul nr. VI.6. Atât nicotina cât și cotinina au indus o inhibiție mai mare de 70% comparativ cu lotul martor la concentrații $\geq 25 \mu\text{M}$; din punct de vedere statistic, acestea sunt semnificative (post-testul Dunn). Sub această concentrație, nicotina a continuat să inducă un efect inhibitor, inclusiv la concentrația cea mai mică. Cotinina la concentrații mai mici de $25 \mu\text{M}$ a indus o inhibiție mult mai mică comparativ cu nicotina, iar la concentrații $\leq 1 \mu\text{M}$ a indus o stimulare a alungirii radiculare, efect care însă nu a fost validat statistic (post-testul Dunn). Totuși, se constată că efectul stimulator este invers proporțional cu concentrația de cotinină, acesta fiind asemănător cu comportamentul fitohormonilor de tip

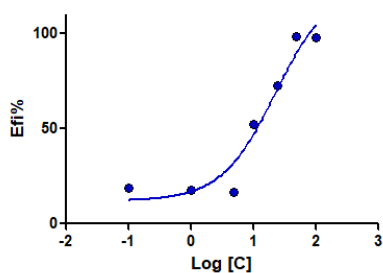
auxine. Analiza statistică globală a datelor prin intermediul testului Kruskal-Wallis a evidențiat atât pentru nicotină, cât și pentru cotinină un efect semnificativ statistic.

Având în vedere rezultatele obținute, s-au calculat valorile CI_{50} . Astfel, pentru nicotină s-a obținut o valoare de 22,5 μM , cu un $IC_{95\%}$ de 4,676 la 108,3 μM și un coeficient de corelare efect-concentrație logaritmată r^2 de 0,9465. Pentru cotinină s-a calculat o valoare CI_{50} de 5,05 μM , cu un $IC_{95\%}$ de 0,6699 – 2,035 0,9884 la 30,64 μM și un coeficient de corelare efect-concentrație logaritmată de 0,9729. Curbele de inhibiție sunt redată în figura 6.3. Din rezultatele obținute se observă că, pe domeniul de concentrație 0,1 – 100 μM , nicotina are un efect inhibitor, iar cotinina efect bisens funcție de concentrație. Alungirea radiculară la *Lactuca sativa* este mult mai sensibilă la cotinină, comparativ cu nicotina.

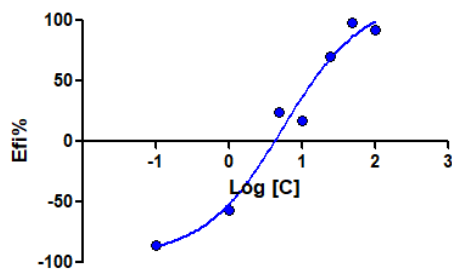
Tabelul VI.6. Efectul inhibitor ($E_{fi\%}$) indus de nicotină (NIC) și cotinină (COT) și semnificația statistică comparativ cu martorul.

Nr. Crt.	Concentrație (μM)	$E_{fi\%}$ (%)		Test/post-test statistic aplicat			
				Kruskal-Wallis		Dunn	
		NIC	COT	NIC	COT	NIC	COT
1	100	98,12	92,43	$p < 0,0001$; ***	$p < 0,0001$; ***	***	***
2	50	98,38	97,68			***	***
3	25	72,76	70,55			***	**
4	10	52,59	17,04			ns	ns
5	5	16,59	23,85			ns	ns
6	1	17,63	-57,05			ns	ns
7	0.1	18,85	-85,71			ns	ns

ns – nesemnificativ statistic; * = semnificativ statistic; *** = extrem de semnificativ statistic.



a)



b)

Figura 6.3. Curbele de regresie trasate în funcție de $\log[C]$ și Efi% pentru loturile tratate cu nicotină (a) și cotinină (b)

Pe domeniul de concentrație 0,1 – 100 μM nicotina are efect inhibitor, iar cotinina efect bisens funcție de concentrație. Testul *Lactuca sativa* este sensibil la acțiunea biologică a nicotinei și a metabolitului său cotinina.

7. Cercetarea toxicității nicotinei și cotininei asupra crustaceului *Daphnia magna*

7.1. Justificarea experimentelor

În ultimul deceniu s-a sugerat că testele acute pe nevertebrate pot fi utilizate ca metodă de prescreening pentru evaluarea toxicității acute a noilor substanțe chimice asupra mamiferelor și a oamenilor.

Testul *D. magna* este folosit în prezent pentru a evalua modul în care nicotina afectează ritmul cardiac și comportamentul *Daphnia*, în vederea extrapolării rezultatelor la om (Chiu SS, 2007, Villegas-Navarro et al, 2003, Corotto et al, 2010).

Pentru a evalua efectele toxice acute ale cotininei comparativ cu compusul părinte, nicotina, a fost utilizată biotestul *Daphnia magna*.

7.2. Stabilirea curbelor concentrație-letalitate

Principiul metodei constă în expunerea nevertebratelor *Daphnia magna* la concentrații diferite de nicotină și cotinină și evaluarea efectului letal, respectiv a numărului de exemplare care supraviețuiesc după 24 h și 48 h.

7.2.1. Materiale și metode

Loturile de *Daphnia* utilizate în experiment, în vârstă de 7 zile, au fost menținute în condiții controlate de temperatură și iluminare ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclu iluminare de 16 ore lumină și 8 ore întuneric) și hrănite cu *Saccharomyces cerevisiae*.

7.2.2. Rezultate și discuții

Rezultatele în ansamblu indică faptul că nicotina are toxicitate mai mare decât cotinina, deoarece raportul dintre valorile CL_{50} (cotinină / nicotină) după 48 ore de expunere este de aproximativ 5,9. La 48 ore, curbele de letalitate ale ambilor compuși sunt paralele (Figura 7.5.), indicând efecte toxice similare, cu potențe diferite (Vlăsceanu, 2015).

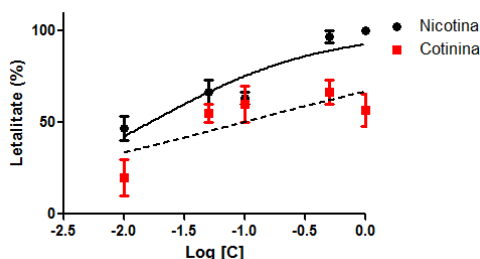


Figura 7.5. Curbele comparative letalitate (%) funcție de logaritmul concentrației, obținute la evaluarea toxicității nicotinei și cotininei asupra *D.magna* (după 48 h de expunere)

7.3. Evaluarea bioacumulării nicotinei și cotininei de către crustaceul *Daphnia magna*

Având în vedere rezultatele obținute la evaluarea toxicității nicotinei și cotininei asupra *Daphnia magna*, ne-am propus să evaluăm cantitatea de toxic acumulată de *Daphnia magna*. În acest scop, daphniile au fost supuse experimentului conform descrierii din capitolul 7.2., iar cantitatea de nicotină și de cotinină bioacumulată a fost determinată printr-o metodă HPLC-DAD, a cărei dezvoltare este prezentată în capitolul 10.2.

7.3.1. Materiale și metode

Substanțe de testat: (-)-Nicotină ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) și (-)-Cotinină ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich)

Prepararea soluțiilor

Se prepară soluții stoc de nicotină și cotinină, de concentrație 10 mM în DMSO. Din acestea, se obțin, după caz, soluții de testat, prin diluare adecvată cu mediu de cultură.

7.3.2. Rezultate și discuții

Rezultatele arată că, după 24 de ore de expunere, dafniile acumulează cantități similare de nicotină și cotinină, dar după 48 de ore de expunere, cantitatea de nicotină acumulată este semnificativ mai mică ($p=0,021$) decât cea de cotinină (Figura 7.6).

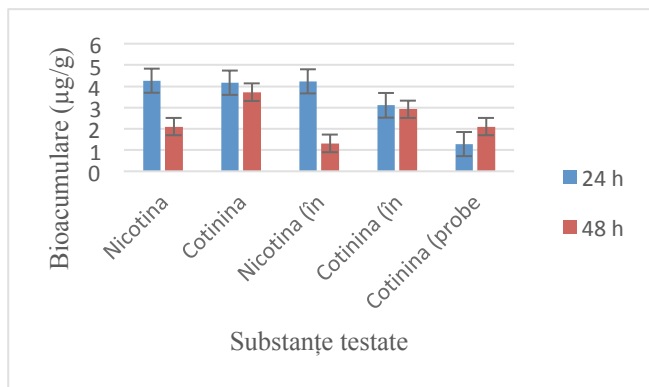


Figura 7.6. Bioacumularea nicotinei și cotininei de către *Daphnia magna* (dafniile au fost expuse la nicotină, cotinină și amestec nicotină + cotinină, timp de 24 de ore și 48 de ore; N= nicotină, C= cotinină)

($p < 0,01$ pentru cotinină/cotinină în probe expuse la nicotină, la 24 h; $p < 0,05$ pentru: cotinină/cotinină în amestecul N+C, la 24 h; nicotină/cotinină, la 48h; nicotină (la 24h)/nicotină (la 48 h)

Rezultatele au indicat prezența cotininei și în probele care au fost expuse doar la nicotină, sugerând biotransformarea nicotinei la cotinină de către crustaceul *D. magna*. Cantitatea de cotinină acumulată după 24 de ore este semnificativ statistic mai mare decât cea determinată în probele expuse doar la nicotină ($p=0,007$), indicând faptul că nicotina se biotransformă parțial în cotinină după 24 de ore.

8. Investigarea proprietăților psihoactive ale nicotinei și cotininei prin studii *in vivo* la șoarece

8.1. Justificarea experimentelor

În ultimele decenii s-a sugerat că atât nicotina, cât și principalul său metabolit, cotinina, au proprietăți psihoactive la om și la animale.

În ciuda asemănării structurale dintre nicotină și cotinină, metabolitul prezintă efecte distincte față de nicotină.

Având în vedere datele de literatură prezentate anterior, scopul acestui studiu a fost de a investiga comparativ efectele antidepresive și anxiolitice ale cotininei și nicotinei la șoarece. Imipramina a fost utilizată ca referință pentru activitatea antidepresivă.

8.2. Materiale și metode

Animale de experiență

În prezentul studiu au fost luați în lucru 40 șoareci masculi NMRI, cu vârsta de câteva săptămâni și masa medie de 30 g, furnizați de biobaza Institutului Național de Cercetare Cantacuzino.

Substanțe administrate

Animalele de experiență au fost repartizate în patru loturi, cu activitate motorie uniformă. Șoarecilor din fiecare lot li s-a determinat masa corporală o dată la două zile și li s-au administrat zilnic următoarele substanțe, timp de 15 zile:

- Lot nicotină (n=12): soluție nicotină, în doză de 0,5 mg/kg corp per os;
- Lot cotinină (n=12): soluție cotinină, în doză de 5 mg/kg corp per os;
- Lot referință (n=12): soluție imipramină, în doză de 25 mg/kg corp per os;
- Lot martor (n=12): apă distilată 0,1 ml/10g corp, per os;

Teste comportamentale

În vederea evaluării comparative a efectelor psihotrope induse prin administrarea de nicotină și cotinină, au fost aplicate o serie de teste comportamentale.

8.3. Rezultate și discuții

A. Alcătuirea loturilor

Toate loturile au prezentat valori ale numărului de mișcări în plan orizontal de aproximativ 631, iar valorile medii ale numărului de mișcări în plan vertical s-au încadrat între 97 și 114.

B. Masa corporală

În ceea ce privește masa corporală a șoarecilor, se observă o ușoară creștere a acesteia pe parcursul celor două săptămâni de experiment, aspect valabil pentru toate cele 4 loturi.

C. Activitatea motorie

Activitatea motorie a animalelor de experiență a fost determinată după administrare acută (în ziua 1), subacută (ziua 7) și subcronică (ziua 14), în paralel cu testarea efectului antidepresiv.

În ceea ce privește variația activității motorii în timpul tratamentului, s-a constatat că, în cazul **lotului tratat cu imipramină**, există o **scădere relativ constantă din ziua 1 până în ziua 14** a experimentului, atât în cazul numărului de mișcări în plan orizontal, cât și al numărului de mișcări în plan vertical. Pentru loturile martor și cel tratat cu nicotină se observă o scădere a activității motorii în ziua 7, urmând o creștere a acestora în ziua 14. În cazul **lotului tratat cu cotinină** s-a înregistrat o **scădere marcată a activității motorii în ziua 7** comparativ cu prima zi a experimentului ($p < 0,01$, t-Student), observându-se o nouă scădere și după 14 zile de tratament.

D. Testul înotului forțat

Cuantificarea efectului antidepressiv acut al substanțelor administrate a fost realizată în ziua 1. Nicio substanță nu a redus timpul de imobilizare al șoarecilor în cadrul acestei testări.

E. Testul suspendării de coadă

Efectul antidepressiv după administrare subacută și subcronică a fost evaluat în ziua 7, respectiv ziua 14, prin intermediul testului suspendării de coadă. **După 7 zile, atât imipramina, cât și cotinina au manifestat efecte antidepressive comparabile**, semnificative statistic ($p < 0,05$, t-Student), cu o scădere a timpului de imobilizare cu 31%, respectiv 24% (Figura 8.15.). Nicotina a produs o creșterea timpului de imobilizare, nesemnificativă statistic.

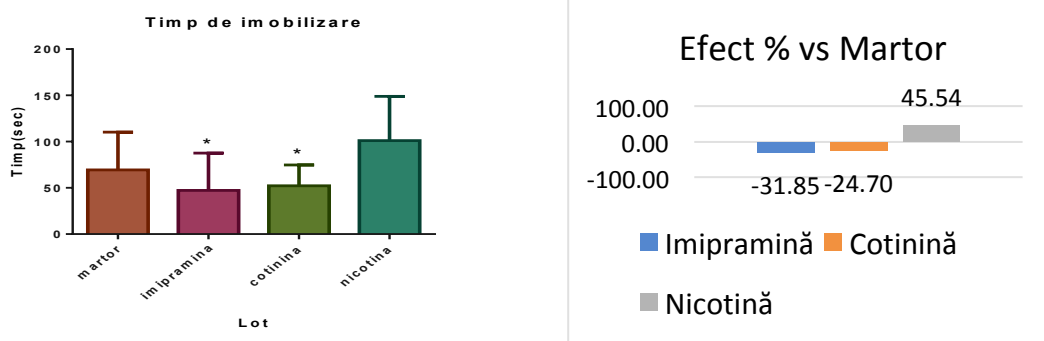


Figura 8.15. Timpii de imobilizare și variațiile procentuale față de martor în testul suspendării de coadă în ziua 7

F. Testul labirintului suspendat în formă de plus

În cazul **imipraminei** s-au observat **creșterea timpului petrecut în brațele închise** cu 20% față de martor ($p < 0,05$, Mann-Whitney), **scăderea timpului petrecut în brațele deschise**

cu 64% și a numărului de intrări în acestea cu 88% ($p < 0,05$, Mann-Whitney) și scăderea timpului petrecut în centrul labirintului cu 50% ($p < 0,05$, t-Student). Aceste rezultate însumează un pronunțat **efect anxiogenic**, fiind o acțiune farmacologică previzibilă ținând cont de mecanismul de acțiune al acesteia.

Administrarea de **nicotină** a produs în **ziua 15 un efect anxiolitic** pronunțat la șoareci, observându-se o **creștere marcată** de 129% a **timpului petrecut în brațele deschise** ($p < 0,05$, t-Student) și creșterea numărului de intrări în acestea cu 52%. În cazul **cotininei nu s-au înregistrat efecte semnificative asupra nivelului de anxietate** al animalelor de experiență .

Aceste rezultate sunt în contradicție cu alte raportări din literatură. Astfel, nicotina, în doză de 0,1 mg / kg sc administrată la șoareci a dovedit efect anxiogen, manifestat prin scăderi ale procentului de timp petrecut pe brațele deschise și de intrări în brațele deschise. Totuși, toleranța la acțiunea anxiogenă s-a dezvoltat după 6 zile de administrare zilnică a nicotinei (Biala, 2006).

9.Evaluarea influenței fumatului asupra statusului antioxidant la pacienți cu patologie psihiatrică

9.1. Justificarea experimentelor

Întrucât literatura de specialitate asociază fumatul cu stresul oxidativ și cu un risc foarte mare de apariție a diferitelor procese patologice, scopul studiului a fost acela de a evalua impactul consumului de tutun asupra unor biomarkeri de stres oxidativ evaluați la nivel sistemic.

La un grup de pacienți cu patologie psihiatrică, fumători a fost investigată interrelația între concentrația de cotinină serică și următorii parametrii biochimici, utilizați în mod curent ca markeri de stres oxidativ: produșii de oxidare avansată a proteinelor (AOPP, *Advanced Oxidation Protein Products*), glutationul redus (GSH) și capacitatea antioxidantă serică totală, măsurată printr-o metodă globală bazată pe reducerea unui complex chelat cu fierul (FRAP – *ferric reducing antioxidant power*).

9.2. Materiale și metode

A. Metodologia (*designul* studiului)

Studiul a fost realizat pe un număr de 76 de pacienți, cu vârsta cuprinsă între 25 și 40 de ani, selectați dintre pacienții internați în Spitalul de Psihiatrie “Sf. Maria”, localitatea Vedeia,

județul Argeș. Studiul a fost aprobat de Comisia de etică a Spitalului de Psihiatrie “Sf. Maria” (Anexa 1), iar consimțământul informat pentru participarea la studiu a fost obținut de la fiecare pacient (Anexa 2).

B. Determinarea cantității de cotinină din ser prin metoda ELISA

Expunerea la fumatul pasiv poate fi detectată prin măsurarea nivelului de nicotină și a metabolizilor săi.

Principiul metodei și procedura de lucru

Kitul ELISA pentru dozarea cotininei (Abnova, KA0930) se bazează pe o reacție imunoenzimatică de tip competitiv, în care cotinina din probele de ser intră în competiție cu cotinina pre-fixată în godeurile microplăcii (faza solidă competitivă) pentru situsurile de legare ale anticorpului de „captură” anti-cotinină, conjugat cu biotină-HRP (*Horseradishperoxidase* – peroxidaza din hrean).

C. Determinarea Produșilor de Oxidare Avansată a Proteinelor – AOPP (*Advanced Oxydation Protein Products*)

Principiul metodei și procedura de lucru

În vederea evaluării produșilor de oxidare avansată a proteinelor (AOPP), a fost aplicată o metodă publicată în literatură.

D. Evaluarea capacității antioxidante serice prin FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Reactivi: TPTZ (2,4,6-tri-piridil-S-triazina), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (clorura ferică hexahidrat), acetat de sodium trihidrat, acid ascorbic (vitamina C)

Principiul metodei și procedura de lucru

În prezența antioxidantilor, complexul 2,4,6-tri-piridil-S-triazină ferică (Fe^{III} -TPTZ) este redus la 2,4,6-tri-piridil-S-triazină feroasă de culoare albastru intens, cu maxim de absorbție la 600 nm.

E. Dozarea glutationului redus (GSH) în ser

Metoda de dozare a glutationului redus se bazează pe formarea unui compus colorat în galben (acidul 2-nitro-5-mercaptobenzoic) cu maxim de absorbție la lungimea de undă de 412 nm, la tratare cu reactivul Ellman (acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic, DTNB).

9.3. Rezultate și discuții

Cele trei grupuri de rezultate au fost comparate privind valorile medii ale celor trei parametri de status redox/stress oxidative studiați. Se observă că, odată cu **creșterea nivelurilor de cotinină serică** are loc și o **creștere**, nesemnificativă statistic, **a valorilor medii pentru GSH și FRAP, împreună cu o scădere**, aproape de limita de semnificație, a markerului de oxidare a proteinelor – **AOPP**.

Pentru a studia interrelația dintre markerul de metabolism al nicotinei – cotinina și GSH, FRAP și AOPP, pentru care s-au remarcat valori medii diferite între cele două grupuri de studiu, s-a ilustrat grafic corelația parțială Pearson (r) între acești biomarkeri (Figurile 9.13. și 9.14.).

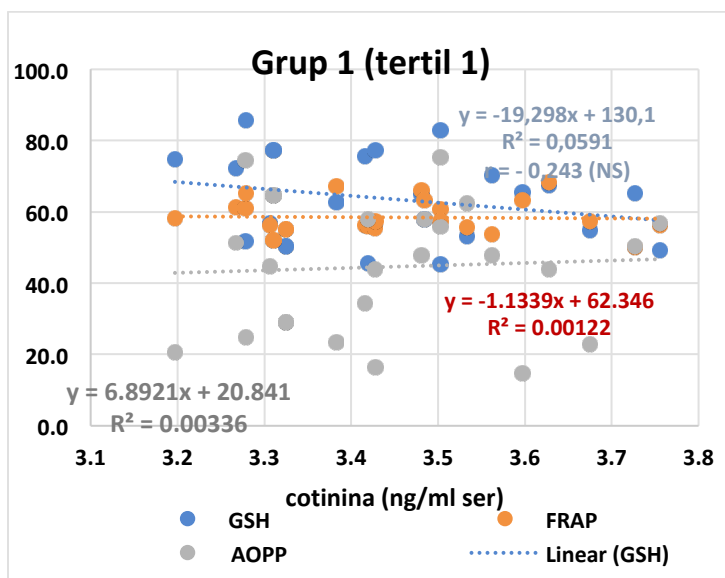


Figura 9.13. Corelația Pearson (r) dintre nivelurile serice de cotinină și valorile serice ale glutatationului redus (GSH), capacității antioxidante totale serice (FRAP) și produșilor finali de oxidare avansată a proteinelor (AOPP) la pacienții cu valori ale cotininei < 4 ng/mL ser (tertil 1)

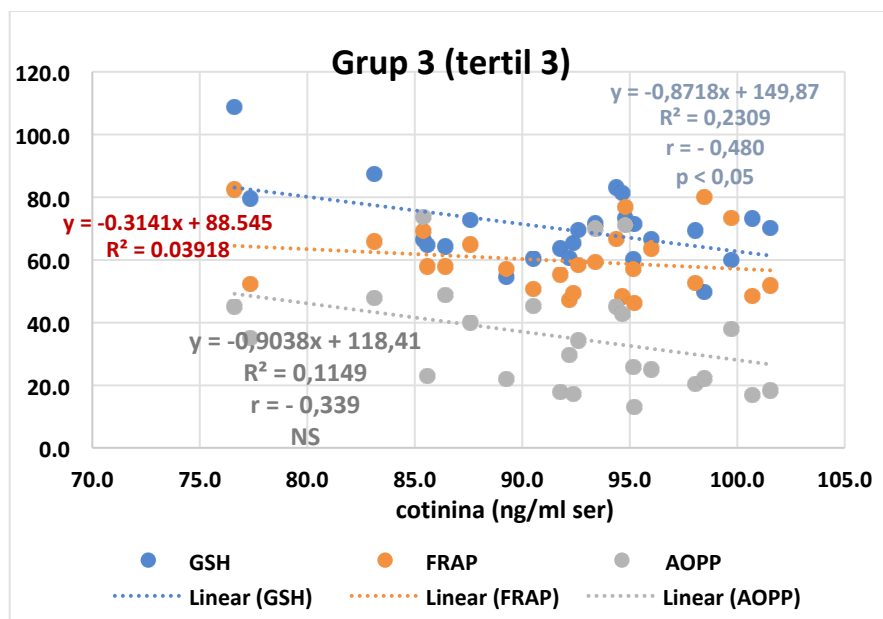


Figura 9.14. Corelația Pearson (r) dintre nivelurile serice de cotinină și valorile serice ale glutatationului redus (GSH), capacității antioxidante totale serice (FRAP) și produșilor finali de oxidare avansată a proteinelor (AOPP) la pacienții cu valori ale cotininei > 70 ng/mL ser (tertil 3)

Astfel, în cazul pacienților din **primul terțil**, nivelurile de cotinină se corelează negativ cu nivelurile de GSH, și pozitiv cu gradul de oxidare al proteinelor serice.

La grupul de pacienți din cel de-al **treilea terțil**, care a suferit o expunere maximă la nicotină, deși se remarcă **valori medii ușor crescute** ale GSH, se evidențiază o **corelație inversă semnificativă** între valorile individuale ale GSH și conținutul de cotinină serică, ceea ce indică faptul că toxicitatea nicotinei este însoțită de o **apărare antioxidantă serică redusă**.

Capacitatea antioxidantă totală a serului determinată ca FRAP nu este semnificativ modificată în cele două tertile studiate ca model.

Faptul că în cazul pacienților puternic expuși la nicotină nu se mai păstrează interrelațiile dintre sistemele de apărarea antioxidantă și gradul de lezare al unor biomolecule, dovedește apariția unor **dezechilibre puternice în capacitatea de răspuns a organismului la stresul oxidativ indus de fumat**. Structura exactă și mecanismele de formare a produșilor finali de oxidare avansată a proteinelor (AOPP) nu sunt pe deplin înțelese, dar se știe totuși că ele sunt în principal derivați ai albuminei modificată oxidativ ce există sub formă de fragmente și agregate.

10. Studii de toxicologie analitică

10.1. Metodă HPTLC pentru analiza simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice

10.1.1. Justificarea experimentelor

Luând în considerare literatura de specialitate privind intoxicațiile acute accidentale cu nicotină și necesitatea unor metode rapide de diagnostic analitic în aceste cazuri, am urmărit dezvoltarea unei metode simple de cromatografie în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) pentru determinarea nicotinei și a metabolitului ei cotinina din plasmă și urină umană.

10.1.2 Rezultate și discuții

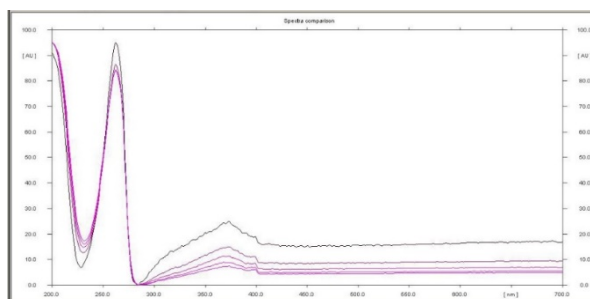
I. Analiza HPTLC a nicotinei and cotininei, după extracția din urină

Pentru domeniul de cantități 200 ng – 1000 ng/spot, au fost obținute curbe de calibrare corespunzătoare, având coeficientul de corelație r de peste 0,99. După cum se observă din curbele de calibrare, curbe de regresie liniare, cu coeficient de corelație de peste 0,99 au fost obținute folosind ca mărime de cuantificare aria picului, nu și înălțimea picului (Tabelul nr. X.2.). Curbele de calibrare pentru nicotină și cotinina sunt prezentate în Figura 10.2.

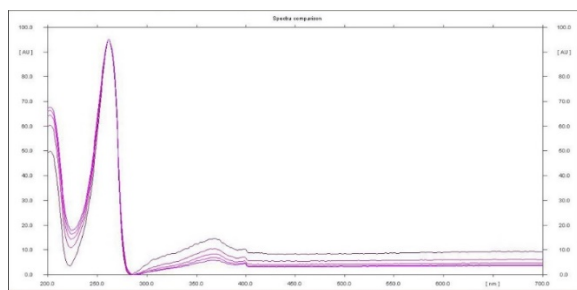
Tabelul nr. X.2. Parametrii curbelor de regresie obținute la analiza semicantitativă a nicotinei și cotininei din urină prin HPTLC

Mărimea luată în considerare	Ecuția dreptei de regresie	Coeficientul de corelație (r)	Deviația standard (a punctelor față de dreapta de regresie)
Aria picului (nicotina)	$Y=2866 + 14,57*X$	0.99488	4,65 %
Înălțimea picului (nicotina)	$Y=128,5 + 0.3193*X$	0.97856	7,67 %
Aria picului (cotinina)	$Y=7257 + 24,67*X$	0,99054	5,66%
Înălțimea picului (cotinina)	$Y=243,2 + 0.3126*X$	0,95993	7,73%

Spectrele UV (Figura 10. 3) corespunzătoare picurilor separate la R_f aproximativ 0,27 și 0,34 confirmă prezența nicotinei (Figura 10.3.-a) și a cotininei (Figura 10.3.-b), atât în soluția standard, cât și în extractele din urină.



a)



b)

Figura 10.3. Spectrele UV ale nicotinei (a) cotininei (b) (din soluția etalon și din extractele de urină), corespunzătoare spoturilor separate prin HPTLC

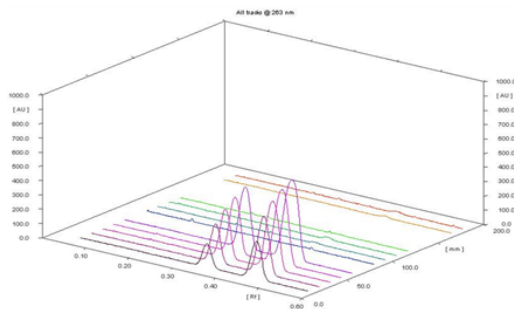
A fost determinată acuratețea metodei, evaluată ca procent de regăsire după extracție. Rezultatele obținute arată o supraestimare a procentului de regăsire, mai ales la nivelurile joase de cantități (Tabelul nr.10. 3).

Tabelul nr. X.3. Acuratețea (ca procent de regăsire după extracție) metodei HPTLC pentru deteminarea nicotinei și cotininei în urină

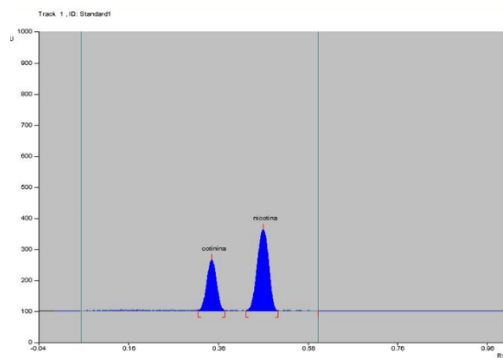
Cantitatea (ng/spot)	200	800	1000
Procentul de regăsire (%)	131,91	101,2	110
Deviația standard	1,21	1,85	1,57

II. Analiza HPTLC a nicotinei and cotininei, după extracția din plasmă

Cea mai bună separare a nicotinei de metabolitul său cotinina a fost realizată folosind ca dezvoltant sistemul de solvenți metanol : cloroform : amoniac (48,75: 48,75: 0,5). Valorile R_f obținute pentru nicotină și cotinină au fost $0,45 \pm 0,01$ și respectiv $0,34 \pm 0,01$ (Figura 10.4.).



a)



b)

Figura 10.4. Cromatogramele obținute la analiza nicotinei și cotininei din plasmă prin HPTLC (extracție în fază solidă, a) cromatograma 3D; b) Picurile integrate ale nicotinei și cotininei)

De asemenea, am realizat curbele de calibrare folosind cinci niveluri de cuantificare pentru nicotină și cotinină, în domeniul 200 – 1000 ng/spot.

Datele experimentale obținute se potrivesc pe modelul ecuației liniare de gradul 1, $y = A + Bx$, doar în cazul utilizării ariei picului ca mărime de cuantificare (Tabelul nr. X.4.).

Tabelul nr. X.4. Parametrii curbelor de regresie obținute la analiza semicantitativă a nicotinei și cotininei din plasmă prin HPTLC

<i>Mărimea luată în considerare</i>	Ecuția dreptei de regresie	Coeficientul de corelație (r)	Deviația standard (a punctelor față de dreapta de regresie)
Aria picului (nicotina)	$Y=1892,133 + 15,61 * X$	0,99610	2,46 %
Aria picului (cotinina)	$Y=3345 + 14,42 * X$	0,99265	5,35%

În experimentele pe plasmă am aplicat metoda extracției în fază solidă. Rezultatele arată că extracția în fază solidă nu este adecvată pentru izolarea nicotinei și cotininei din plasmă .

10.1.3. Rezultate și discuții

Am selectat sistemul cloroform: metanol: amoniac (48,75: 48,75: 0,5), ca cel mai bun pentru separarea nicotinei de cotinină. Utilizând primul sistem de solvenți (metanol: amoniac 100: 1,5), valorile R_f sunt ridicate (în jur de 0,80), dar nicotina nu se separă de cotinină. Reducerea a polarității solventului cu cel de-al doilea sistem de solvenți, cloroform: acetonă: amoniac (48,75: 48,75: 2,5), a determinat scăderea valorilor R_f (0,27 pentru nicotină și 0,34 pentru cotinină), dar nu s-a obținut o bună separare. Modificarea compoziției sistemului de solvenți prin înlocuirea acetonei cu metanol, solvent mai polar și reducerea cantității de agent de alcalinizare a creat condițiile pentru cea mai bună separare a nicotinei de cotinină (valorile R_f obținute pentru nicotină și cotinină au fost de 0,45 și, respectiv, 0,34).

Rezultatele experimentale indică faptul că, pentru domeniul de cantități 200 ng - 1000 ng / spot, atât pentru nicotină, cât și pentru cotinină au fost obținute curbe de calibrare liniare (având coeficient de corelație peste 0,99) prin utilizarea ariei picului ca măsură de cuantificare.

10.2. Metodă HPLC pentru analiza simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice

10.2.1. Justificarea experimentelor

Având în vedere datele din literatură privind analiza nicotinei și cotininei în probe biologice prin HPLC, ne-am propus dezvoltarea unei metode simple HPLC cu detecție cu șir de diode (DAD) pentru analiza simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice.

Considerând rezultatele privind investigarea toxicității nicotinei și cotininei asupra crustaceului *Daphnia magna*, am urmărit să dezvoltăm o metodă HPLC-DAD care să poată fi aplicată și pentru evaluarea bioacumulării nicotinei și cotininei de către dafnii.

10.2.3. Rezultate și discuții

A. Dezvoltarea metodei

În urma tatonărilor efectuate, s-a observat că, cea mai bună separare între nicotină și cotinină, în timp ce se mențin parametrii de performanță ai sistemului cromatografic, a fost realizată utilizând ca fază mobilă amestecul trietilamină, acid acetic și amoniac, ajustată la pH 10 și acetonitril într-un raport de 85:15 (v: v.) (Figura 10.8.)

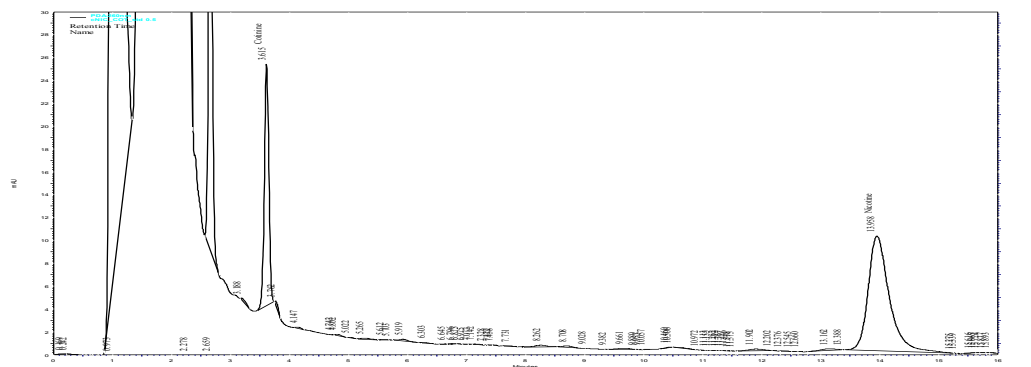


Figura 10.8. Cromatograma obținută la separarea nicotinei și cotininei (coloana Hypersil Gold, faza mobilă: amestec trietilamină, acid acetic, amoniac, ajustat la pH 10 (solvent A) și acetonitril (solvent B) în raport de 85:15 (v:v.); $T_{Rcotinină} = 3,6$ min.; $T_{Rnicotină} = 13,9$ min.)

B. Validarea metodei

Selectivitatea/specificitatea metodei

Specificitatea/selectivitatea metodei a fost determinată prin compararea cromatogramelor soluțiilor obținute pentru omogenatul de *D. magna* fără analiți (blancul) cu cele pentru omogenatul de *D. magna* la care s-au adăugat nicotină și cotinină și respectiv cele ale soluțiilor

etalon de nicotină și cotinină. Cromatogramele realizate au demonstrat că nu există componente în omogenatul de *D. magna* care să interfereze la timpii de retenție ai celor doi analiți.

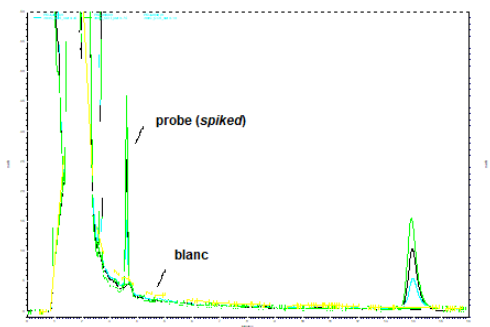


Figura 10.10. Cromatograme obținute la verificarea selectivității metodei HPLC-DAD de dozare a nicotinei și cotininei în *D. magna* (blanc și probe ”tratate” cu analiți)

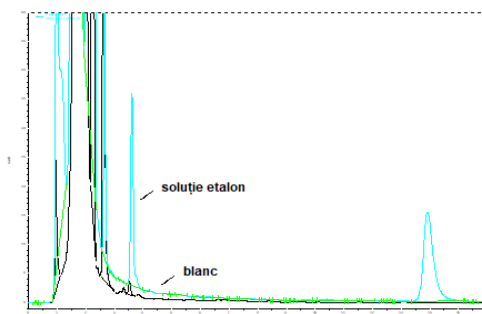


Figura 10.11. Cromatograme obținute la verificarea selectivității metodei HPLC-DAD de dozare a nicotinei și cotininei în *D. magna* (blanc și standard de nicotină și cotinină)

Linearitatea si domeniul de linearitate

Datele experimentale demonstrează linearitatea metodei, întrucât am obținut curbe de calibrare cu coeficienți de corelație de peste 0,99 atât pentru nicotină, cât și pentru cotinină (Tabelul nr. X.6). În curbele de calibrare, fiecare punct reprezintă media a 3 determinări. Ecuațiile dreptelor de regresie se potrivesc modelului ecuației lineare.

Tabelul nr. X.6. Parametrii curbelor de calibrare obținute la analiza simultană a nicotinei și cotininei din omogenat de *D. magna* prin HPLC-DAD

<i>Compusul</i>	Ecuția dreptei de regresie	Coeficientul de corelație (r^2)	Deviația standard (a punctelor față de dreapta de regresie)
Cotinina	$y = 3,64846e-006x + 0.0503145$	0,994855	7,81 %
Nicotina	$y = 1,99508e-006x - 0.00902231$	0,999431	5,83 %

Precizia și acuratețea metodei

Precizia metodei a fost determinată ca repetabilitate (pe câte cinci probe ”tratate” la trei niveluri de concentrație din curba de calibrare) și reproductibilitate (ca precizie intermediară, prin repetarea, într-o altă zi, a probelor efectuate pentru determinarea repetabilității). Criteriul de admisibilitate se referă la deviația relativă standard pentru conținutul în analiți, $RSD \leq 15,0 \%$ ($\leq 20,0 \%$, pentru limita de cuantificare).

Acuratețea (exactitatea) metodei a fost determinată ca procent de regăsire (recuperare), la trei niveluri de concentrație din curba de calibrare. Criteriul de admisibilitate se referă la procentul de recuperare, de $100 \pm 15,0 \%$ ($100 \pm 20,0 \%$ pentru limita de cuantificare).

Rezultatele obținute demonstrează că metoda este precisă și exactă, întrucât respectă criteriile de admisibilitate.

10.3. Analiza nicotinei și cotininei în plasmă la pacienți cu patologie psihiatrică

10.3.1. Justificarea experimentelor

Studii recente au sugerat că pacienții cu boli psihice grave sunt mari fumători, fumatul reprezentând o cauză principală de morbiditate și mortalitate la această categorie de pacienți (Lasser, 2000; Brown, 2000, Weiner, 2011).

În acest context, ne-am propus un studiu de evaluare a concentrațiilor plasmatice ale nicotinei și cotininei la pacienți cu patologie psihiatrică, aflați în regim de internare, comparativ cu pacienți cu aceeași patologie, dar nefumători (în acest caz existând totuși condiții de expunere la nicotină ca urmare a fumatului pasiv).

10.3.2. Materiale și metode

Lotul de studiu a fost constituit din 46 de pacienți cu patologie psihiatrică, internați la Spitalul "Sfânta Maria" Vedea, județul Argeș. Cerințele legislației privind etica cercetării au fost îndeplinite, studiul fiind aprobat de Comisiei de Etică a C.E.T.T.T." Sf. Stelian" București (Anexa 1), în baza unui protocol aprobat și coordonat de către un medic primar psihiatru (Anexa 1). De la subiecții incluși în studiu sau tutorii lor legali s-a obținut consimțământul informat pentru participarea la studiu (model în Anexa 2). În lotul de studiu, 20 de pacienți sunt nefumători, iar 26 sunt fumători. Toți pacienții au primit tratament cu carbamazepină.

Variabile/parametri analizați în studiu: vârsta, sexul, diagnostic, tratament, vechimea fumatului, scorul dependenței de nicotină, număr de țigări /zi, concentrația plasmatică de nicotină, concentrația plasmatică de cotinină, raportul concentrațiilor plasmatice de nicotină și cotinină.

Probe biologice: plasmă, obținută din sânge venos recoltat pe anticoagulant (EDTA_{K2})

Analiza nicotinei și cotininei în plasmă

Dozarea nicotinei și cotininei din plasmă a fost realizată printr-o metodă LC-MS publicată, adaptată pentru analiza probelor de plasmă (Tzatzarakis, 2012).

10.3.3. Rezultate și discuții

I. Caracterizarea lotului de studiu

Cele două subloturi (pacienții fumători și cei nefumători) sunt omogene în ceea ce privește vârsta (media de 48 de ani, respectiv 50 de ani) distribuția pe sexe (predomină bărbații, iar raportul bărbați:femei este 2,61, respectiv 3), diagnosticul (în ambele subloturi au predominant pacienții cu schizofrenie paranoidă, 35 de cazuri din 46) și tratamentul (carbamazepina a fost în regimul de tratament al tuturor pacienților, cel mai frecvent cu o schemă de administrare de 2 comprimate, respectiv 400 mg pe zi).

Reprezentarea grafică a distribuției frecvențelor privind vârsta pacienților, vechimea fumatului și scorul dependenței sunt redată în histogramele din figurile 10.15 și 10.16.

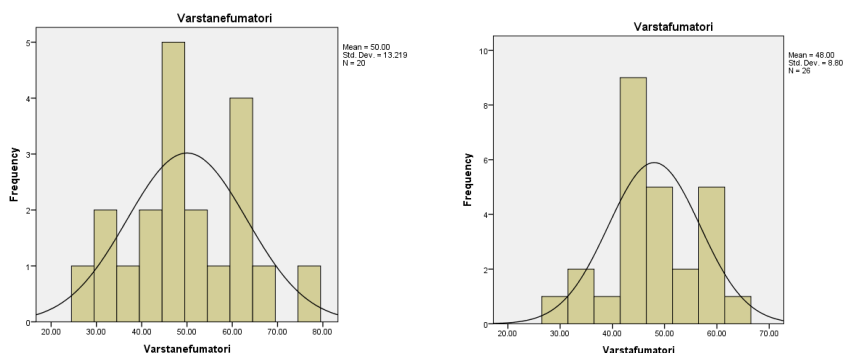
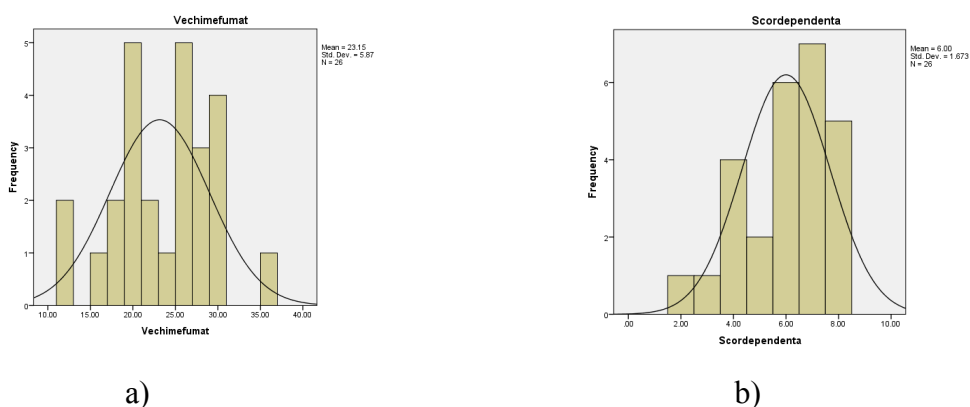


Figura 10.15. Distribuția frecvențelor privind vârsta pacienților în lotul de pacienți fumători și nefumători



a)

b)

Figura 10.16. Distribuția frecvențelor privind durata fumatului (a) și scorul dependenței de nicotină (b) în lotul de pacienți fumători

II. Dozarea nicotinei și cotininei în plasmă

Pentru dozarea nicotinei și cotininei în plasmă s-a utilizat o metodă LC-MS. Curbele de calibrare au fost realizate în domeniul 0, 10, 25, 50 and 100 ng/mL pe probe de plasmă ”tratate” cu nicotină și cotinină.

În condițiile experimentale prezentate la ”Materiale și metode”, timpii de retenție obținuți pentru nicotină, cotinină și ketamină au fost de 5,1 min., 7,58 min. și 8,83 min.

Datele experimentale demonstrează linearitatea metodei. Parametrii curbelor de calibrare sunt rezumați în tabelul nr. X.10.

În figura 10.21 este prezentată cromatograma obținută pentru soluția standard de nicotină și cotinină 100 ng/mL, iar în figura 10.23 cromatogramele pentru probele spiked de nicotină și cotinină 100 ng/mL. Se observă separarea corespunzătoare a analiților și lipsa inteferențelor cu componenți din plasmă.

Figurile 10.24 și 10.25 prezintă cromatogramele tipice obținute pentru pacienți fumători, respectiv nefumători.

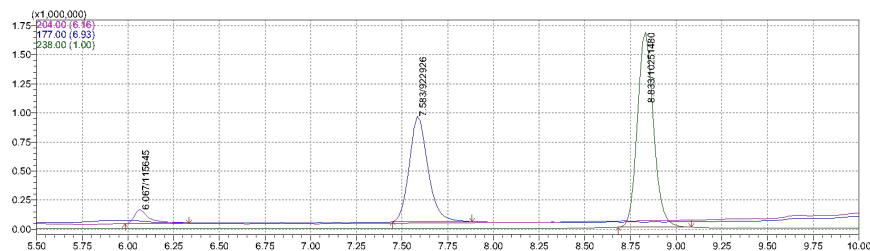


Figura 10.21. Cromatograma obținută pentru soluția standard de cotinină și nicotină 100 ng/mL
($T_{R\text{cotinină}} = 5,1$ min.; $T_{R\text{nicotină}} = 7,58$ min.; $T_{R\text{ketamină}} = 8,83$ min.)

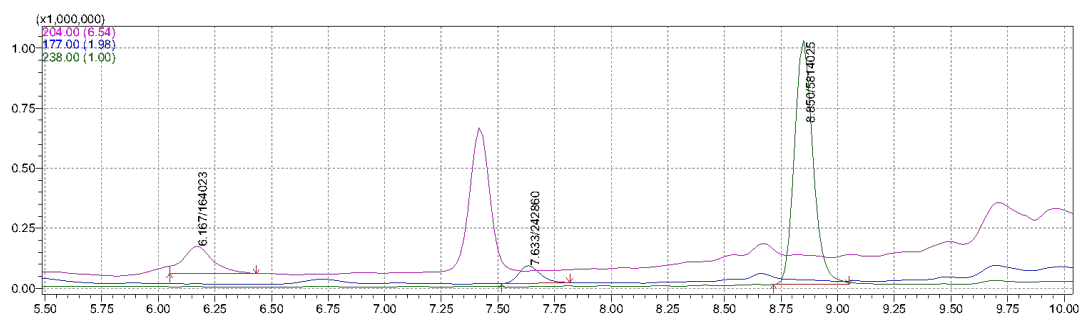


Figura 10.23. Cromatograma obținută pentru proba spiked de cotinină și nicotină 100 ng/mL
($T_{R\text{cotinină}} = 5,1$ min.; $T_{R\text{nicotină}} = 7,58$ min.; $T_{R\text{ketamină}} = 8,83$ min.)

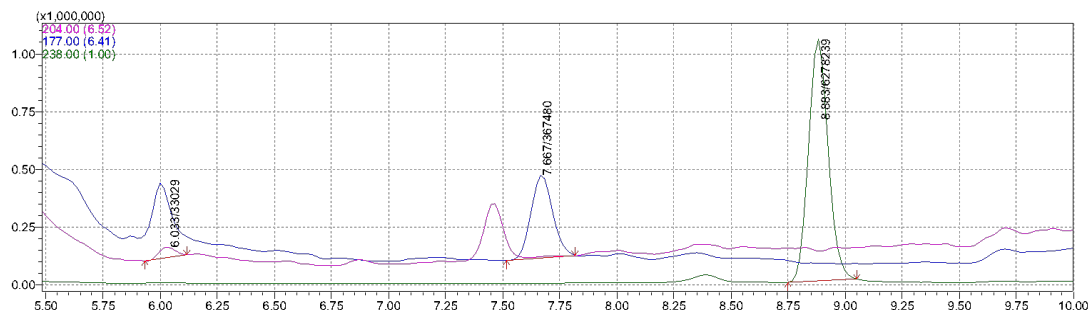


Figura 10.24. Cromatograma obținută pentru o probă de la un pacient fumător
($T_{R\text{cotinină}} = 5,1$ min.; $T_{R\text{nicotină}} = 7,58$ min.; $T_{R\text{ketamină}} = 8,83$ min.)

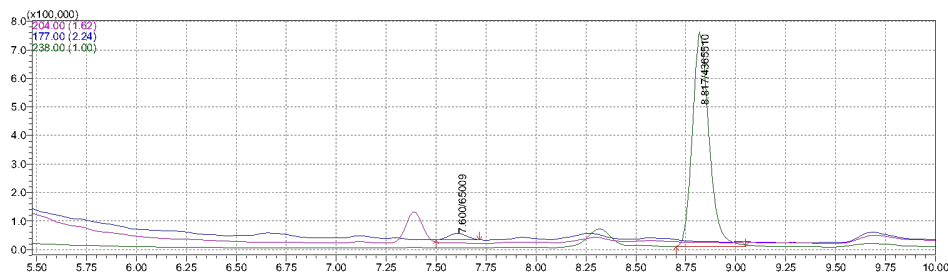


Figura 10.25. Cromatograma obținută pentru o probă de la un pacient nefumător

($T_{R\text{nicotină}} = 7,58 \text{ min.}$; $T_{R\text{ketamină}} = 8,83 \text{ min.}$)

Rezultatele obținute confirmă că pacienții nefumători au fost expuși pasiv la fumul de tutun, în plasma acestora cuantificându-se cotinina la niveluri caracteristice pentru fumatul pasiv (medie 20 ng/mL)

În studiul nostru, nivelurile de cotină din plasma fumătorilor au fost în medie de 100 ng/mL, sugerând fumat moderat, în timp ce nicotina a fost cuantificată la niveluri mult mai joase (medie aproximativ 8 ng/mL). Acest fapt sugerează o biotransformare intensă a nicotinei la pacienții luați în studiu, raportul nicotină/cotină având valori subunitare (medie 0,175). Concentrația de cotină în plasma pacienților fumători au variat într-un domeniu larg (de la 13 ng/mL la 449 ng/mL, , indicând o mare variabilitate individuală.

Concentrația plasmatică de cotină a fost semnificativ statistic mai scăzută la nefumători comparativ cu fumătorii ($p < 0,001$). De asemenea, concentrația plasmatică de nicotină a fost semnificativ mai mică decât cea de cotină la pacienții fumători ($p < 0,001$) (Figura 10.28).

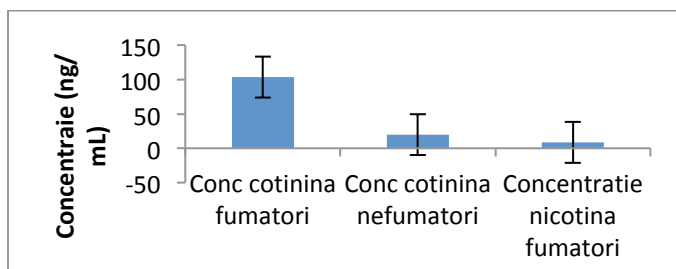


Figura 10.28. Grafic comparativ privind nivelurilor plasmatic de nicotină și cotină la pacienții fumători și nefumători ($p < 0,001$ conc. cotină fumători/conc. cotină nefumători și conc. cotină fumători/ concentrație nicotină fumători)

Analizele de corelații arată o serie de corelații slabe (coeficienți de corelație cu valori mici, dar cu semnificație statistică) între următorii parametri în lotul de pacienți fumători: vârstă – vechime fumat; scor dependență – concentrație cotină; concentrație nicotină – raport

nicotină/cotinină; concentrație cotinină-raport nicotină/cotinină (corelație inversă) (Tabelul nr. X.12).

Tabelul nr. X.12 Corelații Pearson între parametri analizați în studiu în lotul de pacienți fumători

Parametrul	Parametrul	Coefficient de corelație, semnificație statistică
Vârsta	Vechime consum	$r = 0,557^{**}$; $p < 0,001$
Scor dependență	Concentrația plasmatică cotinină	$r = 0,430^{*}$; $p < 0,05$
Concentrația plasmatică nicotină	Raport nicotină/cotinină	$r = 0,545^{**}$; $p < 0,001$
Concentrația plasmatică cotinină	Raport nicotină/cotinină	$r = - 0,443^{*}$; $p < 0,05$

Distribuția grafică a concentrațiilor plasmatiche de cotinină și de nicotină în funcție de scorul dependenței nu sugerează o corelație între acești parametri (Figurile 10.31. și 10.32).

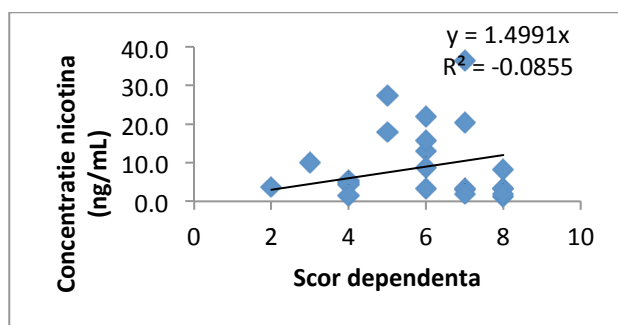


Figura 10.31. Concentrația plasmatică de nicotină în funcție de scorul dependenței la pacienții fumători

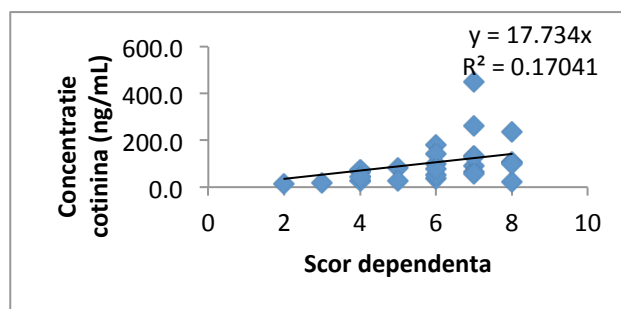


Figura 10.31. Figura 10.32. Concentrația plasmatică de cotinină în funcție de scorul dependenței la pacienții fumători

11. CONCLUZII GENERALE

Având în vedere toxicitatea nicotinei și nocivitatea în ansamblu a fumatului asupra organismului, precum și evidențierea, în ultimii ani a unor noi direcții de acțiune ale nicotinei, cu rol în neuroprotecție și cu eficacitate în bolile neurodegenerative, tutunul și nicotina se mențin în atenția cercetătorilor. Mai mult, cercetările sunt în prezent îndreptate și spre definirea profilului toxicologic al cotininei, principalul metabolit al nicotinei, care și-a conturat utilitatea ca biomarker de expunere pentru fumat, inclusiv pentru cel pasiv. Datele privind mecanismele de acțiune și toxicitatea cotininei sunt, în prezent, controversate. Au fost relevate importante proprietăți psihoactive ale cotininei (de exemplu, antidepresive și anxiolitice) și, pe baza cercetărilor preclinice, au fost propuse roluri în îmbunătățirea abilităților cognitive.

Teza de doctorat a avut ca obiectiv investigarea toxicologică comparativă a nicotinei și cotininei, în cadrul unui studiu complex care a reunit o gamă largă de cercetări, după cum urmează:

- studii *in vitro*, pe culturi de celule umane normale
- testare fitobiologică, pe celula vegetală de *Triticum* și *Lactuca*
- biotestare pe nevertebrate, cu evaluarea bioacumulării, utilizând modelul crustaceului *Daphnia magna*
- studiu *in vivo*, în model animal pe șoarece, pentru cercetarea acțiunii psihotrope
- studiu *in vivo*, pe pacienți, pentru evaluarea influenței fumatului asupra statusului antioxidant în cazuri de patologie psihiatrică
- studii de toxicologie analitică, în vederea dezvoltării unor metode de analiză (HPTLC, HPLC-DAD, LC-MS) simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice; s-a urmărit aplicabilitatea metodelor în următoarele scopuri: pentru diagnostic analitic în intoxicații acute cu nicotină; pentru evaluarea bioacumulării de către *D. magna*; pentru investigarea nivelurilor plasmatiche de nicotină și cotinină, precum și a raportului acestora la pacienți cu patologie psihiatrică

Dintre concluziile cercetărilor realizate, se desprind ca semnificative următoarele:

1. Evaluarea toxicității nicotinei și cotininei prin teste *in vitro*

- La concentrații similare cu cele prezente în sângele fumătorilor, nicotina și cotinina nu s-au dovedit a fi citotoxice asupra celulelor pulmonare umane normale MRC-5.

- Viabilitatea celulelor tratate cu concentrații mai mari de nicotina (1 mM) și cotinina (2 mM) a scăzut, iar nicotina s-a dovedit a fi mai toxică decât cotinina, reducând viabilitatea celulară cu aproximativ 50%.

- Atât nicotina, cât și cotinina inhibă proliferarea fibroblaștilor pulmonari normali MRC-5 pe o perioadă de 48 de ore, dar spre deosebire de nicotină, în cazul cotininei capacitatea de proliferare a celulelor se menține și după 48 de ore de tratament.

- Rezultatele studiului oferă informații suplimentare referitoare la toxicitatea cotininei și nicotinei asupra celulelor normale.

2. Investigarea toxicității nicotinei și cotininei pe celula vegetală (testul *Triticum*, testul *Lactuca*)

- Au fost relevate răspunsuri diferite la nicotină și cotinina ale celor două plante aparținând Dicotiledonatelor și Monocotiledonatelor.

- În domeniul de concentrații 0,1 – 100 μM , nicotina și cotinina nu exercită un efect semnificativ asupra alungirii radiculare a rădăcinii de *Triticum*. Astfel, acest test fitobiologic nu poate fi aplicat pentru identificarea unor efecte toxice ale celor două substanțe asupra celulei vegetale la concentrații sub 100 μM .

- Pe același domeniu de concentrații, nicotina și cotinina au efecte diferite asupra alungirii radiculare la *Lactuca sativa*. În timp ce nicotina este un inhibitor al procesului pe tot domeniul de concentrații, cotinina se comportă ca inhibitor la concentrații mari (peste 5 μM) și ca stimulator la concentrații mici (sub 1 μM).

3. Cercetarea toxicității nicotinei și cotininei asupra crustaceului *Daphnia magna*

- A fost evidențiată toxicitatea mai mare a nicotinei comparativ cu cotinina, reflectată de valorile concentrației medii letale (CL50). Spre deosebire de nicotină, în cazul cotininei, valoarea CL50 a fost obținută doar după 48 de ore de expunere.

- Evaluarea bioacumulării nicotinei și cotininei de către *D. magna* a arătat că dafniile acumulează cantități similare de nicotină și cotinina după 24 de ore de expunere, dar cantități semnificativ mai mici de nicotină după 48 de ore de expunere, în corelație cu toxicitatea marcată a nicotinei comparativ cu cotinina

- Cotinina a fost cuantificată și în probele expuse doar la nicotină, indicând biotransformarea nicotinei la cotinina de către *D. magna*

- Rezultatele obținute oferă date valoroase pentru investigarea potențialului toxic al nicotinei și cotininei în diferite modele experimentale pe organisme nevertebrate.

4. Investigarea proprietăților psihoactive ale nicotinei și cotininei prin studii *in vivo* la șoarece

- Atât nicotina, cât și metabolitul său principal, cotinina, au manifestat efecte psihoactive la șoareci, în cadrul testelor comportamentale efectuate.

- Imipramina și cotinina au exercitat efecte antidepresive comparabile și statistic semnificative, după 7 zile de tratament, dar niciun efect nu a fost observat la animalele tratate cu nicotină. Un efect anxiogen important a fost demonstrat pentru imipramină după 14 zile de tratament. Nicotina s-a dovedit a avea efect axiolitic după 14 zile de tratament, spre deosebire de cotinină, care nu a influențat semnificativ nivelul de anxietate.

- Studiul a evidențiat unele efecte psihotrope ale nicotinei și cotininei la șoareci, în funcție de regimul de tratament. Cu toate acestea, rezultatele obținute nu sunt în totalitate în concordanță cu alte raportări din literatura de specialitate și sunt necesare studii suplimentare pentru a clarifica regimul de tratament și mecanismele care contribuie la efectele psihotrope.

5. Investigarea influenței fumatului asupra unor biomarkeri care ilustrează susceptibilitatea organismului uman la stresul oxidativ, în funcție de nivelul de cotinină serică, la pacienți cu patologie psihiatrică:

- S-a demonstrat că fumatul este asociat cu o apărare serică antioxidantă scăzută, reflectată prin nivelul de glutatation redus (GSH), dar nu modifică relevant capacitatea antioxidantă totală a serului determinată ca FRAP. În mod paradoxal, s-a observat un stres oxidativ mai scăzut la pacienții fumători activi, exprimat la nivelul proteinelor serice (AOPP), dar acesta este nesemnificativ față de fumătorii pasivi.

- Deoarece interacțiunile dintre sistemul de apărare antioxidant și gradul de deteriorare al biomoleculelor nu se mai păstrează, putem explica apariția unor dezechilibre puternice în capacitatea organismului de a răspunde stresului oxidativ indus de fumat. Aceste rezultate confirmă raportările din literatura de specialitate cu privire la expunerea fumătorilor la dezechilibrul oxidativ și, prin urmare, apariția proceselor patologice în relație directă cu cantitatea de tutun consumată.

6. Studii de toxicologie analitică

6.1. Metodă HPTLC pentru analiza simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice

- Am stabilit condițiile experimentale pentru identificarea prin HPTLC a nicotinei din plasma și urină în prezența principalului său metabolit, cotinina. Astfel, separarea optimă a nicotinei de cotinină a fost obținută folosind plăci de sticlă pre-trasate (fază staționară silicagel 60 F 254), fază mobilă cloroform: metanol: amoniac (48,75: 48,75: 0,5) și detecție la 263 nm. Identificarea nicotinei și cotininei a fost confirmată de similitudinea între spectrelor UV ale substanțelor extrase și cele ale soluțiilor standard.

- Metoda permite evaluarea semi-cantitativă a nicotinei și cotininei în domeniul de cantități 200 - 1000 ng / spot, curbele de calibrare obținute fiind liniare.

- Rezultatele au indicat faptul că extracția în fază solidă a nicotinei și cotininei din plasmă nu a fost eficientă, astfel încât este necesară fie optimizarea tehnicii fie aplicarea tehnicii de extracție lichid-lichid.

- Metoda HPTLC elaborată poate fi folosită pentru determinarea simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice la concentrații mari (toxice sau letale). Astfel, metoda dezvoltată își poate găsi utilitate în cazuri letale de intoxicație cu nicotină, în analize de toxicologie medico-legală.

6.2. Metodă HPLC pentru analiza simultană a nicotinei și cotininei în probe biologice

- Au fost studiate și optimizate condițiile experimentale pentru dezvoltarea unei metode HPLC-DAD pentru dozarea simultană a nicotinei și metabolitului ei cotinina în probe biologice.

- Separarea optimă s-a obținut utilizând o coloană Hypersil Gold și ca fază mobilă amestecul trietilamină, acid acetic și amoniac (la pH 10) și acetonitril în raport de 85:15, cu detecție la 260 nm.

- Metoda a fost validată prin parametrii prevăzuți în literatură (selectivitate/specificitate, linearitate, precizie, acuratețe, limite de detecție și de cuantificare), în vederea utilizării pentru a evalua bioacumularea nicotinei de către crustaceul *D. magna*.

6.3. Analiza nicotinei și cotininei în plasmă la pacienți cu patologie psihiatrică

- Nivelurile plasmatice de nicotină și cotinină au fost evaluate comparativ la pacienți cu boli psihice fumători și nefumători. Lotul de studiu a fost omogen, fără diferențe semnificative

între fumători și nefumători în ceea ce privește vârsta, sexul, patologia și medicația (toți pacienții au avut în schema de tratament carbamazepină).

- Nivelul de cotinină la nefumători a fost semnificativ mai mic decât la fumători, indicând expunerea pasivă moderată la fumul de tutun a pacienților nefumători.

- Concentrația plasmatică de nicotină a fost semnificativ mai mică decât cea de cotinină; raportul concentrațiilor plasmatice de nicotină și cotinină a avut valori subunitare, sugerând biotransformarea intensă a nicotinei la cotinină.

- Analizele de corelații au evidențiat o serie de corelații cu valori mici ale coeficienților de corelație, dar semnificative statistic între următorii parametri în lotul de pacienți fumători: vârstă – vechime fumat; scor dependență – concentrație cotinină; concentrație nicotină – raport nicotină/cotinină; concentrație cotinină-raport nicotină/cotinină.

- Pacienții fumători au prezentat un scor mediu al dependenței de nicotină ridicat, iar numărul de țigări fumate zilnic a fost, de asemenea, mare. Cu toate acestea, nivelurile de cotinină din plasmă au corespuns fumatului moderat, sugerând posibila interferență a carbamazepinei, inductor al CYP2A6, în biotransformarea oxidativă a nicotinei la cotinină.

- Interacțiunea carbamazepinei cu nicotina în etapa biotransformării, la pacienții cu patologie psihică, deschide calea unor cercetări suplimentare, prin cuatificarea nivelurilor plasmatice de carbamazepină la pacienții fumători și nefumători.

Teza aduce o serie de contribuții originale sau cu aplicabilitate practică prin:

- ✓ informațiile referitoare la toxicitatea cotininei și nicotinei asupra celulelor normale
- ✓ rezultatele investigării toxicității nicotinei și cotininei asupra crustaceului *Daphnia magna* și a bioacumulării celor două substanțe de către acesta
- ✓ aprofundarea profilului farmacologic al cotininei și nicotinei, prin evidențierea acțiunilor antidepressivă și anxiolitică la șoarece
- ✓ evidențierea influenței fumatului asupra unor biomarkeri de stres oxidativ și a corelației acestora cu nivelul de cotinină serică
- ✓ elaborarea unor metode analitice (HPTLC, HPLC, LC-MS) cu aplicabilitate pentru: diagnosticul analitic în intoxicațiile cu nicotină; determinarea bioacumulării de către *D. magna*; evaluarea nivelurilor plasmatice de nicotină și cotinină la pacienți cu boli psihice.

În ansamblu, rezultatele tuturor cercetărilor tezei contribuie la completarea profilului toxicologic al cotininei și deschid calea unor investigații viitoare precum: cercetarea mecanismului toxicității nicotinei și cotininei asupra crustaceului *Daphnia magna*, precum și a influenței lor asupra metabolismului acestui nevertebrat; clarificarea regimului de tratament și a mecanismelor care contribuie la efectele psihotrope ale nicotinei și cotininei; studiul interacțiunii farmacocinetice, în etapa biotransformării, a carbamazepinei cu nicotina, la pacienți cu patologie psihiatrică.

Bibliografie

- Almeida OP, Hulse GK, Lawrence D, Flicker L. Smoking as a risk factor for Alzheimer's disease: contrasting evidence from a systematic review of case-control and cohort studies. *Addiction*. 2002;97:15–28
- Ancuceanu R., Istudor V., Dinu M., Codreanu M., Contribution to the study of some *Cuscuta* species. Note 2. Use of the Constantinescu bioassay in the study of the correlations between *Cuscuta* sp. and their hosts, *Farmacia*, 2005; 53(5):63-75.
- Babich H, Borenfreund E. Cytotoxic and morphological effects of phenylpropanolamine, caffeine, nicotine, and some of their metabolites studied in vitro. *Toxicol In Vitro*. 1992;6(6):493-502.
- Baconi D., Bălălău C., *Toxicologia substanțelor de abuz*, 2013, Ed. Universitară “Carol Davila”, București
- Baconi D., Bălălău D., Abraham P., *Abuzul și Toxicodependența Mecanisme manifestări Tratament Legislație*, 2008, Editura Medicală, București
- Baconi D., Bălălău D., Abraham P., *Abuzul și toxicodependența. Mecanisme. Manifestări. Tratament. Legislație.*, (2008), Editura Medicală, p. 366-373
- Balfour D., Munafo M., *The Neurobiology and Genetics of Nicotine and Tobacco*, 2015, Springer, United Kingdom, p 38,
- Barber MC, Suárez LA, Lassiter RR. Modeling bioconcentration of nonpolar organic pollutants by fish. *Environ. Toxicol. Chem*. 1988;7(7):545–558
- Barna O., Lungu E., *Ziua Națională fără tutun 2018 – Analiză de situație*, 2018, <http://insp.gov.ro/sites/cnepss/wp-content/uploads/2018/11/Analiza-de-situatie-ZNT-2018.pdf> accesat în ianuarie 2019
- Beck A., Baker A., Todd J., *Smoking in schizophrenia: cognitive impact of nicotine and relationship to smoking motivators*, 2015, 28:26-32; [PubMed: 29379758]
- Begum SF, Nagajothi G, Latha KS, et al. Possible role of nicotine and cotinine on nitroxidative stress and antioxidant content in saliva of smokeless tobacco consumers. *Pract Lab Med*. 2018;12:e00105. Published 2018 Jul 17. doi:10.1016/j.plabm.2018.e00105
- Benowitz et al, *Pharmacology of Nicotine: Addiction, smoking-induced disease and Therapeutics*, 2009, Annu Rev Pharmacol Toxicol
- Bruner J, Forouzan I. *Smoking and buccally administered nicotine. Acute effect on uterine and umbilical artery Doppler flow velocity waveforms*. *J Reprod Med* 1991;36:435-40.
- Chiriță C, Cioroianu DM, Chiriță IC, Negreș S, Marian B, Zbârcea CE. Synthesis and pharmacological activity of new acyloximines derivatives. *Farmacia* 2016; 64(1):61-66.
- Covey LS, Hughes DC, Glassman AH, Blazer DG, George LK. Ever-smoking, quitting, and psychiatric disorders: evidence from the Durham, North Carolina, Epidemiologic Catchment Area. *Tob Control*. 1994;3:222–227.
- Davis B, Dang M, Kim J, Talbot P. Nicotine concentrations in electronic cigarette refill and do-it-yourself fluids. *Nicotine & Tobacco Research*. 2015;17(2):134–141. doi: 10.1093/ntr/ntu080.
- Drăgoi CM, Olaru OT, Dinu M, Popescu C, Arsene AL, Dune A, Nicolae AC, Ancuceanu RA, Zbârcea CE, Negreș S, Nitulescu GM, Șeremet OC - Characterisation, pharmacotoxicological and biochemical studies on *Morus alba* L. extract and its fractions. *Farmacia*, 2018, 66(1): 120-128.
- Echeverria V, Grizzell JA, Barreto GE. Neuroinflammation: A Therapeutic Target of Cotinine for the Treatment of Psychiatric Disorders? *Curr Pharm Des*. 2016;22(10):1324-33.

- El Lakiss H, Baconi DL, Guțu CM, Ilie M, Bălălaşu D - HPTLC method for the semi quantitative assay of alprazolam in biological samples. *Farmacia*, 2011, 59(5): 707 – 712
- Fratiglioni L, Wang HX. Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav Brain Res*. 2000;113:117–20.
- Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci* 2006;27:482–491.
- Grizzell JA, Mullins M, Iarkov A, Rohani A, Charry LC, Echeverria V. Cotinine reduces depressive-like behavior and hippocampal vascular endothelial growth factor downregulation after forced swim stress in mice. *Behav Neurosci*. 2014 Dec;128(6):713-21. doi: 10.1037/bne0000021. Epub 2014 Oct 13.
- Holmes, A., Copland, D., Silburn, A., & Chenery, J. (2011). *Acute nicotine enhances strategy-based semantic processing in Parkinson's disease*. The International Journal of Neuropsychopharmacology, 14, 877–885.
- Jeon J., Kurth D., Hollender J. Biotransformation pathways of biocides and pharmaceuticals in freshwater Crustaceans based on structure elucidation of metabolites using high resolution mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol*. 2013;26(3):313–324.
- Jin JS, Kim MS, Yi JM, Lee JH, Lee JH, Moon SJ, Jung KP, Lee JK, An NH, Kim H. Inhibitory effect of Sejin-Eum I/II on nicotine- and cigarette extract-induced cytotoxicity in human lung fibroblast. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 86(1): 15-20.
- Kedzierska, E., Wach, I., 2016. Using tests and models to assess antidepressant-like activity in rodents. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci*. 29.
- Knut-Olaf H., Gnaneberg D., *Tobacco or Health?*, (2010), Springer, Berlin, p2-4,
- Komada, M., Takao, K., Miyakawa, T., 2008. Elevated Plus Maze for Mice. *J. Vis. Exp. JoVE* 1088. <https://doi.org/10.3791/1088>
- Leonard B, Maes M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2012; 36 (12): 764–785.
- Levin E., Rezvani A., *Nicotinic interactions with antipsychotic drugs, models of schizophrenia and impacts on cognitive function*, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, 74, 1182-1191
- Liakopoulou-Kyriakides M., Platis F., Bala Moutsos N., Kortsaris A. Determination of Nicotine in Serum by TLC-Densitometry. *Analytical Letters*, 1992, 25(3): 485 – 496. DOI.org/10.1080/00032719208016110
- Meruva NK, Benvenuti ME, Cleland GE, Burgess J. A. *Simultaneous Determination of Nicotine and Related Impurities in E-Liquids and E-Cigarettes Using UPLC-UV-MS*. Waters, UK: 2016.
- Miller TH, Bury NR, Owen S F, Barrona LP. Uptake, biotransformation and elimination of selected pharmaceuticals in a freshwater invertebrate measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 2017; 183: 389-400
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (eds). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Fourth Edition, Pharmaceutical Press, 2011, 708-757
- Moga M, Boșca AB, Sorițău O, Băciuț M, Lucaciu O, Virag P, Ilea A, Dîrzu N, Câmpian RS. Nicotine Cytotoxicity on the Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Periodontium. *Romanian Biotechnological Letters* 2016; 21(4): 11763 – 11772.
- Moran VE. Cotinine: Beyond that Expected, More than a Biomarker of Tobacco Consumption. *Front Pharmacol*. 2012 Oct 10;3:173. doi: 10.3389/fphar.2012.00173. eCollection 2012.

- Negreş S, Zbârcea CE, Arsene A, Chiriță C, Buzescu A, Velescu BŞ, Ştefănescu E, Şeremet OC, Nicolescu F. Experimental pharmacological model for inducing and quantifying depression in mouse. *Farmacologia* 2013; 61(6):1102-16.
- Nitulescu G, Nicorescu I, Olaru OT, Ungurianu A, Mihai D, Zanfirescu A, Nitulescu GM, Margina D. Molecular Docking and Screening Studies of New Natural Sortase A Inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 18: 2217-, 2017.
- Niţulescu G.M., Draghici C., Chifiriuc M.C., Marutescu L., Bleotu C., Missir A.V., Synthesis and antimicrobial screening of N-(1-methyl-1Hpyrazole- 4-carbonyl)-thiourea derivatives, *Med. Chem. Res.*, 2012;21(3):308-314.
- Olaru OT, Venables L, van de Venter M, Nitulescu GM, Margina D, Spandidos DA, Tsatsakis AM. Anticancer potential of selected *Fallopia* Adans species. *Oncology Letters*, 10(3): 1323-1332, 2015.
- Perez-Urrutia N, Mendoza C, Alvarez-Ricartes N, Oliveros-Matus P, Echeverria F, Grizzell JA, Barreto GE, Iarkov A, Echeverria V. Intranasal cotinine improves memory, and reduces depressive-like behavior, and GFAP+ cells loss induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol*. 2017 Sep;295:211-221. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.016.
- Puranik R, Celermajer DS. Smoking and endothelial function. *Prog. Cardiovasc. Dis* 2003;45:443–458. [PubMed: 12800127]
- Quik M, Wonnacott S. Nicotinic Acetylcholine Receptors As Drug Targets for Parkinson's Disease. *Pharmacol Rev*. 2011;63(4):938–966.
- Riveles K, Huang LZ, Quik M. Cigarette smoke, nicotine and cotinine protect against 6-hydroxydopamine-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Neurotoxicology*. 2008;29(3):421-7. doi: 10.1016/j.neuro.2008.02.001.
- Runkel M., *Metabolic and analytical interactions of grapefruit juice and 1,2- benzopyrene (cumarin) in human*, 1997, [PubMed: 9476043]
- Sandberg K, Poole S, Hamdan A, Arbogast P, Sundell H. *Altered Lung Development after Prenatal Nicotine Exposure in Young Lambs*. *Pediatr Res* 2004;56:432-
- Schaal C, Chellappan SP. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Mol Cancer Res*. 2014;12(1):14-23. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0541.
- Şeremet O.C., Olaru O.T., Bălălaşu D., Negreş S., The effect of pyrrolizidine alkaloids from certain plant extracts on *Lactuca sativa* radicle growth, *Romanian, J. Biophys.*, 2014;24(1):1.
- Shiffman S., Gitchell J., Pinney J., Burton J., Burton S., Kemper K., Lara E., Public health benefit of over-the-counter nicotine medications, 1997, 6:306-10. [PubMed:9583628]
- Socea LI, Barbuceanu SF, Socea B, Draghici C, Apostol TV, Pahontu EM, Olaru OT- New Heterocyclic Compounds from 1, 2, 4-triazoles Class with Potential Cytotoxic Activity. 2017, *Revista de Chimie*, 68(11), 2503-2508.
- Stott L.C., Schnell S., Hogstrand C., Owen S.F., Bury N.R. A primary fish gill cell culture model to assess pharmaceutical uptake and efflux: evidence for passive and facilitated transport. *Aquat. Toxicol*. 2015;159:127–137
- Swan G., Benowitz N., Lessov C., Jacob P., Tyndale R., Wilhelmsen K., *Nicotine metabolism: the impact of CYP2A6 on estimates of additive genetic influence*, 2005, 15:115-25.[PubMed:15861035]
- Talarowska M, Gałęcki P, Maes M, Orzechowska A, Chamielec M, Bartosz G, Kowalczyk E. Nitric oxide plasma concentration associated with cognitive impairment inpatients with recurrent depressive disorder. *Neurosci. Lett.*, 2012; 510: 127–131
- Tanner, C., Goldman M., Aston A., Ottman, R., Ellenberg, J., Mayeux, R., et al. (2002).

- Smoking and Parkinson's disease in twins. Neurology*, 58(4), 581–588.
- Tonstad S, Tonnesen P, Hajek P, Williams K, Billing C, Reeves K. *Effect of maintenance therapy with varenicline on smoking cessation: a randomized controlled trial*. 2006;296:64–71. [PubMed: 16820548]
- Tuchila C, Baconi DL, Dinu Pirvu C, Balalau DO, **Vlăsceanu AM**, Stan M, Balalau C. Therapeutic Drug Monitoring and Methods of Quantitation for Carbamazepine. *Journal of Mind and Medical Sciences*, 2017; 4(2), Article 4. DOI: 10.22543/7674.42.P100114
- Villégier AS, Lotfipour S, McQuown SC, Belluzzi JD, Leslie FM. Tranlycypromine enhancement of nicotine self-administration. *Neuropharmacology* 2007;52:1415–1425.
- Vlădău AM**, Petraru C, Ciobanu AM, Barca M, Balalau D, Baconi DL. HPLC method for cotinine quantification in human plasma and urine. *Toxicology Letters*, 229S: S216 (2014)
- Vlăsceanu A. M.**, Baconi D.L., Ciobanu A.M., Constantin V.D., Ples L., Bălălaşu C., Stan M., *Journal of Mind and Medical Sciences*, 5, 2018, p.15.
- Vlăsceanu A.M.**, Petraru C., Baconi D., Ghica M., Arsene A., Popa L., Nicolae A., Drăgoi C.M., Păvălache G., *Farmacia*, 6, 2015, p. 349.
- Vlăsceanu AM**, Petraru C, Baconi D, Ghica M, Arsene A, Popa L, Nicolae A, Drăgoi C, Pavalache G. Quantitative relationships of urinary cotinine levels in smoking diabetic patients. *Farmacia* 2015; 63(3): 349 - 356.
- Vlăsceanu AM**, Petraru C, Baconi D, Ghica M, Arsene A, Popa L, Nicolae A, Drăgoi C, Pavalache G. Quantitative relationships of urinary cotinine levels in smoking diabetic patients. *Farmacia*, 2015, 63(3): 349 - 356
- Vlăsceanu Ana Maria**, Octavian Tudorel Olaru, Cristian Tuchila, George Mihai Nitulescu, Daniela Luiza Baconi. Development of a HPLC-DAD method to evaluate the bioaccumulation of nicotine and cotinine by *Daphnia magna*. *Toxicology Letters*, 2016, 238 (2S) S329s.
- Vlăsceanu Ana Maria**, Octavian Tudorel Olaru, George Mihai Nitulescu, Daniela Baconi. Evaluation of the toxicity of nicotine and its metabolite cotinine on crustacean *Daphnia magna*. *Toxicology Letters*, 2015, 238 (2S) S329
- Williams JM^b, Gandhi KK, Benowitz NL. Carbamazepine but not valproate induces CYP2A6 activity in smokers with mental illness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(10):2582-9. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0384.
- Yanbaeva DM, Dentener ME, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest*, 2007; 131:1557–1566.
- Zhou Y, Gu X, Ashayeri E, Zhang R, Sridhar R. Nicotine decreases the cytotoxicity of doxorubicin towards MCF-7 and KB-3.1 human cancer cells in culture. *Journal of the National Medical Association*. 2007;99(4):319-27.
- Zovko A, Viktorsson K, Lewensohn R, Kološa K, Filipič M, Xing H, Kem WR, Paleari L, Turk T. APS8, a polymeric alkylpyridinium salt blocks $\alpha 7$ nAChR and induces apoptosis in non-small cell lung carcinoma. *Mar Drugs*. 2013;11(7):2574-94. doi: 10.3390/md11072574.

Lista de lucrări din tema de cercetare a tezei de doctorat

Lucrări publicate în reviste ISI :

1. **Ana Maria Vlăsceanu**, Cornel Chiriță, Dragoș Mihai, Cristina Daniela Marineci, Miriana Stan, Cristian Bălălău, Daniela Grădinaru, Daniela Baconi – Comparative study on the Psychoactive Effects of nicotine and cotinine, *Revista de chimie*, 2019, 70(5): 1114-1117.
2. **Ana Maria Vlăsceanu**, Constantin Petraru, Daniela Baconi*, Mihaela Ghica, Andreea Arsene, Lăcrămioara Popa, Alina Nicolae, Cristina Drăgoi, Georgeta Pavalache - Quantitative relationships of urinary cotinine levels in smoking diabetic patients. *Farmacia*, 2015, 63(3): 349 – 356
3. **Vlăsceanu AM**, Baconi DL, Ciobanu AM, Constantin VD, Pleș L, Bălălău C, Stan M. HPTLC assay of nicotine and cotinine in biological samples. *J Mind Med Sci.*, 2018; 5(2): 244-249. DOI: 10.22543/7674.52.P244249
4. **Vlăsceanu Ana-Maria**, Baconi Daniela Luiza, Galateanu Bianca, Stan Miriana, Balalau Cristian - Comparative cytotoxicity study of nicotine and cotinine on MRC-5 cell line. *Journal of Mind and Medical Sciences*, 2018, 5(1): 117 – 122. doi: 10.22543/7674.51.P117122
5. Baconi DL, Ciobanu AM, **Vlăsceanu AM**, Cobani OD, Negrei C, Balalau C - Current concepts on drug abuse and dependence. *Journal of mind and medical sciences*, 2015;II(1):18-33
6. Cristian Tuchilă, Daniela Baconi, Valentina Anuța, Cristina Elena Dinu-Pîrvu, **Ana-Maria Vlăsceanu**, Cristian Bălălău, Maria Magdalena Constantin, Miriana Stan - Development of a high performance chromatographic method for therapeutic drug monitoring of carbamazepine based on an experimental design approach. *Farmacia*, 2018, 66(3): 452 – 462
7. Baconi D, Popescu G, Ciobanu AM, Stan M, **Vlăsceanu AM**, Balalau C - EDDP metabolite as biomarker for monitoring of methadone substitution treatment. *Farmacia*, 2016, 64(4): 521-527
8. Tuchila Cristian, Baconi Daniela Luiza, Dinu Pîrvu Cristina, Balalau Denisa O, **Vlăsceanu Ana Maria**, Stan Miriana, Balalau Cristian - Therapeutic Drug Monitoring and Methods of Quantitation for Carbamazepine, *Journal of Mind and Medical Sciences*, 2017, 4(2): 100-114 doi: 10.22543/7674.42.P100114.

Capitole in carti de specialitate în edituri internaționale:

1. Mirela Nedelescu, Daniela Baconi, Miriana Stan, **Ana-Maria Vlăsceanu** and Anne-Marie Ciobanu -Integrating Ecosystem Services in Historically Polluted Areas: Bioremediation Techniques for Soils Contaminated by Heavy Metals. In Levente Hufnagel (Ed.) *Ecosystem Services and Global Ecology*, 2018, Intech Open, Chapter 10, 195 – 213 (DOI: 10.5772/intechopen.75054)

2. Baconi DL, Ciobanu AM, Vasile R D, **Vlăsceanu AM**, Nedelescu M, Stan M - Methadone treatment for heroin dependence. In Fang Zhao (Ed) Drug Addiction (ISBN 978-1-78923-371-1), 2018, Intech Open, Chapter 7, 117- 133 (DOI: 10.5772/intechopen.78066)
3. Daniela Baconi, Miriana Stan, **Ana Maria Vlăsceanu** – A new approach to the toxicological profile of hallucinogens. In Leon V. Berhardt (Ed.) Advances in Medicine and Biology Nova Science Publishers Inc., 2017, vol. 125: 45 - 86 (ISBN: 978-1-53612-740-9)

Lucrari publicate in volumele unor Conferinte (Proceedings, cu ISBN)

1. Baconi Daniela Luiza, Vasile Robert, Ghica Mihaela, Popa Lăcrămioara, Stan Miriana, **Vlăsceanu Ana-Maria**, Bălălău Cristian, Păunică Ioana, Motofei Cătălina, Ciobanu Anne-Marie. Quantitative Relationships Of Methadone Plasma Levels In Patients Under Methadone Substitution Therapy, *Proceedings Of The International Conference On Translational And Integrative Medicine* (Bucharest, Romania, 22-25 May 2018), 30-36 FilodirittoDoi: 1025083/Ictim/2018 Isbn 978-88-85813-34-2
2. Nedelescu Mirela, Baconi Daniela, Ciobanu Anne-Marie, **Vlăsceanu Ana-Maria**, Bălălău Cristian, Motofei Ion, Diaconu Camelia, Păunică Mihai, Stan Miriana. Mechanisms Of Lead Toxicity: Case Reports Of Occupational Lead Poisoning, *Proceedings Of The International Conference On Translational And Integrative Medicine* (Bucharest, Romania, 22-25 May 2018), 65 -71 FilodirittoDoi: 1025083/Ictim/2018 ISBN978-88-85813-34-2
3. Ciobanu Anne-Marie, Hîrjău Mircea, Lupuliasa Dumitru, Bârcă Maria, Burcea-Dragomiroiu George, Stan Miriana, **Vlădău Ana Maria**, Baconi Daniela Luiza, Bălălău Cristian, Motofei Ion, Pop Anca Lucia. In Vivo Preliminary Testing Of Some Scars Treatment Ointment Formulations With Hyaluronic Acid, *Proceedings Of The International Conference On Translational And Integrative Medicine* (Bucharest, Romania, 22-25 May 2018), 12-18 FilodirittoDoi: 1025083/Ictim/2018 Isbn 978-88-85813-34-2

Lucrări publicate în reviste indexate BDI

1. Raluca Ganea, Cristian Tuchilă, Carolina Negrei, Miriana Stan, **Ana-Maria Vlăsceanu**, Daniela Baconi - HPLC-FL method for fluoxetine quantification in human plasma. *Romanian Journal of Cognitive Behavioral Therapy and Hypnosis*, 2015, 2(4): 20 – 30

Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale, publicate în rezumat în reviste ISI

1. **Vlasceanu AM**, Chirita C, Mihai DP, CD Marineci, M Stan, D Gradinaru, D Baconi - Psychotropic effects of nicotine and cotinine in mice. 54th Congress of the European Societies of Toxicology, Eurotox 2018, Brussels, Belgium, 2 – 5 September 2018, rezumat publicat în Toxicology Letters (ISSN 0378-4274, IF 3.858/2016, IF 3.858/2016), 2018, 295 S1: S 262
2. **Vlăsceanu AM**, Gradinaru D, Stan M, Baconi D - Effects of active and passive smoking on serum oxidative stress biomarkers in psychiatric patients. 38th International Congress of the European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists, Bucharest, 22 – 25 May, 2018, rezumat publicat în Clinical Toxicology (ISSN: 1556-3650, IF 4.381/2017), 2018 56(6): 514-515
3. **Ana Maria Vlasceanu**, Octavian Tudorel Olaru, Cristian Tuchila, George Mihai Nitulescu, Daniela Luiza Baconi - Development of a HPLC-DAD method to evaluate the bioaccumulation of nicotine and cotinine by *Daphnia magna* - 52-st Congress of the European Societies of Toxicology, Eurotox 2016, Seville, Spain, 04-07 September 2016, rezumat publicat în Toxicology Letters (ISSN 0378-4274, IF 3.858/2016), 2016
4. **Ana Maria Vlăsceanu**, Octavian Tudorel Olaru, George Mihai Nitulescu, Daniela Baconi - Evaluation of the toxicity of nicotine and its metabolite cotinine on crustacean *Daphnia magna*- 51-st Congress of the European Societies of Toxicology, Eurotox 2015, Porto, Portugal, 13-16 September 2015, rezumat publicat în Toxicology Letters (ISSN 0378-4274, IF 3.522/2015), 2015, 238 (2S) S329
5. **Vlădău Ana Maria**, Petraru Constantin, Ciobanu Anne-Marie, Barca Maria, Balalau Dan, Baconi Daniela Luiza - HPLC method for cotinine quantification in human plasma and urine. 50-st Congress of the European Societies of Toxicology, Eurotox 2014, Edinburgh, 7-10 September 2014, rezumat publicat în Toxicology Letters (ISSN 0378-4274, IF 3.262/2014), 2014, 229S: S126