

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

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

**Dezvoltarea de terapii inovative în tulburările
menopauzale**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DENISA IOANA UDEANU

Student-doctorand:

OPRESCU (CRIȘAN) SIMONA

2025

Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București

Strada Dionisie Lupu nr. 37 București, Sector 2, 020021 România, Cod fiscal: 4192910

Cont: RO57TREZ70220F330500XXXX, Banca: TREZORERIE sect. 2

+40.21 318.0719; +40.21 318.0721; +40.21 318.0722

www.umfcd.ro

Cuprins

Lista cu lucrările științifice publicate	3
Lista cu abrevieri și simboluri	5
Introducere	6
I. PARTEA GENERALĂ	9
1. Strategia actuală în terapiile hormonale și nonhormonale în menopauză	10
1.1. Introducere	10
1.2. Date epidemiologice privind menopauza	11
1.3. Terapia hormonală a menopauzei	13
1.3.1. Estrogenii în terapia menopauzei	13
1.3.1.1. Managementul simptomelor urogenitale în menopauză	13
1.3.1.2. Managementul bolilor cardiovasculare în menopauză	14
1.3.1.3. Managementul simptomelor neuropsihologice ale menopauzei	17
1.3.1.4. Gestionarea simptomelor musculo-scheletice în menopauză	18
1.3.2. Progestogenii în terapia menopauzei	19
1.3.3. Modulatori selectivi ai receptorilor estrogenici (SERM) în terapia menopauzei	19
1.3.3.1. Gestionarea simptomelor menopauzei cu Ospemifene	19
1.3.3.2. Managementul simptomelor menopauzei cu estrogeni conjugați/ Bazedoxifen	20
1.4. Terapia non – hormonală a menopauzei	21
1.4.1. Managementul simptomelor menopauzei cu bifosfonați	21
1.4.2. Gestionarea simptomelor menopauzei cu kisspeptine	23
2. Terapia menopauzei în practica curentă	24
2.1. Discuții	24
2.2. Extracte standardizate din plante benefice în terapia menopauzală	27
2.3. Concluzii	28
II. CONTRIBUȚII PERSONALE. PARTEA EXPERIMENTALĂ	29
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	30
4. Metodologia generală a cercetării	31
5. Studii farmaceutice de dezvoltare a unui supliment alimentar cu structură nanolipidică, benefic în terapia menopauzală.	32
5.1. Introducere (Ipoteza de lucru și obiectivele specifice)	32
5.2. Materiale și metode	34
5.3. Rezultate și discuții	41
5.3.1. Rezultatele studiilor de preformulare	41
5.3.2. Formularea și optimizarea produsului finit	50
5.3.3. Rezultatele scalării procesului de la scară de laborator la scară pilot	53
5.3.4. Rezultatele Controlului calității nanoformelor selectate din lotul pilot	54
5.4. Concluzii	59

6. Siguranța formulărilor orale nanoîncapsulate cu molecule bioactive utilizate în tratamentul menopauzei	60
6.1. Introducere (Ipoteza de lucru și obiectivele specifice).....	60
6.2. Materiale și metode	63
6.2.1. Testarea citotoxicității – studiu <i>in vitro</i>	64
6.2.2. Determinarea genotoxicității – studiu <i>in vitro</i>	65
6.2.3. Teste <i>in vivo</i> pe model de femele de șobolani cu menopauză indusă	66
6.2.4. Teste de laborator pentru determinarea parametrilor biochimici.....	70
6.3. Rezultate și discuții	72
6.3.1. Testarea citotoxicității (viabilitatea celulară)	72
6.3.2. Testul de genotoxicitate.....	72
6.3.3. Teste <i>in vivo</i> pe un model de femele de șobolan – menopauză indusă.....	73
6.3.4. Rezultatele testelor de laborator	76
6.4. Concluzii	98
7. Studiu comparativ de dizolvare a unei forme farmaceutice ce conține un purtător lipidic nanostructurat (NLC) pe bază de disogenină în medii de dizolvare convenționale versus medii biorelevante	104
7.1. Introducere (Ipoteza de lucru și obiectivele specifice).....	104
7.2. Materiale și metode	108
7.3. Rezultate și discuții	114
7.4. Concluzii	120
8. Concluzii și contribuții personale.....	121
Bibliografie	125
Anexe	141

Lista cu lucrările științifice publicate

1. **Crisan S.**, Pop A. L., Hentes P., Lacatusu I., Badea N., Zetu C., A. M. Ciobanu, Penes O. N., Varlas V., Ozon E. A., Udeanu, D. I., Pre-formulation, formulation and pilot scale-up studies to establish the qualitative and quantitative composition of an innovative nanoform dietary supplement for menopausal therapy *Farmacia*, 2024, 72(2), <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.2.15>, (IF - 1.4 AP – PA/2 equal contribution)
2. **Crisan, S.**; Pop, A.L.[†]; Lacatusu, I.; Badea, N.; Mustaciosu, C.; Radu, M.; Varlas, V.N*.; Peneș, O.N.*; Ciobanu, A.M.; Ghica, M.; et al. Safety of Innovative Nanotechnology Oral Formulations Loaded with Bioactive Menopause Molecules: Influence of Genotoxicity and Biochemical Parameters on a Menopausal Rat Model. *Nutrients* 2023, 15, 4951. <https://doi.org/10.3390/nu15234951> IF 5,9 AP/2
3. Pop, A.L.; Nasui, B.A.; Bors, R.G.; Penes, O.N.; Prada, A.G.; Clotea, E.; **Crisan, S.**; Cobelschi, C.; Mehedintu, C.; Carstoiu, M.M.; et al. The Current Strategy in Hormonal and Non-Hormonal Therapies in Menopause—A Comprehensive Review. *Life* 2023, 13, 649. <https://doi.org/10.3390/life13030649> AP
4. Pop, A.L., S.**Crisan**, P.Henteș, M.-A. Pali, I. Lacatusu, N. Badea, A. M. Ciobanu, O. N. Penes, B. A. Nasui*, D. I. Udeanu Comparative dissolution study of a solid pharmaceutical form containing nanostructured lipid carrier (NLC), incorporating diosgenin – conventional vs. biorelevant dissolution media. *Farmacia*, 2023, Vol 71, 1FI 1,433 <http://dx.doi.org/10.31925/farmacia.2023.1.15> AP
5. Iordache, T. A., Badea, N., Mihaila, M., **Crisan, S.**, Pop, A. L., & Lacatusu, I. (2023). Polygonum cuspidatum Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Dual Inhibition of TNF- α -and IL-6 Cytokines and Free Radical Species. *Materials*, 16(9), 3492.APc IF 3,4 Q2 <https://doi.org/10.3390/ma16093492>
6. Pop, A. L., Musuc, A. M., Nicoară, A. C., Ozon, E. A., **Crisan, S.**, Penes, O. N., & Secăreanu, A. A. (2022). Optimization of the Preformulation and Formulation Parameters in the Development of New Extended-Release Tablets Containing Felodipine. *Applied Sciences*, 12(11), 5333. (IF2,838) - articol zona galbena Q2 <https://doi.org/10.3390/app12115333>
7. Pop, A.L., Henteș, P., Pali M-A, Oșanu L., Ciobanu A-M, Nasui B.A., Mititelu M, **Crisan S.**, Peneș O.N., Study Regarding A New Extended-Release Calcium Ascorbate And Hesperidin Solid Oral Formulation, *Farmacia*, 2022, Vol. 70, 1, <http://dx.doi.org/10.31925/farmacia.2022.1.22> (IF1,4)
8. Casian T, Iurian S, Gâvan A, Porfire A, Pop AL, **Crisan S**, Pușcaș AM, Tomuță I. In-

- Depth Understanding of Granule Compression Behavior under Variable Raw Material and Processing Conditions. *Pharmaceutics*. 2022; 14(1):177. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010177> (IF 6,321) - articol zona rosie Q1
9. Iordache, T.-A.; Badea, N.; Mihaila, M.; **Crisan**, S.; Pop, A.L.; Lacatusu, I. Challenges in Coopted Hydrophilic and Lipophilic Herbal Bioactives in the Same Nanostructured Carriers for Effective Bioavailability and Anti-Inflammatory Action. *Nanomaterials* 2021, 11, 3035. <https://doi.org/10.3390/nano11113035>
 10. Pop, A.L.; **Crisan**, S.; Bârcă, M.; Ciobanu, A.-M.; Varlas, V.N.; Pop, C.; Pali, M.-A.; Cauni, D.; Ozon, E.A.; Udeanu, D.; Trifu, S.; Năsui, B.A. Evaluation of Dissolution Profiles of a Newly Developed Solid Oral Immediate-Release Formula Containing Alpha-Lipoic Acid. *Processes* 2021, 9, 176. doi: 10.3390/pr9010176, <https://doi.org/10.3390/pr9010176> (IF 2,753)
 11. A.-M.Ciobanu, A. L. Pop, S. **CRISAN**, M. Pali, G.T. A Burcea-Dragomiroiu, D. E. Popa, D. Lupuliasa, M. BÂRCĂ, HPLC studies for assessing the stability of carvedilol tablets, *FARMACIA*, 2017, Vol. 65, 4, 523 (IF 1,507)

Sursă de finanțare:

Prezenta Teză de doctorat a fost realizată în cadrul Proiectului ID SMIS 120906, contract nr. 259/16.06.2020, finanțat de Uniunea Europeană prin Programul Operațional Competitivitate 2014–2020, cu sprijinul Centrului de Cercetare-Dezvoltare din cadrul Companiei Farmaceutice AC HELCOR. Finanțatorii nu au avut niciun rol în conceperea studiului, în colectarea, analiza sau interpretarea datelor, în redactarea manuscrisului sau în decizia de publicare a rezultatelor.

Introducere

Menopauza este o etapă fiziologică naturală în viața unei femei, însă modificările hormonale asociate acesteia pot determina o serie de manifestări neplăcute care afectează calitatea vieții.

Această teză își propune dezvoltarea unui produs inovator pe bază de extracte standardizate din plante, destinat femeilor aflate la menopauză, ca o completare a terapiilor convenționale. Soluția propusă are următoarele atribute principale:

- **Utilizarea unei tehnologii avansate, bazată pe nanotehnologie**, pentru îmbunătățirea absorbției și eficacității compușilor activi.
- **Integrarea produsului în planul de alimentație**, oferind un aport optim de principii nutritive esențiale sub forma unui supliment alimentar.
- **Rolul preventiv în sănătate**, prin susținerea echilibrului hormonal și protecția împotriva complicațiilor asociate menopauzei.
- **Accesibilitatea**, astfel încât beneficiile produsului să fie disponibile pentru un număr cât mai mare de persoane.

Teza este structurată în două părți principale: **Partea generală**, care cuprinde fundamentele teoretice și analiza literaturii de specialitate, și **Partea de contribuții personale**, ce reunește ipoteza de lucru, obiectivele generale și specifice ale cercetării, metodologia aplicată și prezentarea rezultatelor obținute în cadrul studiilor experimentale realizate, pe parcursul a celor 8 capitole.

I. PARTEA GENERALĂ

1. Strategia actuală în terapiile hormonale și nonhormonale în menopauză

1.1. Terapia hormonală și nonhormonale

Majoritatea femeilor aflate la menopauză prezintă o serie de simptome, însoțite de modificări fiziologice ale organelor de reproducere și tulburări psiho-afective, cu implicații negative semnificative. Această schimbare este percepută negativ pentru comportamentul femeii și este asociată cu procesul de îmbătrânire [1].

Prezenta analiză își propune să investigheze cele mai recente cercetări publicate cu privire la (a) evaluarea datelor epidemiologice la femeile aflate la menopauză, prin rapoartele înregistrate în ultimii zece ani; (b) studiile recente privind HRT și noile terapii medicale emergente.

Studiile care au determinat riscurile și beneficiile terapiei de substituție hormonală au avut rezultate inconsecvente. O revizuire sistematică și o meta-analiză recente, publicate în 2015, indică faptul că HRT nu crește mortalitatea din toate cauzele sau din cauze specifice (cardiovasculare, accident vascular cerebral, cancer) [11].

1.1.1. Estrogenii în terapia hormonală a menopauzei

Disfuncția sexuală este frecventă la femeile cu sindrom uro-genital al menopauzei. Astfel, estrogenul vaginal poate fi un tratament eficient pentru sindromul genito-urinar.

Astfel, există mai multe scheme terapeutice pentru ameliorarea simptomelor uro-genitale. Tratamentul actual se bazează pe estrogeni topici singuri [18–22] sau combinați cu testosteron [14,23], care au arătat îmbunătățiri în timp în domeniile troficității vaginale, excitației, orgasmului și satisfacției (Anexa 1-tabelul 1.). Schema combinată estrogen-progesteron a scăzut rata simptomelor de atrofie urogenitală și frecvența și severitatea bufeurilor [31].

Modificările endocrine și metabolice care apar în tranziția către menopauză pot accelera riscul de boli cardiovasculare induse de hipertensiunea arterială. Conform Asociației Americane a Inimii, inițierea terapiei hormonale pentru menopauză la femeile sub 60 de ani sau în termen de 10 ani de la menopauză este singura metodă profilactică de reducere a riscului de boli cardiovasculare [32].

Deși datele indică faptul că HRT este asociată cu efecte pozitive asupra sistemului cardiovascular la femeile aflate la menopauză, rămâne încă o întrebare dacă aceste efecte variază în funcție de momentul inițierii tratamentului.

Studiul ELITE-Cog (dovezi de clasa I) a investigat dacă terapia cu estradiol inițiată în primii șase ani de menopauză are un impact diferit asupra **simptomelor neuropsihologice**

ale menopauzei decât atunci când este inițiată zece sau mai mulți ani mai târziu. Participanții au primit 17p-estradiol oral (1 mg / d) sau un placebo la un singur centru medical academic (Universitatea din California de Sud). În plus, femeile cu uter au fost, de asemenea, repartizate la progesteron ciclic micronizat (45 mg) ca gel vaginal 4% sau gel placebo, o aplicare zilnică timp de zece zile pe ciclu de 30 de zile. Studiul a arătat că estradiolul inițiat în termen de șase ani de la menopauză nu afectează memoria verbală, funcțiile executive sau cogniția globală în mod diferit de tratamentul care a început la zece sau mai mulți ani după menopauză. În plus, estradiolul nu îmbunătățește sau nu dăunează acestor abilități cognitive indiferent de timpul scurs de la menopauză [53].

1.1.2. Progestogenii în terapia hormonală menopauzei

Progesteronul este, de obicei, administrat în combinație cu estrogenul în tratamentul hormonal. Puține studii au investigat efectele progesteronului singur asupra simptomelor menopauzei. Majoritatea acestor studii s-au axat pe efectele progestogenelor asupra calității somnului.

1.1.3. Terapia cu Ospemifen sau Bazedoxifenul/estrogen

Ospemifenul este un agonist/antagonist selectiv al receptorului estrogenic oral aprobat de FDA. Indicațiile pentru utilizarea ospemifenei sunt dispareunia moderată sau severă, iar medicamentul a fost recent aprobat pentru uscăciunea vaginală moderată/severă, care este un simptom frecvent al atrofiei vulvovaginale [72].

Bazedoxifenul/estrogen – forma conjugată (CE/BZA) este primul medicament aprobat de FDA, care include estrogeni conjugați cu un agonist/antagonist estrogenic (bazedoxifen) [74]. Diverse studii au investigat modul în care CE/BZA influențează atât calitatea vieții, cât și sănătatea, arătând că complexul medicamentos are efecte benefice asupra diferitelor simptome legate de menopauză.

1.1.4. Terapia non – hormonală

Bisfosfonații (BP) sunt agenți farmaceutici cheie care acționează împotriva pierderii osoase mediate de osteoclaste. Astfel, cea mai frecventă afecțiune medicală pentru care se utilizează BP este osteoporoza în menopauză - o patologie care în România s-a demonstrat că apare cu zece ani mai devreme decât limita acceptată la nivel internațional [78].

Kisspeptinele reglează eliberarea hormonilor de reproducere, peptide codificate de gena KISS1 [92], un regulator cheie al neuronilor hipotalamici ai hormonului de eliberare a gonadotropinei (GnRH); descoperirea lor a condus la investigarea rolului kisspeptinei în tulburările de reproducere și a potențialului de țintire terapeutică a sistemului kisspeptinei

(KISS1R) [93]. În prezent, GnRH/gonadotropinele investigate sunt Fezolinetant, MVT-602, Linzagolix.

Extrakte standardizate din plante benefice în terapia menopauzală

Interesul pentru utilizarea extractelor vegetale în gestionarea simptomelor menopauzale a crescut semnificativ în ultimele decenii, pe fondul preocupărilor legate de siguranța terapiilor hormonale convenționale. Numeroase plante medicinale conțin principii active, în special fitoestrogeni, flavonoide sau glicozide triterpenice, ce pot imita efectele estrogenilor endogeni, contribuind la ameliorarea simptomelor vasomotorii, metabolice sau psihoneurologice asociate cu menopauza.

Extraktele asupra cărora ne-am concentrat în lucrarea de față, precum și principiile active care stau la baza standardizării acestora, alături de codificarea lor care se va regăsi pe parcursul lucrării, sunt prezentate în tabelul 2.1. de mai jos.

Tabel 2.1. Extrakte vegetale standardizate studiate

Cod/ nr.	Denumire extract vegetal		Denumire științifică	Principiu activ	Standardizare (%)
EVeg 1	Extract negru		<i>Cimicifuga racemosa</i>	Triterpenoide glicozide	2,5%
EVeg 2	Extract de trifoi roșu		<i>Trifolium pratense</i>	Isoflavone (biochanin A, B- formononetin)	40%
EVeg 3	Extract din rădăcină de trestie asiatică		<i>Polygonum cuspidatum</i>	Resveratrol	50%
EVeg 4	Extract de soia		<i>Glycine max</i>	Izoflavone (genistein)	40%
EVeg 5	Extract de lemn dulce		<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Acid glicirizic	10%
EVeg 6	Extract de hamei		<i>Humulus lupulus</i>	8- prenilnaringenin (8-PN)	—
DSG	Extract de yam sălbatic		<i>Dioscorea villosa</i>	Diosgenină	6% / 95% (DSG)

1.2. Concluzii

Menopauza este o perioadă fiziologică din timpul vieții unei femei, însoțită de un spectru larg de simptome care pot altera calitatea vieții unui adult pe deplin activ; utilizarea TSH, cea mai valoroasă resursă terapeutică pentru creșterea calității vieții la femeile aflate la menopauză, este limitată la simptomele moderate și severe. În plus, multe femei aleg să nu utilizeze MHT din cauza fricii de cancer sau a altor efecte negative. Din păcate, nu există nicio terapie pe deplin satisfăcătoare, astfel încât căutarea viitoare a unor opțiuni mai bune sau complementare este esențială. Cunoașterea celor mai recente actualizări privind aceste subiecte va ajuta cadrele medicale să obțină mai bine beneficiul terapiei, să trateze femeile în limitele de siguranță și să acceseze toate resursele terapeutice disponibile privind menopauza pentru a aborda problema de sănătate încă nerezolvată a femeii adulte active.

Femeile în menopauză precoce, cu simptome prezente, pot beneficia de TSH în condiții de siguranță și cu eficiență dovedită clinic, permițând îmbunătățirea calității vieții. Un rol important în menopauză în ceea ce privește strategia terapeutică este reprezentat de încrederea în administrarea terapiei hormonale atât în rândul pacientelor, cât și în rândul medicilor.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE. PARTEA EXPERIMENTALĂ

2. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

În contextul nevoii crescânde de alternative naturale, sigure și eficiente pentru managementul simptomelor menopauzale, această cercetare pornește de la **ipoteza** că utilizarea structurilor nanolipidice (NLC) ca vectori pentru principii active vegetale poate reprezenta o strategie inovatoare pentru dezvoltarea unui supliment alimentar cu administrare orală, cu biodisponibilitate crescută și profil farmacologic optimizat.

Lacunele identificate în literatura de specialitate – legate de fezabilitatea tehnologică a încorporării simultane a compușilor activi lipofili și hidrofil în formulări solide pe bază de NLC, de scalabilitatea acestor formulări, de profilul de dizolvare în medii biorelevante sau convenționale și de siguranța acestora în administrarea orală – au ghidat stabilirea obiectivului științific principal:

Obiectivul general al cercetării constă în dezvoltarea, caracterizarea, optimizarea și evaluarea *in vitro* și *in vivo* a unui produs finit în formă farmaceutică solidă orală, ce conține o matrice nanolipidică încărcată cu principii active de origine vegetală – diosgenină, acid glicirizic, triterpene glicozidice, polifenoli, izoflavone – destinat susținerii stării de sănătate în perioada menopauzei.

3. Metodologia generală a cercetării

Cercetarea a fost structurată într-o succesiune logică de etape, de la nivel teoretic și conceptual până la validarea experimentală a formulării propuse. Planul general de cercetare a inclus următoarele componente majore:

- 1. Documentare științifică sistematică** privind menopauza, terapia fitogenică, extractele standardizate de Yam sălbatic - *Dioscorea villosa*, Lemn dulce - *Glycyrrhiza glabra*, Trifoi roșu - *Trifolium pratense*, Cohosh negru - *Cimicifuga racemosa*, Troscot japonez - *Polygonum cuspidatum*, Soia - *Glycine max*, Hamei - *Humulus lupulus* precum și tehnologiile moderne de formulare (în special asupra formulărilor farmaceutice solide cu administrare orală ce conțin sistemelor nanolipidice).
- 2. Formularea experimentală a structurilor nanolipidice (NLC):** Etapă care a presupus (1) Selecția excipienților lipidici, emulsifianților și setarea condițiilor tehnologice, (2) Obținerea dispersiei coloidale prin omogenizare la înaltă presiune/ omogenizare prin forfecare, (3) Încapsularea simultană a diosgeninei și acidului glicirizinic; (4) Stabilizarea formulării prin liofilizare.
- 3. Obținerea formei farmaceutice solide orale:** activitățile principale au vizat (1) Selectarea excipienților adecvați pentru comprimare; (2) Evaluarea procesului tehnologic de transformare a pulberii liofilizate în formă solidă (comprimat/capsulă); (3) Testarea scalabilității procesului de fabricație.
- 4. Caracterizarea fizico-chimică și biofarmaceutică a formulelor** prin (1) Analiza dimensiunii particulelor, potențialului zeta, morfologiei și gradului de încapsulare – asupra NLC; (2) Studiul profilului de dizolvare în medii convenționale și biorelevante; (3) Evaluarea stabilității formulei.
- 5. Evaluarea siguranței preclinice prin:** (1) Teste de genotoxicitate (ex. testul cu micronuclei) și (2) Determinarea influenței produsului asupra parametrilor biochimici ai șobolanilor ovariectomizați, urmărind:

Profilul lipidic (TG, Chol, HDL)

Markerii glicemici (Gli)

Markerii osoși (Pac, Palc, Ca, fosfor)

Markerii renali (Crea, uree, URAC)

Inflamația (TNF)

Stresul oxidativ (GSH, MDA)

Profilul hormonal estrogen-progesteron.

4. Limitele cercetării și direcții viitoare

Cercetarea prezentă a demonstrat fezabilitatea tehnologică a formulării unei forme farmaceutice solide cu administrare orală ce conține o structură nanolipidică (NLC) pe bază de extracte vegetale, precum și potențialul lor terapeutic în contextul menopauzei. Cu toate acestea, anumite limitări trebuie menționate:

1. Lipsa restabilirii homeostaziei hormonale: Deși tratamentele testate au influențat pozitiv markerii inflamatori și metabolici, ele nu au reușit să normalizeze nivelurile hormonale
2. Evaluarea limitată a markerilor biologici: Studiul s-a concentrat pe un număr restrâns de biomarkeri, ceea ce oferă o perspectivă parțială asupra efectelor sistemice.
3. Durata redusă a studiului in vivo, fără a surprinde eventualele efecte cumulative, sau adverse pe termen lung.
4. Lipsa analizelor histopatologice detaliate:

Perspective de continuare a cercetării

1. Pe baza rezultatelor obținute și a limitărilor menționate, se pot contura următoarele direcții pentru cercetări viitoare:
2. Optimizarea formulărilor nanolipidice
3. Extinderea evaluărilor preclinice
4. Explorarea unui spectru mai larg de biomarkeri, incluzând: IL-6, CRP, IL-10 pentru evaluarea completă a răspunsului inflamator; markeri de stres oxidativ suplimentari (ex. SOD, catalază, GPx); markeri metabolici avansați (ex. leptină, adiponectină, HOMA).
5. Studiul impactului asupra calității vieții, prin extinderea cercetărilor către modele clinice umane

5. Studii farmaceutice de dezvoltare a unui supliment alimentar cu structură nanolipidică, benefic în terapia menopauzală.

5.1. Ipoteza de lucru și obiectivele specifice

Ipoteza de lucru

Formularea diosgeninei într-o matrice lipidică nanostructurată (NLC) și conversia acesteia într-o formă farmaceutică solidă orală (comprimate sau capsule) poate conduce la o îmbunătățire semnificativă a biodisponibilității și a eficacității terapeutice, reprezentând astfel o alternativă promițătoare pentru abordarea simptomatologiei specifice menopauzei.

Obiectivele specifice ale studiului

1. Obiectiv formulativ:

Să se încorporeze matricea lipidică NLC conținând diosgenină într-un amestec pulverulent adecvat pentru comprimare sau umplere în capsule, în vederea obținerii unei forme farmaceutice solide orale stabile (comprimate sau capsule).

2. Obiectiv tehnologic:

Să se realizeze transferul tehnologic al formelor NLC solide selectate, din etapa de laborator la scară pilot, în vederea evaluării fezabilității industriale.

3. Obiectiv de validare:

Să se efectueze validarea procesului și controlul calității pentru formulele finale selectate, cu scopul de a asigura conformitatea acestora pentru includerea ulterioară în studii *in vivo*.

5.2. Rezultate și concluzii

Produsele farmaceutice finite solide care conțin nanoforme de principii active vegetale - diosgenină - fabricate după studiile de preformulare și de formulare prezentate în studiu au fost evaluate în funcție de parametrii critici ai analizei fizico-chimice. Toți parametrii testați au fost în conformitate cu cerințele. Conținutul de diosgenină/forma farmaceutică s-a încadrat în limite, demonstrând că procesul de fabricație (de la obținerea NLC-urilor până la produsele finite sub formă de tablete/ capsule) este bine controlat, fiabil și reproductibil. Rezultatele dizolvării au fost peste limita impusă de 70%, iar acest atribut de calitate a fost atins în ceea ce privește eliberarea principiilor active, respectiv testarea *in vitro*

Acest proces ilustrează o abordare și un proces inovator complet și eficient pentru transformarea nanoformelor pe bază de lipide în forme farmaceutice solide pentru obținerea de comprimate sau capsule cu purtători lipidici nanostructurați, asigurând calitatea, consistența și eficacitatea produsului final. Studiile de preformulare și de formulare descrise

au fost monitorizate în conformitate cu cerințele de calitate, inclusiv testarea ingredientului activ, dizolvarea, calitatea microbiologică și stabilitatea.

Concluziile studiului nostru demonstrează progrese semnificative în formularea și dezvoltarea formelor farmaceutice solide care utilizează "purtători" nanolipidici (NLC). Transformarea cu succes a NLC-urilor care încapsulează principii vegetale active într-o formă stabilă de pulbere reprezintă un pas esențial în tehnologia farmaceutică.

Analiza fizico-chimică a produselor finite a concluzionat că s-au obținut (a) comprimate neacoperite, rotunde, de formă biconvexă, cu aspect uniform, structură compactă și omogenă, margini intacte, $d = 13 \text{ mm}$ - figura 5.1. și (b) capsule gelatinoase tari corespunzătoare, dure, cilindrice, cu capete semisferice, uniforme la suprafață, transparente, mărimea "0" – figura 5.2.

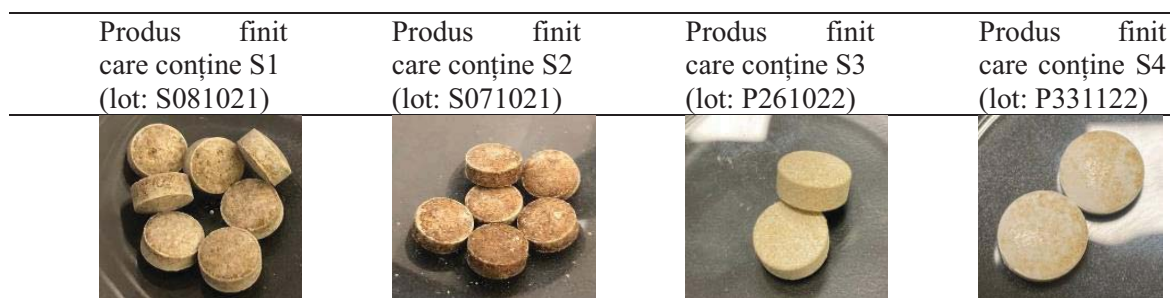


Fig.5.1. Produs finit sub formă de tablete.

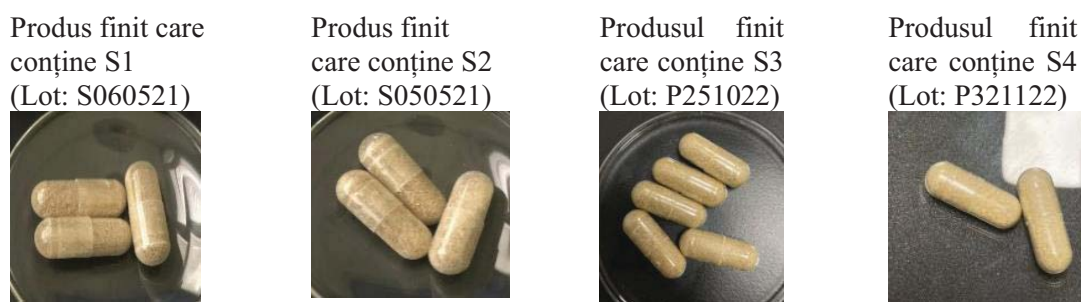


Fig.5.2. Produs finit sub formă de capsule gelatinoase tari.

6. Siguranța formulărilor orale nanoîncapsulate cu molecule bioactive utilizate în tratamentul menopauzei

6.1. Ipoteza de lucru și obiectivele specifice

Ipoteza de lucru

Formulările farmaceutice pe bază de structuri nanolipidice (NLC) încărcate cu molecule active naturale pot reprezenta o alternativă farmaceutică eficientă și sigură pentru ameliorarea simptomelor menopauzei, având biodisponibilitatea crescută și efecte benefice asupra parametrilor biochimici, metabolici și hormonal.

Obiective de cercetare

1. Evaluarea citotoxicității și a genotoxicității produsilor farmaceutici testați prin studii de toxicitate *in vitro*
2. Evaluarea influenței tratamentului cu formulări farmaceutice pe bază de structuri nanolipidice încărcate cu principii active din plante, asupra parametrilor biochimici ai femelelor de șobolan ovarectomizate – studiu *in vivo* , urmărind:
 - profilul lipidic (TG, Chol, HDL)
 - markerii glicemici (Gli)
 - markerii osoși (Pac, Palc, Ca, fosfor)
 - markerii renali (creatinina, uree, URAC)
 - inflamația (TNF)
 - stresul oxidativ (GSH, MDA)
 - profilul hormonal

6.2. Rezultate și concluzii

În timpul studiului de față, ca parte a unei cercetări mai ample, am investigat în timpul primei etape citotoxicitatea (viabilitatea celulară) și genotoxicitatea (testul cu micronuclei) NLC-urilor testate utilizând pe celule de cultură. În a doua parte, am testat (1) influența NLC-urilor asupra parametrilor biochimici ai femelelor de șobolan Wistar induse în menopauză chirurgical, urmărind profilul lipidic (TG, Chol, HDL), markerii osoși (Pac, Palc, Ca, fosfor), markerii glicemici (Gli), markerii renali (Crea, uree, URAC), starea generală și greutatea corporală, parametrii inflamației (TNF), stresul oxidativ (GSH, MDA) și, deoarece formulele vizează sarcina hormonală, (2) markerii hormonal-progesteron și estradiol seric.

Principalele constatări ale studiului nostru sunt că (a) diosgenina (*Dioscorea villosa* L. extract standardizat) formulată în diverse structuri de nanocapsule lipidice (NLC) în

combinație cu acid gliciricic (extract standardizat Glycyrrhiza glabra, Evæg 1 și Evæg 2), TTG (glicozide triterpene) (extract standardizat Actaea racemosa, Evæg 3 și Evæg 4), și polifenoli de resveratrol (extract standardizat de Polygonum cuspidatum, Evæg 5 și Evæg 6) testate pe culturi celulare prin metoda micronucleului **nu au evidențiat genotoxicitatea compuşilor testați**, valorile obținute fiind similare cu cele ale culturilor de celule martor negativ și netratate; (b) formulele farmaceutice NLC testate (Evæg 1-6) administrate pe cale orală la modelul de femele de șobolan cu menopauză indusă chirurgical nu au arătat nici o influență asupra metabolismului osos, metabolismului glucidic, markerilor hepatici și biliari, profilului lipidic sanguin, fosfatazei acide sau markerilor inflamatori; (c) formulele NLC testate (Evæg 1-6) în modelul menopauzal nu au influențat, de asemenea, markerii de stres oxidativ sau markerii hormonal.

În plus, nivelurile plasmatice au arătat potențialul hipoglicemiant, hipouricemic și antioxidant al unei formule farmaceutice testate care conține nano diosgenină și acid glicirizic încapsulate în faza lipidică pe bază de Ulei de Luminița Noptii. Pe formula selectată ar putea fi efectuate studii suplimentare pe modele de boli metabolice.

Limitări

Studiul de față are limitări. Modelul de menopauză indusă a fost indus chirurgical, care poate fi considerat o traumă în comparație cu menopauza fiziologică.

O altă limitare este durata tratamentului de 30 de zile, atât pentru formulele testate, cât și pentru martorul pozitiv tratat cu combinația convențională de substituție hormonală.

7. Studiu comparativ de dizolvare a unei forme farmaceutice ce conține un purtător lipidic nanostructurat (NLC) pe bază de diosgenină - medii de dizolvare convenționale versus medii biorelevante

7.1. Ipoteza de lucru și obiectivele specifice

Ipoteza de lucru

Încorporarea diosgeninei (DSG) într-o matrice lipidică nanostructurată (NLC) va îmbunătăți biodisponibilitatea sa prin creșterea ratei de dizolvare și a absorbției gastrointestinale. Studiul comparativ al procesului de dizolvare în medii convenționale versus medii biorelevante va oferi o înțelegere mai clară a comportamentului *in vivo* al DSG încapsulate în NLC, permițând optimizarea formulei farmaceutice finale.

Obiectivele specifice ale studiului au fost

(1) determinarea locului optim de absorbție a diosgeninei încapsulate într-o structură nanolipidică (mediu gastric, mucoasa intestinală sau colonică) și momentul: înainte sau după masă - folosind ca instrument dizolvarea în medii speciale;

(2) selectarea mediului de dizolvare adecvat pentru a determina biodisponibilitatea diosgeninei folosind **medii convenționale de dizolvare in vitro** - pe extractul brut standardizat, nanocapsulele brute și forma finală a produsului finit oral (capsule umplute cu nanoprodus)

(3) dezvoltarea metodei de analiză care va fi utilizată ulterior în analiza lotului de produs finit.

7.4. Rezultate și concluzii

Mediul intestinal după masă este locul și momentul optim de absorbție a principiului activ diosgenin încapsulat în structura nanolipidică, măsurat în medii de dizolvare biorelevante care simulează condițiile fiziologice *in vivo*.

Mediile de dizolvare recomandate pentru analizele de laborator de rutină incluse în caietul de sarcini al produsului finit pentru testele interfazice de scalare, cu un pH apropiat de cel al mediilor speciale, sunt 1,0 g/L laurilsulfat de sodiu, 2,0 g/L laurilsulfat de sodiu și 4,0 g/L cetrimidă, rezultatele obținute în aceste medii respectând limita minimă impusă de 70% DSG dizolvat.

Forma farmaceutică recomandată pentru produsele care conțin diosgenină încapsulată într-o structură nanolipidică este cea cu eliberare întârziată (gastrorezistentă), iar absorbția optimă a principiului activ are loc la nivelul intestinului superior.

8. Concluzii și contribuții personale

Obiectivele de cercetare științifică setate prin cele trei studii au permis

(1) fabricarea unei forme farmaceutice solide, cu administrare orală, pe bază de structură nanolipidică care a înglobat în structura sa principii active din plante benefice în terapia menopauzală, respectiv diosgenina din extractul de yam sălbatic și acidul glicirizic din Lemnul dulce.

Dezvoltarea formei farmaceutice a parcurs toate etapele tehnologice și de cercetare-dezvoltare, respectiv etapa de documentare științifică, preformularea, formularea și optimizarea, precum și etapele de scalare, prin transpunerea de la scară de laborator la scară pilot și control fizico-chimic și microbiologic.

Prin examinarea rezultatelor testelor de preformulare a matriței nanolipidice cu ulei de luminița nopții, diosgenină și extract de lemn dulce (S1) și matricea nanolipidică cu ulei de soia, diosgenină și extract de lemn dulce (S2), am obținut rezultate adecvate prin care a devenit posibilă transformarea unei structuri uleioase într-o pulbere pretabilă obținerii unei forme farmaceutice solide. Astfel, excipienții de tipul siliciul granular amorf uscat prin pulverizare Fujisil) și aluminometasilicat de magneziu (Neusilin) au fost selectați ca și candidați principali în formularea produselor finite sub formă de capsule sau tablete.

În funcție de cantitatea de principiu activ dintr-o formă de dozare necesară pentru administrare, putem alege astfel, fie o tabletă (pentru o doză terapeutică mai mare) fie o capsulă (pentru o doză terapeutică mai mică). În acest studiu, procesul de fabricație și rezultatele calității au fost conforme pentru ambele forme.

Toți parametrii testați au respectat cerințele. Conținutul de diosgenină / forma farmaceutică a fost în limite, dovedind că procesul de fabricație (de la obținerea NLC la produsele finite sub formă de tablete/capsule) este bine controlat, fiabil și reproductibil. Rezultatele dizolvării au fost peste limita impusă de 70%, iar acest atribut de calitate a fost atins în ceea ce privește eliberarea principiilor active, respectiv, testarea *in vitro*.

(2) studierea profilului de dizolvare pe trei categorii de probe:

- extract de yam sălbatic standardizat la 95% DSG,
- NLC-uri care conțin extract de yam sălbatic standardizat la 6%DSG
- produs finit formulat sub formă de capsulă gelatinoasă tare care conține NLC cu extract standardizat de yam sălbatic DSG, testate în două tipuri de medii de dizolvare: (a) convenționale și (b) medii speciale (biorelevante), atingându-se obiectivele științifice ale studiului, respectiv 1) determinarea locului optim de absorbție a diosgeninei încapsulate

într-o structură nanolipidică (mediul gastric, mucoasa intestinală sau colonică) și a momentului: înainte sau după masă - folosind ca instrument dizolvarea în medii speciale care reproduc condițiile reale din organismul uman; (2) stabilirea testelor de dizolvare de rutină (control QC) a diosgeninei încapsulate într-o structură nanolipidică, care sunt mediile de dizolvare convenționale recomandate și care au un pH mai apropiat de cel al mediilor speciale în care s-au obținut rezultate consistente.

Cu ajutorul mediilor de dizolvare biorelevante care simulează condițiile fiziologice *in vivo*, s-a demonstrat că mediul intestinal după masă este locul și momentul optim de absorbție a principiului activ diosgenină încapsulată în structura nanolipidică.

Mediile de dizolvare recomandate pentru analizele de laborator de rutină incluse în caietul de sarcini al produsului finit pentru testele interfazice de scalare, cu un pH apropiat de cel al mediilor speciale, sunt 1,0 g/L laurilsulfat de sodiu, 2,0 g/L laurilsulfat de sodiu și 4,0 g/L cetrimidă, rezultatele obținute în aceste medii respectând limita minimă impusă de 70% DSG dizolvat.

Forma farmaceutică recomandată pentru produsele care conțin diosgenină încapsulată într-o structură nanolipidică este cea cu eliberare întârziată (gastrorezistentă), iar absorbția optimă a principiului activ are loc la nivelul intestinului superior.

(3) stabilirea profilului de siguranță

Prin testarea *in vitro* asupra **citotoxicității și genotoxicității** formelor farmaceutice dezvoltate, am arătat că efectul citotoxic apare din doze de 1 mg/ml pentru unii compuși (NN control) sau chiar cantități mai mari pentru alții (NLC-Eveg 3). Având în vedere că organismul se așteaptă ca aceste substanțe să atingă o doză de maximum 10 mg/kg, care ar corespunde *in vitro* cu 10 µg/ml, **se poate considera că doza terapeutică este departe de a produce efecte citotoxice.**

Desemenea, metoda cu micronuclei nu a evidențiat **genotoxicitatea** compușilor de testat, valorile obținute fiind similare cu cele ale martorului negativ și ale culturilor celulare netratate.

Determinările biochimice din cadrul studiului *in vivo*, pe un model de femelă de șobolan cu menopauză indusă au arătat că dintre cele șase forme farmaceutice pe bază de structuri nanolipidice studiate, **NLC-Eveg 1**, formulată cu DSG ca principiu activ și extract de lemn-dulce încapsulat în ulei de Luminița Noptii, a prezentat cele mai bune efecte în menținerea parametrilor biochimici aproape de lotul martor neoperat, diferit de Evæg 2, care conținea aceleași principii active, dar încapsulate în ulei de soia.

Tratamentele administrate nu au reușit să restabilească nivelurile hormonale, dar au influențat markerii metabolici și inflamatori, ceea ce le face candidaturi interesante pentru terapii adjuvante.

Aceste rezultate oferă o bază solidă pentru dezvoltarea unor noi strategii terapeutice destinate gestionării efectelor menopauzei, cu un accent pe reducerea stresului oxidativ și optimizarea metabolismului glucidic și lipidic.

Recomandări pentru cercetări viitoare

1. Optimizarea formulărilor pentru a îmbunătăți biodisponibilitatea și efectele terapeutice.
2. Studii suplimentare pe termen lung, inclusiv analize histopatologice, pentru confirmarea siguranței tratamentelor.
3. Evaluarea altor markeri inflamatori și de stres oxidativ pentru a înțelege mai bine efectele asupra echilibrului fiziologic.

Bibliografie selectivă

- [1] Henes M, Hübner S. Hormontherapie in der Peri- und Postmenopause. *Internist (Berl)* 2020;61:558–64. <https://doi.org/10.1007/s00108-020-00789-x>.
- [2] Burger HG, MacLennan AH, Huang K-E, Castelo-Branco C. Evidence-based assessment of the impact of the WHI on women's health. *Climacteric* 2012;15:281–7. <https://doi.org/10.3109/13697137.2012.655564>.
- [3] Cagnacci A, Venier M. The Controversial History of Hormone Replacement Therapy. *Medicina (B Aires)* 2019;55:602. <https://doi.org/10.3390/medicina55090602>.
- [4] Utian WH, Schiff I. NAMS-gallup survey on women's knowledge, information sources, and attitudes to menopause and hormone replacement therapy. *Menopause* 2018;25:1172–9. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001213>.
- [5] Langer RD, Hodis HN, Lobo RA, Allison MA. Hormone replacement therapy – where are we now? *Climacteric* 2021;24:3–10. <https://doi.org/10.1080/13697137.2020.1851183>
- [22] Golmakani N, Parnan Emamverdikhan A, Zarifian A, Sajadi Tabassi SA, Hassanzadeh M. Vitamin E as alternative local treatment in genitourinary syndrome of menopause: a randomized controlled trial. *Int Urogynecol J* 2019;30:831–7. <https://doi.org/10.1007/s00192-018-3698-z>.
- [23] Marko KI, Simon JA. Androgen therapy for women after menopause. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2021;35:101592. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101592>.
- [24] Archer DF, Labrie F, Bouchard C, Portman DJ, Koltun W, Cusan L, Labrie C, Côté I, Lavoie L, Martel C, Balser J. Treatment of pain at sexual activity (dyspareunia) with intravaginal dehydroepiandrosterone (prasterone). *Menopause* 2015;22:950–63. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000428>.
- [60] Pinkerton J V., Joffe H, Kazempour K, Mekonnen H, Bhaskar S, Lippman J. Low-dose paroxetine (7.5 mg) improves sleep in women with vasomotor symptoms associated with menopause. *Menopause* 2015;22:50–8. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000311>.
- [106] Varlas VN, Bors RG, Albu D, Penes ON, Nasui BA, Mehedintu C, Pop AL. Social Freezing: Pressing Pause on Fertility. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:8088. <https://doi.org/10.3390/ijerph18158088>.
- [107] Peneş NO, Weber B, Păun SD. Role of genetic polymorphism in nutritional supplementation therapy in personalized medicine. *Rom J Morphol Embryol* 2017;58:53–8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.23977/medsc.2021.020103>.
- [108] Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Turcuş V, Predoi G, Iordache F. Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view. *Eur J Med Chem* 2018;157:1326–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.076>.
- [109] Lason E, Sikora E, Ogonowski J. Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation. *Acta Biochim Pol* 1970;60. https://doi.org/10.18388/abp.2013_2056.
- [113] Lacatusu I, Iordache TA, Mihaila M, Mihaiescu DE, Pop AL, Badea N. Multifaced Role of Dual Herbal Principles Loaded-Lipid Nanocarriers in Providing High Therapeutic Efficacy. *Pharmaceutics* 2021;13:1511. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091511>.
- [114] COC LMC. CURCUMIN CO-LOADED WITH A LIPID MEDIATOR IN THE SAME NANOSTRUCTURED LIPID DELIVERY SYSTEM. *Farmacia* 2022;70:932–43. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2022.5.20>.

- [122] POP AL. COMPARATIVE DISSOLUTION STUDY OF A SOLID PHARMACEUTICAL FORM CONTAINING NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER (NLC) INCORPORATING DIOSGENIN – CONVENTIONAL VERSUS BIORELEVANT DISSOLUTION MEDIA. *Farmacia* 2023;71:116–29. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2023.1.15>.
- [126] Pop A, Nasui B, Bors R, Penes O, Prada A, Clotea E, **Crisan S**, Cobelschi C, Mehedintu C, Carstoiu M, Varlas V. The Current Strategy in Hormonal and Non-Hormonal Therapies in Menopause—A Comprehensive Review. *Life* 2023;13:649. <https://doi.org/10.3390/life13030649>.
- [127] VARLAS VN. KEY POINTS IN FERTILITY PRESERVATION TREATMENT STRATEGIES DURING COVID-19 PANDEMIC. AN UPDATE ON PHARMACOLOGICAL THERAPIES. *Farmacia* 2021;69:189–99. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.2.1>.
- [130] Iordache T-A, Badea N, Mihaila M, **Crisan S**, Pop AL, Lacatusu I. Challenges in Coopted Hydrophilic and Lipophilic Herbal Bioactives in the Same Nanostructured Carriers for Effective Bioavailability and Anti-Inflammatory Action. *Nanomaterials* 2021;11:3035. <https://doi.org/10.3390/nano11113035>.
- [131] Iordache T-A, Badea N, Mihaila M, **Crisan S**, Pop AL, Lacatusu I. Polygonum cuspidatum Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Dual Inhibition of TNF- α - and IL-6 Cytokines and Free Radical Species. *Materials (Basel)* 2023;16:3492. <https://doi.org/10.3390/ma16093492>.
- [132] Pop A, **Crisan S**, Bârcă M, Ciobanu A-M, Varlas V, Pop C, Pali M-A, Cauni D, Ozon E, Udeanu D, Trifu S, Năsui B. Evaluation of Dissolution Profiles of a Newly Developed Solid Oral Immediate-Release Formula Containing Alpha-Lipoic Acid. *Processes* 2021;9:176. <https://doi.org/10.3390/pr9010176>.
- [133] Fița AC, Secăreanu AA, Musuc AM, Ozon EA, Sarbu I, Atkinson I, Rusu A, Mati E, Anuta V, Pop AL. The Influence of the Polymer Type on the Quality of Newly Developed Oral Immediate-Release Tablets Containing Amiodarone Solid Dispersions Obtained by Hot-Melt Extrusion. *Molecules* 2022;27:6600. <https://doi.org/10.3390/molecules27196600>.
- [161] Coc LMC, Lacatusu I, Badea N, Barbinta-Patrascu ME, Meghea A. Effective Lipid Nanocarriers Based on Linseed Oil for Delivery of Natural Polyphenolic Active. *J Nanomater* 2021;2021:1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/8853941>.
- [162] Parhizkar S, Latiff LA, Parsa A. Effect of Nigella sativa on reproductive system in experimental menopause rat model. *Avicenna J Phytomedicine* 2016;6:95–103.
- [163] Yin W, Borniger JC, Wang X, Maguire SM, Munselle ML, Bezner KS, Tesfamariam HM, Garcia AN, Hofmann HA, Nelson RJ, Gore AC. Estradiol treatment improves biological rhythms in a preclinical rat model of menopause. *Neurobiol Aging* 2019;83:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.08.029>.
- [164] Koebele S V., Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas* 2016;87:5–17. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.01.015>.
- [165] Hsu K-H, Chang C-C, Tsai H-D, Tsai F-J, Hsieh Y-Y. Effects of Yam and Diosgenin on Calpain Systems in Skeletal Muscle of Ovariectomized Rats. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2008;47:180–6. [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(08\)60077-7](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(08)60077-7).
- [166] Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, Lundberg C V, Mo JA, Heegaard A-M, Delaissé J-M, Christgau S. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R169. <https://doi.org/10.1186/ar1152>.
- [167] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [168] Del Rio D, Pellegrini N, Colombi B, Bianchi M, Serafini M, Torta F, Tegoni M, Musci M, Brighenti F. Rapid Fluorimetric Method to Detect Total Plasma Malondialdehyde with Mild Derivatization Conditions. *Clin Chem* 2003;49:690–2. <https://doi.org/10.1373/49.4.690>.
- [169] Zuccari G, Alfei S. Development of Phytochemical Delivery Systems by Nano-Suspension and Nano-Emulsion Techniques. *Int J Mol Sci* 2023;24:9824. <https://doi.org/10.3390/ijms24129824>.
- [170] Cypriana P J J, S S, Angalene J L A, Samrot A V., Kumar S S, Ponniah P, Chakravarthi S. Overview on toxicity of nanoparticles, it's mechanism, models used in toxicity studies and disposal methods – A review. *Biocatal Agric Biotechnol* 2021;36:102117. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102117>.
- [171] Idrees H, Zaidi SZJ, Sabir A, Khan RU, Zhang X, Hassan S. A Review of Biodegradable Natural Polymer-Based Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Nanomaterials* 2020;10:1970. <https://doi.org/10.3390/nano10101970>.
- [172] Yuan D, He H, Wu Y, Fan J, Cao Y. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles. *J Pharm Sci* 2019;108:58–72. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.037>.
- [184] Liu K, Zhao W, Gao X, Huang F, Kou J, Liu B. Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKK β and IRS-1 pathways. *Atherosclerosis* 2012;223:350–8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.012>.
- [192] Lacatusu I, Badea N, Udeanu D, Coc L, Pop A, Cioates Negut C, Tanase C, Stan R, Meghea A. Improved anti-obesity effect of herbal active and endogenous lipids co-loaded lipid nanocarriers: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Mater Sci Eng C* 2019;99:12–24. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.071>.
- [200] Mishra P, Mandlik D, Arulmozhi S, Mahadik K. Nephroprotective role of diosgenin in gentamicin-induced renal toxicity: biochemical, antioxidant, immunological and histopathological approach. *Futur J Pharm Sci* 2021;7:169. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00318-z>.
- [202] Nagamma T, Konuri A, Bhat KMR, Maheshwari R, Udupa P, Nayak Y. Modulation of inflammatory markers by petroleum ether fraction of *Trigonella foenum-graecum* L. seed extract in ovariectomized rats. *J Food Biochem* 2021;45. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13690>.
- [203] Michalak O, Krzeczyński P, Cieślak M, Cmoch P, Cybulski M, Królewska-Golińska K, Kaźmierczak-Barańska J, Trzaskowski B, Ostrowska K. Synthesis and anti-tumour, immunomodulating activity of diosgenin and tigogenin conjugates. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2020;198:105573. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105573>.
- [204] Li X, Liu S, Qu L, Chen Y, Yuan C, Qin A, Liang J, Huang Q, Jiang M, Zou W. Dioscin and diosgenin: Insights into their potential protective effects in cardiac diseases. *J Ethnopharmacol* 2021;274:114018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114018>.
- [205] Choi K-O, Choe J, Suh S, Ko S. Positively Charged Nanostructured Lipid Carriers and Their Effect on the Dissolution of Poorly Soluble Drugs. *Molecules* 2016;21:672. <https://doi.org/10.3390/molecules21050672>.
- [206] CASIAN T. INFLUENCE OF DISSOLUTION CONDITIONS ON THE DISSOLUTION RATE AND RELEASE MECHANISM OF KETOPROFEN FROM EXTENDED RELEASE HYDROPHILIC MATRIX SYSTEMS. *Farmacia* 2022;70:331–43. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2022.2.20>.