

Rezumat

Teza de abilitare intitulată “Implicarea metodelor analitice în evaluarea mecanismelor fiziologice și în determinarea markerilor biochimici în patologie” este o sinteză a celor mai reprezentative direcții de cercetare abordate în perioada postdoctorală.

Lucrarea își propune prezentarea activității științifice după susținerea tezei de doctorat (intitulată “Metode analitice de evaluare a disponibilității unor substanțe active legate de suport polimeric”), și a principalelor perspective de dezvoltare a carierei academice, profesionale și de cercetare.

Structura tezei de abilitare este realizată conform recomandărilor Consiliului Național de Atestare a Titlurilor, Diplomelor și Certificatelor Universitare (CNATDCU) și este structurată în trei secțiuni:

Secțiunea I - cuprinde o scurtă prezentare a activității științifice din perioada postdoctorală.

Secțiunea II - prezintă realizările științifice, profesionale și academice, precum și proiectele viitoare legate de acestea.

Secțiunea III - enumeră referințele bibliografice utilizate în teză.

În medicină, atât în cercetare, cât și în practică, evaluarea stării fiziologice se face, printre altele, și în funcție de nivelul diferiților parametri biologici. Deciziile luate în tratamentul medical, fie el chirurgical sau medicamentos, sunt dictate și în funcție de concentrațiile unor parametri biologici. Mai mult, adaptarea tratamentului precum și urmărirea evoluției unei boli presupune determinarea corectă a concentrațiilor markerilor acesteia. Prin urmare, determinarea cât mai exactă a concentrației anumitor compuși, care sunt considerați markeri, este crucială în toate etapele actului medical: diagnostic, tratament, evoluție și vindecare.

De aici și necesitatea dezvoltării unor metode de determinare cât mai specifice și mai sensibile a unor parametri consacrați dar și a unora noi cu potențial de depistare timpurie și precisă a unei afecțiuni. În plus determinările de concentrații în diferite medii biologice (ser, plasmă, urină etc) stau la baza studiilor de biodisponibilitate, farmacocinetică și de cercetare medicală și farmaceutică. Pe baza acestor studii se poate confirma sau infirma un mecanism de acțiune, stabili doza, tipul de formulare, schema de administrare, eficacitatea, și siguranța unui compus propus ca agent terapeutic.

În concluzie tehnicile instrumentale de detecție și cuantificare au un rol decisiv atât în practica medicală cât și în cercetarea medicală și farmaceutică. Pentru a fi aplicate, tehnicile și metodele alese/propuse trebuie să fie supuse procesului de validare. Procesul de validare are ca scop confirmarea utilității, preciziei și reproductibilității metodei de determinare alese.

Pentru a valida o metodă analitică trebuie îndeplinite o serie de criterii de acceptare, cum ar fi: liniaritate, precizie, acuratețe („recuperare” sau „efect de matrice”), specificitate și sensibilitate, criterii care sunt stabilite și reglementate de foruri specializate ca Food and Drug Administration (FDA), European Medicine Agency (EMA) și International Conference of Harmonization (ICH). O metodă validată care îndeplinește criteriile impuse, enunțate mai sus, va oferi rezultatul cel mai apropiat de valoarea reală pentru concentrația unui compus dintr-un mediu sau dintr-o matrice.

Principalele direcții pe care le-am abordat în activitatea de cercetare științifică, desfășurată după obținerea în anul 2000 a titlului de Doctor în domeniul Chimie, au ca numitor comun metodele analitice de cuantificare. Astfel au fost dezvoltate două direcții și anume: pe de o parte identificarea și validarea unor noi metode de determinare pentru diferiți compuși prezenți în medii biologice și pe de altă parte utilizarea acestor metode de analiză în scopul cercetării fundamentale (mecanisme de acțiune) sau aplicative (depistarea potențialului terapeutic al unor noi compuși de sinteză).

Secțiunea I cuprinde patru capitole care descriu direcțiile de cercetare, realizarea acestora, rezultatele obținute și modalitatea de diseminare a rezultatelor.

Prima direcție de cercetare este intitulată “ Dezvoltarea și validarea metodelor cromatografice utilizate pentru determinarea unor amine biogene din diferite medii biologice” a avut ca scop validarea unor metode analitice specifice și sensibile pentru cuantificarea aminelor biogene din diferite medii biologice: ser șobolan, medii de cultură, nutrienți de origine animală.

Aminele biogene sunt compuși endogeni care îndeplinesc diferite roluri fiziologice. În concentrații crescute, însă, sunt responsabile de efecte adverse severe cum ar fi creșterea tensiunii arteriale sau chiar șocul anafilactic. Pericolul crescut al prezenței acestor compuși în organism provine din faptul că pot fi simultan generați și introduși, prin alimente procesate precum carne, brânza, vin, putând astfel declanșa reacții adverse grave. Din acest motiv măsurarea lor cât mai exactă impune alegerea unor metode analitice cât mai sensibile și specifice. Astfel au fost selectate o serie metode cromatografice HPLC de separare cuplate cu diferite tipuri de detecție funcție de matricea din care aminele au fost extrase dar și de cantitatea în care ele se găsesc în aceste matrici. Astfel au fost folosite două metode cromatografice de separare HPLC, una cu detecție prin spectrometrie de masă (MS) și cea de a doua cu derivatizare și detecție în fluorescență.

Metoda HPLC/MS a fost utilizată pentru cuantificarea individuală/simultană a patru amine biogene din două matrici diferite serul animal (șobolani) și mediile de cultură bacteriene (denumite starter, care sunt utilizate în procesarea alimentelor și care generează amine biogene în acest proces). A fost astfel necesară realizarea a două validări de metoda: una pentru cuantificarea aminelor din ser cea de a doua pentru cuantificarea acestora din mediile de cultura (*Lactobacillus curvatus* și *Proteus mirabilis*). Rezultatele obținute au indicat posibilitatea determinării simultane a aminelor biogene din medii biologice, cu utilitate practică în determinările toxicologice.

În ceea ce privește utilizarea celor două microorganisme în prelucrarea nutrienților de origine animală, rezultatele obținute au arătat ca acestea generează cantități moderate de amine biogene în special cadaverină și putresceină și eventual tiramină (doar *Lactobacillus curvatus*) dar nu generează histamină. Prin urmare ele pot fi utilizate în procesele preparative ca și culturi starter iar controlul aminelor pe care le generează poate fi efectuat prin metoda propusă.

Cea de a doua metodă cromatografică HPLC realizată cu derivatizare și cuplată cu detecția în fluorescență a fost utilizată pentru a determina cantitatea de amine biogene prezentă în nutrienți de origine animală. Și pentru această metoda au fost realizate toate etapele procesului de validare. După validare, metoda a fost utilizată pentru determinarea simultană a aminelor biogene dintr-un număr de 28 de produse diferite (carne proaspătă sau procesată). Rezultatele obținute au confirmat prezența unor cantități crescute de amine biogene în produsele procesate comparativ cu cele proaspete.

În concluzie au fost validate două tipuri de metode cromatografice utile în cuantificarea individuală și simultană a aminelor biogene atât la concentrații relativ mici (ser, medii de cultura) cât și pentru concentrații relativ mari (nutrienți de origine animală). Metodele au aplicabilitate atât în scop

diagnostic în analize toxicologice dar și în depistarea aminelor biogene din culturile starter cât și din nutrienți de origine animală.

A doua direcție de cercetare intitulată ”Evaluarea concentrațiilor homocisteinei în diferite procese patologice și a posibilității utilizării terapeutice a unor produși noi de sinteză” a cumulat mai multe studii care au avut drept scop investigarea implicării homocisteinei în patologie.

Homocisteina (Hcy) este un aminoacid ne-proteinogen generat în cursul metabolizării unui aminoacid proteinogen numit metionina. Pacienții care prezintă niveluri ridicate de Hcy în sânge, situație numită hiperhomocisteinemie (HHcy), pot dezvolta tromboembolism, arterioscleroză prematură, retard mintal, fragilitate osoasă, boli oculare; la femeile gravide poate promova avortul spontan. Deși efectele hiperhomocisteinemiei au fost semnalate încă de acum 70 ani, mecanismul patogen al acesteia nu a fost pe deplin elucidat. În prezent se consideră că hiperhomocisteinemia afectează funcția endoteliului vascular, favorizând tromboza și reprezintă un factor de risc cardiovascular mult mai sever decât hipercolesterolemia. Un nivel crescut al Hcy asociat unei afecțiuni deja instalate, cum ar fi arterioscleroza sau diabetul (afecțiuni endemice în lumea civilizată) este considerat un factor agravant al acestora. Studiul HHcy a cuprins două aspecte: primul a fost crearea unui model de HHcy, model pe care să poată fi studiate consecințele HHcy asupra unor factori de risc (hipercolesterolemie, hiperglicemie) iar al doilea a fost utilizarea unor compuși de sinteză în vederea evaluării potențialului lor de a diminua concentrațiile acestor factori.

Astfel a fost realizat, un model experimental de hiperhomocisteinemie, prin administrare de metionină la șobolani, model pe care au fost evaluate nivelurile unor parametri care sunt implicați în bolile cardiovasculare și diabet, colesterolul respectiv glicemia. Pentru a determina nivelele homocisteinei (în vederea verificării instalării statusului hiperhomocisteinemic) a fost selectată o metodă cromatografică HPLC cu derivatizare și cu detecție în UV care a fost supusă procesului de validare. Pe acest model de hiperhomocisteinemie, verificat, au fost evaluate concentrațiile colesterolului și glicemiei precum și efectele HHcy asupra parametrilor stresului oxidativ.

Sistemul antioxidant din organism este unul complex ce conține atât componente enzimactice din care fac parte enzime ca superoxid dismutaza (SOD), glutathion peroxidaza (GPx) și catalaza (CAT) dar și molecule simple circulante cum ar fi glutathionul, vitamina C, acidul uric, bilirubina care poartă denumirea generică de capacitate antioxidantă totală (TAC). Modificările suferite de acest sistem în context de HHcy au fost investigate utilizând metode standardizate de determinare a activității enzimelor și a concentrațiilor acestor compuși specifici.

Studiul a continuat cu investigarea influenței a doi derivați rutozidici de sinteză asupra nivelurilor tuturor parametrilor menționați anterior în două modele experimentale realizate pe șobolan (modelul de HHcy și cel de diabet). Menționăm că derivații studiați au fost sintetizați la disciplina Chimie Farmaceutică a Facultății de Farmacie, a UMF “Grigore T.Popa” Iași.

Ca și concluzie generală a acestor studii se poate afirma că hiperhomocisteinemia afectează sistemul antioxidant, mai sever pe cel intracelular (în cazul nostru intra-eritrocitar) decât pe cel total (TAC) circulant. Referitor la compușii de sinteză, s-a constatat că aceștia nu determină o scădere a concentrației homocisteinei ci mai curând o acțiune de prevenire a creșterii concentrațiilor ei. În ceea ce privește nivelurile glicemiei și colesterolului a fost înregistrată o acțiune moderată de descreștere a acestora.

A treia direcție de cercetare intitulată “Investigarea statusului antioxidant în inflamația acută și cronică” a urmărit evaluarea sistemului de apărare antioxidant în inflamația acută indusă

experimental la șobolan și în inflamația cronică la subiecți umani în vederea corelării cu o serie de markeri ai inflamației.

Fenomenele oxido-reducatoare stau la baza proceselor vitale din organism, de la generarea de energie până la procese de sinteză, apărare, detoxificare și comunicare. În ultima vreme sistemul oxido-reducator este considerat a fi implicat în procesul inflamator, speciile reactive ale oxigenului fiind responsabile de eliberarea de citokine pro-inflamatorii ca urmare a activării unui grup de receptori aparținând sistemului imun, numit inflamozom. Prin urmare au fost studiate modificările apărute în sistemul antioxidant și în cel imun prin determinarea concentrațiilor unor markeri specifici pe un model de inflamație acută realizat pe șobolani prin injectarea de carageenan la nivelul labei posterioare a animalelor. Aceeași parametri au fost urmăriți într-un alt studiu efectuat pe subiecți umani cu afecțiuni inflamatorii cronice ale urechii medii. Astfel pentru investigarea statusului antioxidant au fost determinate activitatea enzimelor SOD, GPx, CAT, a concentrațiilor TAS și ale MDA (malondialdehidă - marker fidel pentru amploarea distrugerilor cauzate de stresul oxidativ) iar pentru investigarea răspunsului imun au fost determinate concentrațiile interleukinelor IL-1, IL-6 și IL-8.

Studiul realizat pe modelul de inflamație acută a plecat de la considerentele actuale privind natura inflamatorie a arteriosclerozei și utilizarea donrilor de NO în tratament. Literatura menționează o activitate ambivalentă, antiinflamatoare și pro inflamatoare, a donrilor de NO în funcție de condițiile fiziopatologice. Pe modelul inflamator, realizat pe laba de șobolan, a fost investigat potențialul antiinflamator al unor noi donori de NO nebivolol (NEB) și S-nitroso-glutathione (GSNO) asupra statusului oxidativ și inflamator precum și efectele administrării acestora asupra funcției hepatice. Nebivololul este deja introdus în terapie, în timp ce S-nitroso-glutathionul este un donor de NO în faza de testare, similar celor utilizați în terapia bolilor cardiovasculare. Datele obținute sugerează potențialul antiinflamator al donatorilor de oxid nitric ca fiind apropiat de cel al indometacinului (IND). În plus S-nitroso-glutathionul prezintă un beneficiu suplimentar în terapia anti-aterogena, deoarece structura sa îi conferă rolul de depozit de NO.

În concluzie rezultatele obținute au fost mulțumitoare deoarece atât NEB cât și GSNO au manifestat efecte antiinflamatorii certe (deși ceva mai reduse ca intensitate decât cele ale IND) și au diminuat amploarea stresului oxidativ. Cu toate că, per ansamblu, NEB a avut efect mai intens în diminuarea parametrilor inflamatori și oxidativi, S-nitroso-glutathionul a prezentat o toxicitate hepatică și renală mult mai redusă.

Studiul variației markerilor inflamatori și ai stresului oxidativ în inflamația cronică a fost realizat pe subiecți umani cu afecțiuni cronice ale urechii medii și anume: otita cronică supurativă cu sau fără colesteatom respectiv cu recidivă. Investigarea statusului antioxidant a indicat modificări semnificative ale acestuia în toate cele trei tipuri de afecțiuni ale urechii medii. Intensitatea atacului oxidativ a fost confirmată de nivelurile crescute ale malondialdehidei (MDA) produs final al peroxidării lipidice. Investigarea parametrilor inflamației a indicat o creștere semnificativă a nivelurilor acestora la pacienții cu afecțiuni cronice ale urechii medii față de normal cu unele variații funcție de stadiul bolii. Analiza statistică a nivelurilor markerilor inflamatori și parametrilor stresului oxidativ a indicat o corelație directă, moderată, între aceștia și enzimele aparținând sistemului defensiv antioxidant. O corelație indirectă a fost observată între markerii inflamației și capacitatea totală antioxidantă (TAC). Prin urmare datele obținute confirmă afectarea echilibrului oxido-reducator în procesul inflamator și interconexiunea celor două procese. Astfel datele obținute sugerează posibilitatea de interferare medicamentoasă a acțiunii speciilor oxidante cu efect direct asupra markerilor inflamatori și de stabilire a conduitei terapeutice. Pe de altă parte nivelele interleukinelor IL-6, predictor al proliferării epiteliale ce poate servi la stadializarea

colesteatomului, asociate cu nivelele interleukinelor IL-1, predictor al gradului de distrucție tisulară, pot dicta conduita chirurgicală (tehnica operatorie, gradul de preservare a funcției auditive, timpanoplastia).

În concluzie parametrii stresului oxidativ corelați cu cei ai inflamației pot fi utili în decizia terapeutică.

A patra direcție de cercetare este intitulată “Determinarea unor parametri biochimici și biomecanici specifici în fractura de fragilitate”

Actualmente în țările dezvoltate arterioscleroza, diabetul și osteoporoza sunt considerate boli endemice. Fractura de fragilitate are o pondere semnificativă în cadrul bolilor osoase la vârstnici. Aceasta afectează în special vertebrele, femurul, humerusul proximal, radiusul distal, pelvisul, împiedicând astfel mobilitatea pacientului. Cea mai debilitantă dintre toate aceste fracturi este fractura de fragilitate a pelvisului (FFP). Alegerea tratamentului potrivit pentru FFP este dificilă deoarece atât terapia conservatoare cât și cea chirurgicală implică riscuri la fel de mari: imobilizare prelungită și/sau riscuri chirurgicale. Prin urmare, terapia farmacologică este o alternativă la cea chirurgicală. Bifosfonații și-au dovedit utilitatea în terapia anti-osteoporotică și aportul lor este recunoscut. În schimb influența calciului și a vitaminei D sunt relativ neglijate fie prin non-complianța pacientului în cazul tratamentului conservator fie prin prioritizarea rezultatului operator în cazul tratamentului chirurgical. Scopul studiului a fost de a evalua rolul calciului și vitaminei D în procesul de vindecare a fracturii la pacienții cu osteoporoză. Rezultatele obținute arată că atât calciul cât și vitamina D exercită o influență pozitivă asupra procesului de vindecare al fracturilor de fragilitate și subliniază semnificativ necesitatea educării pacienților pentru a se conforma prescripției de suplimentare a calciului și a vitaminei D.

În concluzie datele obținute indică beneficiul administrării calciului și a vitaminei D în prevenire și recuperare, mai ales la pacienții cu recidivă a FFP.

Menționez că cercetările prezentate în teza de abilitare au fost efectuate în cadrul realizării unor teze de doctorat cât și a unor proiecte de cercetare obținute prin competiții naționale.

Secțiunea II prezintă o sinteză a realizărilor științifice, profesionale și academice cât și principalele planuri de dezvoltare a carierei pe cele trei direcții: științifică, academică și profesională.

Dezvoltarea carierei științifice include continuarea celor două teme principale și anume studiul implicării homocisteinei și a stresului oxidativ în patologie. Implicarea în patologie a homocisteinei va fi investigată în trei direcții noi și anume în tromboza venoasă profundă, în sarcină și în osteoporoză.

Este general acceptat faptul că homocisteina în concentrații crescute are un efect protrombotic. Toate etapele sarcinii, inclusiv nașterea și perioada post-partum, sunt, de asemenea, cunoscute ca fiind caracterizate de un status protrombotic. În plus, în sarcina contemporană care este asistată și caracterizată de vârsta maternă înaintată, starea protrombotică poate fi exacerbată de concentrații mari de homocisteină. Prezența concentrațiilor mari de homocisteină amplifică riscul trombotic și în alte boli, precum trombofilia ereditară care poate declanșa tromboză venoasă profundă și tromboembolismul sau în diabet și arterioscleroză în contextul infecției cu covid.

De asemenea, în cazul fracturilor de fragilitate care apar în primul rând la vârstnici, riscul trombotic crescut este prezent datorită mobilității reduse sau chiar abolite. Din nou, nivelurile ridicate de homocisteină pot amplifica severitatea acestei boli.

Prin urmare, studiul homocisteinei și implicarea acesteia în patologie este o direcție actuală și necesară de cercetare.

Secțiunea III conține referințele bibliografice aferente studiilor prezentate și încheie lucrarea.

Abstract

The habilitation thesis entitled "Involvement of analytical methods in the evaluation of physiological mechanisms and the determination of biochemical markers in pathology" is a synthesis of the most representative research directions developed during the postdoctoral period.

The paper aims to present the scientific activity after the presentation of my PhD thesis, entitled "Analytical methods for evaluating the bioavailability of active substances bound on a polymeric support", and the main prospects for the development of the academic, professional and research career.

The structure of the habilitation thesis follows the recommendations of the National Council for Attestation of University Titles, Diplomas and Certificates (CNATDCU) and is structured in three sections:

Section I includes a brief presentation of the scientific activity of the postdoctoral period.

Section II presents scientific, professional and academic achievements as well as future projects related to them.

Section III lists the bibliographic references used in the thesis.

In medicine, both in research and in practice, the assessment of the physiological state is done, depending on the levels of different biological parameters. The decisions made in the medical treatment, either it is surgical or medical, are also dictated by the concentrations of some biological parameters. Moreover, the adaptation of a therapy as well as the follow-up of a disease requires the correct determination of the concentrations of its markers. Therefore, the most accurate determination of the concentration of certain compounds, which are considered markers, is crucial in all phases of the medical act: diagnosis, treatment, evolution and healing.

Hence the need to develop more specific and sensitive methods to determine specific parameters as well as finding new ones with potential for early detection of diseases. In addition, the determination of concentrations in different biological environments (serum, plasma, urine, etc.) are the basis of bioavailability, pharmacokinetics and medical or pharmaceutical research studies. Based on pharmacokinetics, the mechanism of action can be confirmed or denied, the dose, the type of formulation, the administration schedule, the effectiveness, and the safety of a compound proposed as a therapeutic agent can be determined.

In conclusion, instrumental detection and quantification techniques have a decisive role in both medical practice as well as medical and pharmaceutical research. In order to be applied, the envisaged techniques and methods must go through the validation procedure. The aim of the validation process is to confirm the usefulness, precision and reproducibility of the method chosen for determination.

To validate an analytical method, a series of acceptance criteria must be fulfilled, such as: linearity, precision, accuracy ("recovery" or "matrix effect"), specificity and sensitivity. These requirements are established by specialized forums such as Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) and International Conference of Harmonization (ICH).

A validated method that fulfills the stated criteria, will provide the result closest to the real value for the concentration of a compound in an environment/in a matrix.

The main directions that I approached in the scientific research activity, carried out after obtaining in 2000 the title of Doctor in the field of Chemistry, have as a common denominator which is the analytical methods for quantification. Thus, two directions were developed, as follows: first, the development of new methods for the determination of different compounds present in biological environments and second the use of analytical method for fundamental research purpose (mechanisms of action) or for applied research purpose (detection of the therapeutic potential of new synthetic compounds).

Section I includes four chapters that describe the research directions, their implementation, the results obtained and the method of disseminating the results.

The first research direction is entitled " Development and validation of chromatographic methods used for the determination of some biogenic amines from different biological environments" aimed to validate specific and sensitive analytical methods for the quantification of biogenic amines from different biological environments such as: rat serum, culture media, nutrients of animal origin.

Biogenic amines are endogenous compounds that fulfill different physiological roles. In high concentrations, however, they are responsible for severe adverse effects such as increased blood pressure or even anaphylactic shock. The increased danger of the presence of these compounds in the body comes from the fact that they can be simultaneously generated and introduced (through processed foods such as meat, cheese, wine) thus triggering serious adverse reactions. For this reason, their measurement as accurately as possible, requires the choice of analytical methods with the highest degree of sensitivity and specificity. Thus, a series of HPLC separation chromatographic methods coupled with different types of detection were selected depending on the matrix from which the amines were extracted, but also on the quantity in which amines are found in these matrices. Thus, two HPLC separation chromatographic methods were used, first, with mass spectrometry (MS) detection and second, with derivatization and fluorescence detection. The HPLC/MS method was used for the individual/simultaneous quantification of four biogenic amines from two different matrices, serum taken from animals (rats) and bacterial culture media (called starter, which are used in food processing and which generate biogenic amines in this process). It was thus necessary to carry out two validations procedures: one for the quantification of amines in the serum and the other for their quantification in the culture media (*Lactobacillus curvatus* and *Proteus mirabilis*). The obtained results showed that the chosen method allows the simultaneous determination of biogenic amines from biological environments and may have practical use in toxicology.

Regarding the use of the two microorganisms in the processing of meat foodstuff, the obtained results showed that both of them generate moderate amounts of biogenic amines, especially cadaverine and putrescin but do not generate histamine. As a conclusion, the use of these microorganisms as starter cultures in food preparation processes is safe, and the control of the amines they generate can be achieved by the proposed method.

The second HPLC chromatographic method with derivatization and fluorescence coupled detection was used to determine the concentration of biogenic amines generated by the meat foodstuff. For this method, all the stages of the validation process were also completed. Once validated, the method was used for the simultaneous determination of biogenic amines in 28 different fresh or processed meat foodstuff. The obtained results confirmed the presence of increased amounts of biogenic amines in processed products compared to fresh ones.

As a conclusion, two types of chromatographic methods useful in individual or simultaneous quantification of biogenic amines were validated in both low concentrations (serum, culture media) and high concentrations (meat foodstuff samples). The methods are applicable both for diagnostic purposes in toxicological analyzes and in the detection of biogenic amines in starter cultures and meat foodstuffs.

The second research direction is entitled "Evaluation of homocysteine concentrations in different pathological processes and the possibility of therapeutic use of new synthetic products" has summarized several studies that aim to investigate the involvement of homocysteine in pathology. Homocysteine (Hcy) is a non-proteinogenic amino acid generated during the metabolism of a proteinogenic amino acid called methionine. Patients with high levels of Hcy in the blood, a situation called hyperhomocysteinemia (HHcy), develop thromboembolism, premature atherosclerosis, mental retardation, bone fragility, eye diseases; in pregnant women it can cause miscarriage. Although the effects of hyperhomocysteinemia were reported 70 years ago, its pathogenic mechanism has not yet been fully elucidated. Currently, it is considered that hyperhomocysteinemia affects the function of the vascular endothelium favoring thrombosis and it represents a much more severe cardiovascular risk factor compared to hypercholesterolemia. An increased level of Hcy associated with an already installed disease such as atherosclerosis or diabetes (endemic diseases in the civilized world) is considered an aggravating factor. The HHcy research included two aspects: firstly, to develop a model of HHcy on which to study the consequences of HHcy on certain risk factors (hypercholesterolemia, hyperglycemia) and secondly to investigate the potential of new synthetic compounds to reduce the concentrations of risk factors mentioned above. Thus, an experimental model of hyperhomocysteinemia was developed through the administration of methionine, in rats. In order to verify the installing of hyperhomocysteinemic status, homocysteine concentrations were determined through a HPLC chromatographic method with derivatization and UV detection. The selected method was subjected to the validation procedures. On this hyperhomocysteinemic model, cholesterol and blood glucose concentrations were evaluated; supplementary the effects of HHcy on the antioxidant system was assessed.

The antioxidant system in the body contains both enzymes (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT)) and circulating small molecules with antioxidant roles (glutathione (GSH), vitamin C, uric acid, bilirubin) that are known as total antioxidant capacity (TAC). The enzymes activity and the TAC concentrations in the context of HHcy were performed using standardized methods (for research use only).

The study has been continued by investigating the influence of two synthetic rutoside derivatives on the levels of all the above-mentioned parameters, in two experimental models made on rats (the HHcy model and the diabetes model). We mention that the studied derivatives were synthesized at the Pharmaceutical Chemistry discipline of the Faculty of Pharmacy, UMF "Grigore T. Popa" Iasi.

As a general conclusion of these studies, we can state that hyperhomocysteinemia affects the antioxidant system, more severely the intracellular one (in our case intra-erythrocytes) than the total circulating one (TAC). Regarding the synthetic compounds, they show an activity of preventing the increase of the homocysteine concentration rather than decrease it and a moderate action in lowering the blood sugar and cholesterol levels.

The third direction of research entitled "Investigation of the oxidative status in acute and chronic inflammation " aimed to assess some markers of inflammation and of antioxidant defense system,

in experimentally induced acute inflammation, in rats and in chronic inflammation, in human subjects in order to correlate them.

Redox phenomena is the basis of vital processes in the body, from energy generation to synthesis, defense, detoxification and communication processes. Recently, the redox system is considered to be involved in the inflammatory process, reactive oxygen species being responsible for the release of pro-inflammatory cytokines as a result of the activation of a group of receptors belonging to the immune system and called the inflammasome. Therefore, the changes in the antioxidant and the immune system were studied by determining the concentrations of specific markers on an acute inflammation model made on rats by injecting carrageenan in the hind paw. The same parameters were followed in another study conducted on human subjects with chronic inflammatory diseases of the middle ear. Thus, to investigate the oxidative status, the activity of SOD, GPx, CAT enzymes, TAS and malondialdehyde (MDA - a faithful marker for the extent of damage caused by oxidative stress) concentrations were determined. To assess the immune system response, the concentrations of some interleukins IL-1, IL- 6 and IL-8 was also determined. Both types of parameters were determined using standardized kits for research use.

The study carried out on the model of acute inflammation started from the current considerations regarding the inflammatory nature of atherosclerosis and the use of NO donors in its therapy. Current literature mentions the ambivalent, anti-inflammatory and pro-inflammatory, activity of NO donors depending on the physio-pathological conditions. The influence of some new NO donors nebivolol (NEB) and S-nitroso-glutathione (GSNO) on the oxidative and inflammatory status as well as the effects of their administration on the liver function was investigated in the inflammatory model, performed on the rat paw. Nebivolol is already introduced in therapy while S-nitroso-glutathione a NO donor, similar to those used in the cardiovascular diseases therapy, is in the testing phase. The data obtained suggest the anti-inflammatory potential of nitric oxide donors as close to that of indomethacin (IND). Moreover, S-nitroso-glutathione presents an additional benefit in anti-atherogenic therapy, because its structure gives it the role of a NO deposit.

As a conclusion, the results obtained were good because both NEB and GSNO showed clear anti-inflammatory effects (although somewhat less intense than those of IND) and also decreased the extent of oxidative stress. Although, overall, NEB had a more intense effect in reducing inflammatory and oxidative parameters, S-nitroso-glutathione showed a much lower liver and kidney toxicity.

The variation of markers of both inflammation and oxidative stress was studied on human subjects in chronic diseases of the middle ear, namely: chronic suppurative otitis with or without cholesteatoma or relapse. The investigation of the oxidative status markers indicated significant changes for all of them in all three types of middle ear diseases. The intensity of the oxidative attack was confirmed by the increased levels of malondialdehyde (MDA), the final product of lipid peroxidation. The investigation of inflammation markers indicated a significant increase in their levels in patients with chronic middle ear disease compared to normal, with some variations depending on the stage of the disease.

The statistical analysis of the levels of inflammatory markers have indicated a moderate, direct correlation with the activity of the enzymes belonging to the antioxidant defense system. An indirect correlation was observed between inflammation markers and total antioxidant capacity (TAC). Therefore, the obtained data confirm the impairment of the redox balance in the inflammation process and the interconnection of the two processes.

The obtained data suggest the possibility of using drugs to interfere the activity of oxidizing species thus influencing the levels of inflammatory markers and implicitly the therapeutic behavior. Moreover, the level of interleukin IL-6 is a predictor of epithelial proliferation that can serve to identify the stage of cholesteatoma, and the level of IL-1 is a predictor of the degree of tissue destruction. Thus, the associations of these two interleukins can help to choose the surgical approach regarding: the operative technique, the degree of preservation of the auditory function, or the tympanoplasty. As a conclusion, the parameters of oxidative stress correlated with those of inflammation can be useful in the therapeutic decision.

The fourth research direction entitled "Investigation of calcium and vitamin D status in osteoporotic fracture." Currently, in developed countries, atherosclerosis, diabetes and osteoporosis are considered the most widespread diseases in adulthood. Fragility fracture is the most common bone disease in the elderly. It mainly affects the vertebrae, femur, proximal humerus, distal radius, pelvis, thus preventing the patient's free movement. The most debilitating of all these fractures is the fragility fracture of the pelvis. Choosing the right treatment for FFP is difficult because both conservative and surgical therapy involve equally high risks: prolonged immobilization and/or surgical risks. Therefore, pharmacological therapy is an alternative to surgery. Bisphosphonates have proven their usefulness in anti-osteoporotic therapy and their contribution is recognized. Instead, the influence of calcium and vitamin D are relatively neglected either by the patient's non-compliance in the case of conservative treatment or by prioritizing the surgical result in the case of the surgical approach. The aim of the study was to evaluate the role of calcium and vitamin D in the fracture healing process in osteoporotic patients. The obtained results show that both calcium and vitamin D exert a positive influence on the healing process of fragility fractures and significantly emphasize the need to educate patients to comply with the prescription to supplement calcium and vitamin D in order to improve FFP healing. As a conclusion, the obtained data indicate the benefit of calcium and vitamin D administration in prevention and recovery, especially in patients with recurrent FFP.

I would like to mention that the research presented in the habilitation thesis was carried out as part of the realization of doctoral theses as well as research projects obtained through national competitions.

Section II presents a synthesis of scientific, professional and academic achievements as well as the main career development plans in the three directions: scientific, academic and professional. The development of the scientific career includes the continuation of the two main themes, namely the study of the involvement of homocysteine and oxidative stress in pathology. The involvement of homocysteine in pathology will be investigated in three new directions, namely: in deep venous thrombosis, in pregnancy and in osteoporosis. It is generally accepted that homocysteine in elevated concentrations has a prothrombotic effect. All stages of pregnancy, including delivery and the postpartum period, are also known to be characterized by a prothrombotic status. Furthermore, in contemporary pregnancy that is assisted and characterized by advanced maternal age, the prothrombotic state may be exacerbated by high homocysteine concentrations. The presence of high concentrations of homocysteine amplifies the thrombotic risk in other diseases such as hereditary thrombophilia that triggers deep vein

thrombosis and thromboembolism or in diabetes and atherosclerosis in the context of covid infection.

Also, in the case of fragility fractures that occur primarily in the elderly, the increased thrombotic risk is present due to reduced or even abolished mobility. Again, high levels of homocysteine can amplify the severity of this disease.

Therefore, the study of homocysteine and its involvement in pathology is a current and necessary direction of research.

Section III contains the bibliographic references related to the presented studies and the conclusion of the paper.