



**UNIVERSITATEA TRANSILVANIA DIN BRAȘOV**

# **TEZĂ DE ABILITARE**

**Titlu:**

**TROMBOZĂ ȘI INFLAMAȚIE: DE LA MEDICINA  
BAZATĂ PE DOVEZI LA MEDICINA  
PERSONALIZATĂ**

**Domeniu: Medicină**

**Autor:**

**Conf. dr. Claudia Mihaela GAVRIȘ**

**Brașov, 2024**

## Cuprins

Lista de abrevieri.....	3
(A) Abstract/Rezumat .....	4
(B) Realizări științifice și profesionale, planuri de evoluție și dezvoltare a carierei.....	15
(B-i) Realizări științifice și profesionale.....	17
Capitolul 1.Evaluarea riscului trombotic la pacientul cu sindrom antifosfolipidic.....	18
1.1.    Riscul trombozei recurente în APS .....	18
1.1.1. Riscul trombozei recurente în APS secundar LES .....	18
1.1.2. Riscul trombozei recurente în APS .....	26
1.3. Rolul markerilor inflamatori de grad scăzut ca predictor ai evenimentelor trombotice în APS .....	40
1.4. Răspunsul inflamator în domeniul medicinei integrative.....	46
Capitolul 2. Evoluție și dezvoltare profesională.....	140
2.1. Dezvoltarea carierei profesionale .....	140
2.2 Teza de doctorat și alte proiecte de cercetare .....	143
2.3    Recunoașterea națională și internațională .....	150
2.4 Experiința de management și conducere.....	151
(B-ii) Planuri de evoluție și dezvoltare a carierei.....	152
Plan de dezvoltare a carierei profesionale.....	153
Plan de dezvoltare a activității didactice .....	156
Dezvoltarea competențelor didactice.....	156
3. Plan de dezvoltare pentru activitatea de cercetare.....	158
Consolidarea expertizei academice și științifice .....	158
(B-iii) Bibliografie .....	161



## Lista de abrevieri

aCL	anticorpi anticardiolipinici	IL-12	interleukina 12
aFL	anticorpi antifosfolipidici	IMA	infarct miocardic acut
Anti-β2		INR	<i>International Normalized Ratio</i>
-GPI	anticorpi anti-beta 2 glicoproteina I	LA	lupus anticoagulant
ApoER2	receptorului apolipoproteinei E		<i>Low Density Lipoproteins, lipoproteine cu densitate mica</i>
APL	unități A fosfolipidice	LDL	
aPTT	timpul parțial de tromboplastină activată	LES	lupus eritematos systemic
AVC	accident vascular cerebral	MAPK	<i>Mitogen Activator Protein Kinase</i>
CAD	Boală coronariană premature	MMP	matrix metaloproteinaza
CD40L	CD40 ligand	MPL	unități M fosfolipidice
CD62P	P-selectina	NF-kB	factor de transcripție nucleară kB
CPR	Resuscitare cardiopulmonară)	non-LES	non lupus eritematos sistemic
CT	examen tomografic computerizat	OS	<i>odds ratio (estimarea riscului relativ)</i>
	<i>Diluted Russel Viper Venom Time, timp</i>	PE A16	phycoerythrin
dRVTT	Russel	PC	proteina C
ECG	Electrocardiogramă	SAFL	sindrom antifosfolipidic
	<i>Epidermal Growth Factor, factor de</i>	SAFP	sindrom antifosfolipidic primar
EGF	creștere epidermală	SCA	sindroame coronariene acute
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbant Assay</i>	SCD	moarte subită cardiacă
FITC	fluorescein isothiocyanate	sCD40L	forma solubilă a CD40L
GPIc	glicoproteina I c	SCZ	schizofrenie
GPIIa	glicoproteina II a	SD	moarte subită non-cardiacă
GPIIb/IIIa	glicoproteina II b III a	TA	tromboză acută
GPL	unități G fosfolipidice	TEP	tromboembolism pulmonar
	<i>High Density Lipoproteins, lipoproteine cu</i>	TF	factor tisular
HDL	densitate normal	TIH	trombocitopenia indusă de heparină
	<i>Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low</i>	TLR-4	<i>Toll-Like receptor-4</i>
	<i>Pletelets, hemoliză, enzime hepatice cres-</i>	TNFα	factorul de necroză tumorală alfa
HELPP	<i>cute, trombocitopenie</i>	t-PA	activatorul tisular al plasminogenului
HTA	hipertensiune arterială sistemică	TR	tromboză recurentă
HTP	hipertensiune pulmonară	VDRL	<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>
	<i>high sensitivity protein C, proteina C cu</i>	β2 -GPI	beta 2 glicoproteina I
hsPC	sensibilitate înaltă		
ICC	insuficiență cardiacă congestivă		
IgG	imunoglobuline tip Ig M		
IgM	imunoglobuline tip Ig M		

## **(A) Abstract/Rezumat**

### Abstract

The habilitation thesis "THROMBOSIS AND INFLAMMATION: FROM EVIDENCE-BASED MEDICINE TO PERSONALIZED MEDICINE" includes my scientific, professional, and academic achievements, as well as my personal plans for further career development. In preparing this thesis, I started from the principle that habilitation in the field of medicine represents the recognition of having reached a high level of professional, academic, and scientific training.

Inflammation and thrombosis are two essential physiological processes that, when out of control, become major factors in the development of cardiovascular diseases, antiphospholipid syndrome, and other associated conditions. A multidisciplinary and interdisciplinary approach is crucial for understanding these mechanisms and their interactions, with the potential to revolutionize how we assess thrombotic risks and develop personalized therapies.

By identifying specific biomarkers and exploring the interaction between inflammation and thrombosis, early diagnosis and therapeutic interventions are achieved, having a direct impact on patient prognosis. An integrative approach involving various medical and scientific fields will offer personalized solutions for preventing and managing risks, thereby strengthening the contribution of personalized medicine to improving patients' quality of life. Addressing these topics makes an important contribution to the medical field, as it can guide the development of more effective prevention and treatment strategies based on the individual profile of patients, reducing thrombotic and inflammatory risks in cardiovascular, infectious, neuropsychiatric, and other conditions.

The first section of the habilitation thesis encompasses the main results of my professional, academic, and research activities, closely correlated with the level of knowledge in the respective research fields at the time. It highlights the most significant scientific contributions in the field, both from a classical perspective and in terms of interdisciplinarity and integrative medicine.

Chapter 1 presents the primary results of the scientific research, systematically organized into the main research domains: the assessment of recurrent thrombosis risk in patients with antiphospholipid syndrome, the role of low-grade inflammatory markers and platelet activation as predictors of thrombotic events in patients with antiphospholipid syndrome, and the evaluation of the inflammatory response in the progression of patients with various pathologies, with a brief mention of other research domains at the end.

The first research domain focused on assessing the risk of recurrent thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome (APS), a condition characterized by the presence of antiphospholipid antibodies (aPL), associated with thrombotic events and pregnancy morbidity. This area has been a

central focus of my professional and scientific career, culminating in my doctoral thesis: \*"Platelet Activation Markers in Antiphospholipid Syndrome." The primary objective of the research was to evaluate the prognostic value of P-selectin and sCD40L levels for predicting recurrent thrombotic events in patients with APS. Published results revealed that patients with APS (whether primary or secondary to systemic lupus erythematosus or other rheumatic diseases) had significantly higher levels of P-selectin and sCD40L compared to healthy controls, with these markers correlating with the occurrence of acute and recurrent thrombotic events. Statistical analysis demonstrated that P-selectin was an independent predictor of recurrent thrombosis in APS patients. Furthermore, increased platelet activation was observed in APS patients, supporting the role of P-selectin and sCD40L as critical markers for thrombotic risk assessment. These markers could be utilized to identify patients at higher risk of recurrent thrombosis and to develop new prophylactic strategies.

The second research domain explores the role of low-grade inflammatory markers and platelet activation as predictors of thrombotic events in patients with antiphospholipid syndrome (APS). Although APS is characterized by vascular thrombosis in the absence of overt inflammation, recent evidence suggests the presence of a pro-inflammatory state. The results demonstrated that APS patients exhibited significantly increased levels of hs-CRP, P-selectin, and sCD40L compared to the control group. Furthermore, hs-CRP and aCL were identified as independent predictors of recurrent thrombotic risk, while elevated P-selectin levels were associated with recurrent thrombosis. These findings suggest a more personalized approach to thrombotic risk management, based on the assessment of these markers.

The third research domain addressed in the first chapter focused on the inflammatory response and outcomes of patients with schizophrenia undergoing long-term antipsychotic treatment who were infected with SARS-CoV-2. Patients with schizophrenia exhibit significant comorbidities, such as diabetes, hypertension, and chronic pulmonary diseases, which could increase the risk of severe COVID-19. However, schizophrenia patients had a lower risk of severe COVID-19 and reduced mortality compared to the control group, despite having more comorbidities. Inflammatory markers (CRP and fibrinogen) were significantly lower in schizophrenia patients than in the control group. A potential explanation for these findings could be the rapid access to care and constant monitoring of hospitalized patients, as well as the potential effects of antipsychotics on the inflammatory response. Schizophrenia patients on long-term antipsychotic treatment demonstrated a reduced risk of severe COVID-19, and antipsychotic therapy might play a protective role in SARS-CoV-2 infection. These results highlight the need for further studies to better understand these effects.

In the fourth research domain, I explored integrative medicine, focusing on studies analyzing various natural extracts, covering two major areas with potential applicability in cardiovascular pathology and its comorbidities. The paper "New Therapeutic Strategies in Diabetic Kidney Disease" reviews current and emerging therapeutic strategies for managing patients with diabetic kidney

disease (DKD), with a focus on preventing disease progression and reducing cardiovascular risk. Diabetic kidney disease (DKD) is one of the major complications of diabetes mellitus (DM) and a leading cause of chronic kidney disease (CKD), affecting approximately 20-40% of patients with diabetes. Renal lesions associated with DKD are multifactorial, involving metabolic, hemodynamic, pro-inflammatory, and pro-fibrotic factors. These include advanced glycation end products, reactive oxygen species, activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), growth factors (TGF- $\beta$ ), and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6). Current therapeutic strategies focus on slowing the progression of DKD and preventing cardiovascular complications. First-line pharmacological therapies used in the management of patients with DKD include renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors (ACE inhibitors and ARBs) and sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors (SGLT2 inhibitors). Therapeutic strategies in DKD are continuously evolving, and new molecules, such as SGLT2 inhibitors and mineralocorticoid receptor antagonists, offer promising perspectives for renal and cardiovascular protection. A multimodal approach, incorporating both existing and emerging therapies, is essential for optimizing the treatment of patients with DKD and DM. My academic career began in 1995 as a junior lecturer at the Faculty of Medicine, Transilvania University of Brașov, where I conducted practical work in internal medicine under the supervision of Prof. Dr. Mariana Rădoi. In 2000, I was promoted to university assistant through a competitive process, and in 2012, I advanced to senior lecturer, teaching courses in the following undergraduate programs at the Faculty of Medicine: Internal Medicine (4th and 5th year), General Nursing (2nd and 3rd year), Clinical Laboratory (2nd year), and Physical Therapy and Rehabilitation (3rd year). In 2017, as a recognition of the quality of my teaching and scientific activities, I became an associate professor.

Throughout this time, I have taught both theoretical courses and practical work in Internal Medicine to students in the Medicine, Clinical Laboratory, and General Nursing programs, as well as Rheumatology to students in the Physical Therapy and Rehabilitation program.

My PHD thesis was developed under the supervision of Prof. Dr. George Ioan Pandeale from the "Gr. T. Popa" University of Medicine and Pharmacy in Iași. The thesis evaluated the relationship between the presence of platelet activation markers and the occurrence of recurrent thrombotic events (arterial, venous, and multiple) in patients with primary and secondary antiphospholipid syndrome. Special attention was also given to the evaluation of inflammatory markers such as fibrinogen and hsPC, with results suggesting a reduced inflammatory state in antiphospholipid syndrome, despite the disease being defined as a non-inflammatory autoimmune disorder.

International recognition is reflected by the number of scientific papers published in high-visibility journals indexed in international databases: 15 articles in ISI Web of Science, with 116 citations and an h-index of 6.

My experience in management and leadership was demonstrated between 2015 and 2019 when I was elected Medical Director of the Brașov County Emergency Clinical Hospital. During this time, I coordinated the hospital's team responsible for writing projects that were funded through the 2014–2020 Regional Operational Program, aimed at equipping the Outpatient Department and the Emergency Unit. The project for equipping the Outpatient Department with medical equipment and devices at the Brașov County Emergency Clinical Hospital, funded through the 2014–2020 Regional Operational Program, was developed and implemented in collaboration with the Brașov County Council, with a value of 10,699,095.67 lei.

The evaluation of thrombotic risk in patients with antiphospholipid syndrome is a complex and continually evolving topic, given the heterogeneous nature of the disease, which I intend to further develop. Emerging new research directions will focus on integrating biological markers, advanced imaging techniques, and genetic profiles, including:

- Defining advanced biomarkers and multimarker profiles (subtypes of antiphospholipid antibodies: specific evaluation of IgA antibodies or antibodies against domain 1 of beta-2-glycoprotein I, evaluating the significance of diagnostic biomarkers in seronegative patients) to better stratify thrombotic risk.

- Evaluating inflammatory and procoagulant biomarkers such as thrombomodulin, tissue factor, neutrophils, and extracellular traps (NETs) in association with aPL.

- Identifying metabolic profiles associated with hypercoagulability in patients with APS.

- Studying genetic variants associated with coagulation (e.g., factor V Leiden, prothrombin) or inflammatory response.

- Analyzing epigenetic modifications (DNA methylation, miRNA) associated with thrombotic risk.

- Integrating thrombotic risk in the context of other autoimmune diseases (e.g., systemic lupus erythematosus) or in association with cardiovascular risk factors.

- Identifying infectious or environmental factors that may trigger thrombotic events.

- Using integrated risk models and artificial intelligence (AI) to develop algorithms that combine clinical, imaging, and biomarker data to predict thrombotic risk more accurately by analyzing complex data and identifying risk patterns.

My personal plans for development and professional growth are based on my previous teaching and professional activities, and obtaining the right to supervise doctoral theses represents the key to success in my future professional and scientific endeavors. Guided by the distinguished personalities of the academic community leading the Doctoral School at Transilvania University of Brașov, this



achievement will allow me to further my personal development. Additionally, it will give me the opportunity to guide young doctors toward successful academic careers, ultimately incorporating them into the academic elite of Transilvania University of Brașov.

## Rezumat

Teza de abilitare „TROMBOZA ȘI INFLAMAȚIA: DE LA MEDICINA BAZATĂ PE DOVEZI LA MEDICINA PERSONALIZATĂ” include realizările mele științifice, profesionale și academice și, de asemenea, planurile mele personale de dezvoltare ulterioară a carierei. În elaborarea acestei teze am pornit de la principiul că abilitarea în domeniul medicinei reprezintă recunoașterea atingerii unui înalt nivel de pregătire profesională, academică și științifică.

Inflamația și tromboza sunt două procese fiziologice esențiale care, atunci când scapă de sub control, devin factori majori în patogenia bolilor cardiovasculare, sindromului antifosfolipidic și altor afecțiuni asociate. O abordare multidisciplinară este crucială pentru înțelegerea acestor mecanisme și a interacțiunii lor, având potențialul de a revoluționa modul în care evaluăm riscurile trombotice și dezvoltăm terapii personalizate. Prin identificarea biomarkerilor specifici și explorarea interacțiunii dintre inflamație și tromboză, se realizează diagnosticarea precoce și intervențiile terapeutice, cu impact direct asupra prognosticului pacienților. O abordare integrativă care implică diverse domenii medicale și științifice va oferi soluții personalizate pentru prevenirea și gestionarea riscurilor, consolidând astfel contribuția medicinei personalizate la creșterea calității vieții pacienților.

Abordarea acestor subiecte aduce o contribuție importantă în domeniul medical, deoarece poate ghida dezvoltarea unor strategii mai eficiente de prevenire și tratament, bazate pe profilul individual al pacienților, reducând riscurile trombotice și inflamatorii în afecțiunile cardiovasculare, infecțioase, neuropsihice etc.

Prima secțiune a tezei de abilitare cuprinde principalele rezultate ale activității mele profesionale, academice și de cercetare, în strânsă corelație cu nivelul de cunoștințe în domeniile de cercetare din momentul respectiv, fiind menționate cele mai importante contribuții științifice din domeniul atât din punct de vedere clasic cât și din cel al interdisciplinarității și al medicinei integrative.

Capitolul 1 prezintă principalele rezultate ale cercetării științifice sistematizate pe principalele domenii de cercetare respectiv: evaluarea riscului de tromboză recurentă la pacienții cu sindrom antifosfolipidic, rolul markerilor inflamatori de grad scăzut și al activării plachetare ca predictor ai

evenimentelor trombotice la pacienții cu sindrom antifosfolipidic, evaluarea răspunsul inflamator în evoluția pacienților cu patologii diverse, fiind în final amintite sumar și alte domenii de cercetare

Primul domeniu de cercetare a fost evaluarea riscul de tromboză recurentă la pacienții cu sindrom antifosfolipidic (APS), o afecțiune caracterizată prin prezența anticorpilor antifosfolipidici (aPL), asociată cu evenimente trombotice și morbiditate în sarcină. Acest domeniu m-a preocupat încă de la începutul carierei mele profesionale și științifice, în acest context fiind elaborată și teza de doctorat: "Markeri de activare plachetară în sindromul antifosfolipidic". Scopul principal al cercetării a fost evaluarea valorii prognostice a nivelurilor de P-selectină și sCD40L pentru predicția evenimentelor trombotice recurente la pacienții cu APS. Rezultatele publicate au arătat că pacienții cu APS (primar, secundar lupusului eritematos sistemic sau altor afecțiuni reumatice), au avut niveluri semnificativ mai mari de Pselectină și sCD40L comparativ cu controalele sănătoase, acești markeri corelând cu apariția evenimentelor trombotice acute și recurente. Analiza statistică a relevat că P-selectina a fost un predictor independent al trombozei recurente la pacienții cu APS. În plus, s-a constatat o activare plachetară crescută la pacienții cu APS, susținând rolul P-selectinei și sCD40L ca markeri importanți pentru evaluarea riscului trombotic. Acești markeri ar putea fi utilizați pentru a identifica pacienții cu un risc crescut de tromboză recurentă și pentru a dezvolta noi strategii profilactice. Articolele publicate subliniază importanța unei evaluări mai detaliate a activării plachetare și endoteliale în sindromul antifosfolipidic și oferă dovezi că acești markeri ar putea contribui la o mai bună stratificare a riscului trombotic la pacienții cu această afecțiune. În concluzie, P-selectina și sCD40L au fost identificați ca predictori importanți ai riscului de tromboză recurentă la pacienții cu APS, sugerând că acești markeri ar putea avea un rol crucial în managementul clinic al acestei boli.

Al doilea domeniu de cercetare analizează și rolul markerilor inflamatori de grad scăzut și al activării plachetare ca predictori ai evenimentelor trombotice la pacienții cu (APS). Deși APS este caracterizat prin tromboză vasculară în absența inflamației evidente, dovezile recente sugerează prezența unei stări proinflamatorii. Rezultatele au arătat că pacienții cu APS au avut niveluri semnificativ crescute de hs-CRP, Pselectină și sCD40L comparativ cu grupul de control. În plus, hs-CRP și aCL au fost identificați ca predictori independenți ai riscului de tromboză recurentă, în timp ce

nivelurile crescute de P-selectină au fost asociate cu tromboza recurentă. Aceste constatări sugerează o abordare mai personalizată în managementul riscului trombotic, bazată pe evaluarea acestor markeri.

Al treilea domeniu abordat în primul capitol a fost răspunsul inflamator și evoluția pacienților cu schizofrenie aflați sub tratament antipsihotic pe termen lung, infectați cu SARS-CoV-2. Pacienții cu schizofrenie prezintă comorbidități semnificative care ar putea crește riscul de forme severe de COVID-19, cum ar fi diabetul, hipertensiunea arterială și afecțiunile pulmonare cronice. Pacienții cu schizofrenie au avut un risc mai mic de forme severe de COVID-19 și o mortalitate scăzută comparativ cu grupul de control, deși aveau mai multe comorbidități. Markerii inflamatori (CRP și fibrinogen) au fost semnificativ mai scăzuți la pacienții cu schizofrenie decât în grupul de control. Un posibil motiv pentru aceste rezultate este accesul rapid la îngrijiri și monitorizarea constantă a pacienților spitalizați, dar și efectele potențiale ale antipsihoticelor asupra răspunsului inflamator. Pacienții cu schizofrenie aflați sub tratament antipsihotic pe termen lung au prezentat un risc redus de forme severe de COVID-19, iar tratamentul antipsihotic ar putea juca un rol protectiv în infecția cu SARS-CoV-2. Rezultatele sugerează necesitatea unor studii suplimentare pentru a înțelege mai bine aceste efecte.

În cadrul celui de al patrulea domeniu de cercetare, am abordat aspecte de medicină integrativă, respectiv studii care au analizat diverse extracte naturale, acoperind două mari domenii având potențială aplicabilitate în cadrul patologiei cardiovasculare sau a comorbidităților acestora "Noi strategii terapeutice în boala renală diabetică" revizuieste strategiile terapeutice actuale și emergente pentru managementul pacienților cu BRD, cu accent pe prevenirea progresiei bolii și reducerea riscului cardiovascular. Boala renală diabetică (BRD) reprezintă una dintre principalele complicații ale diabetului zaharat (DZ) și o cauză majoră de boală cronică de rinichi (BCR), afectând aproximativ 20-40% dintre pacienții cu diabet. Leziunile renale asociate BRD sunt multifactoriale, implicând factori metabolici, hemodinamici, proinflamatori și profibrotici. Printre aceștia se numără produșii de glicare avansată, specii reactive de oxigen, activarea sistemului renină-angiotensină-aldosteron (SRAA), factorii de creștere (TGF- $\beta$ ) și citokinele proinflamatorii (TNF- $\alpha$ , IL-6). Strategiile terapeutice actuale se concentrează pe încetinirea progresiei BRD și prevenirea complicațiilor cardiovasculare. În managementul pacienților cu BRD sunt utilizate terapii farmacologice de primă linie, cum ar fi inhibitorii sistemului renină-angiotensină-aldosteron (IECA și sartani) și inhibitorii cotransportorului-2 de sodiu-

glucoză (iSGLT2). Strategiile terapeutice în BRD sunt într-o continuă evoluție, iar noile molecule, cum ar fi iSGLT2 și antagoniștii receptorilor mineralocorticoizi, oferă perspective promițătoare pentru protecția renală și cardiovasculară. Abordarea multimodală, incluzând atât terapiile existente, cât și cele emergente, este esențială pentru optimizarea tratamentului pacienților cu BRD și DZ.

În capitolul 2 sunt sintetizate realizările mele profesionale și academice. Cariera mea academică a început în anul 1995 ca preparator universitar la Facultatea de Medicină a Universității Transilvania din Brașov, unde mi-am desfășurat activitatea (lucrări practice de medicină internă) sub supervizarea doamnei prof. dr. med. Mariana Rădoi. În anul 2000 am promovat prin concurs ca asistent universitar, în anul 2012 am promovat prin concurs ca șef de lucrări și am predat cursuri la următoarele programe de studii de licență ale Facultății de Medicină: Medicină internă-anul IV și V, Asistență medicală generală anul II și III, Laborator clinic anul II, Balneofiziokinetoterapie anul III. Din anul 2017, ca o recunoaștere a calității activității mele didactice și științifice, am devenit conferențiar universitar.

În tot acest timp am desfășurat activitate didactică, cursuri și lucrări practice de Medicină internă cu studenții programului de studii Medicină, Laborator clinic și Asistență medicală generală și Reumatologie cu studenții programului de studii Balneofiziokinetoterapie.

Lucrarea de doctorat a fost elaborată sub îndrumarea d-lui Prof. Dr. George Ioan Pandelescu, de la UMF „Gr. T. Popa” Iași și a evaluat relația dintre prezența markerilor de activare plachetară și evoluția cu evenimente trombotice recurente (arteriale, venoase și multiple) la pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar și secundar. De asemenea, o atenție deosebită s-a acordat evaluării markerilor de inflamație fibrinogen și hsPC, rezultatele sugerând existența unui statut inflamator redus în sindromul antifosfolipidic, deși boala a fost definită ca o boală autoimună noninflamatorie.

Recunoașterea internațională este concretizată prin numărul lucrărilor științifice publicate în reviste cu vizibilitate ridicată în bazele de date internaționale: 15 articole în ISI Web of Science având 116 de citări cu un index Hirsch de 6.

Experiența de management și conducere am demonstrat-o în perioada 2015-2019, când am fost aleasă în funcția de director medical al Spitalului Clinic Județean de Urgență din Brașov, În această perioadă am coordonat, din partea spitalului echipa care a lucrat la scrierea proiectelor ce au fost

finanțate prin Programul Operațional Regional 2014 – 2020 privind dotarea Ambulatoriului și a Unității de Primiri Urgențe. Proiectul Dotarea cu echipamente și aparatură medicală a Ambulatoriului Integrat al Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov finanțat prin Programul Operațional Regional 2014 – 2020, a fost elaborat și implementat împreună cu reprezentanții Consiliului Județean Brașov, cu o valoare de 10.699.095,67 lei.

Evaluarea riscului trombotic la pacienții cu sindrom antifosfolipidic este o temă complexă și în continuă evoluție, având în vedere natura heterogenă a bolii, pe care intenționez să o dezvolt în continuare, noile direcții de cercetare emergente, care se vor concentra pe integrarea markerilor biologici, a tehnicilor avansate de imagistică și a profilurilor genetice fiind:

-Definirea biomarkerilor avansați și profilurilor multimarker (subtipuri de anticorpi antifosfolipidici : evaluarea specifică a anticorpilor IgA sau a anticorpilor împotriva domeniului 1 a beta-2-glicoproteinei I, evaluarea semnificației biomarkerilor de diagnostic seronegativ) pentru a stratifica mai bine riscul trombotic.

-Evaluarea biomarkerilor inflamatori și procoagulanți precum trombomodulina, factorul tisular, neutrofilele și capcanele extracelulare (NETs) în asociere cu aPL.

-Metabolomică: Identificarea profilurilor metabolice asociate hipercoagulabilității la pacienții cu SAF.

-Studierea variantelor genetice asociate coagulării (de exemplu, factorul V Leiden, protrombina) sau răspunsului inflamator.

-Analiza modificărilor epigenetice (metilarea ADN, miARN) asociate riscului de tromboză.

-Integrarea riscului trombotic în contextul altor boli autoimune (de exemplu, lupus eritematos sistemic) sau al asocierii factorilor de risc cardiovascular.

-Identificarea factorilor infecțioși sau de mediu care pot declanșa evenimente trombotice.

-Utilizarea modelelor integrate de risc și inteligență artificială (IA) pentru dezvoltarea de algoritmi care integrează date clinice, imagistice și biomarkeri pentru a prezice riscul trombotic cu mai mare precizie prin analiza datelor complexe și identificarea patternurilor de risc.

Planurile proprii de dezvoltare și evoluție profesională se bazează pe istoricul activității mele didactice și profesionale de până acum, iar obținerea dreptului de coordonare a tezelor de doctorat reprezintă cheia succesului în viitoarea activitate profesională și științifică, coordonate de marile personalități ale comunității academice aflate la conducerea Școlii Doctorale a Universității Transilvania din Brașov. Această realizare îmi va permite viitoarea dezvoltare personală, și în plus, îmi va oferi posibilitatea de a coordona spre o carieră academică de succes tinerii medici, pentru a fi incluși ulterior în elita academică a Universității Transilvania din Brașov.

**(B) Realizări științifice și profesionale, planuri de evoluție și dezvoltare a carierei**





**(B-i) Realizări științifice și profesionale**

## Capitolul 1. Evaluarea riscului trombotic la pacientul cu sindrom antifosfolipidic

### 1.1. Riscul trombozei recurente în APS

#### 1.1.1. Riscul trombozei recurente în APS secundar LES

---

Gavriș C, Anghel M, Rădoi M, Gheorghiu E, Duca L, Pamfil G, Bobescu E, Pandele G I. Risk of recurrent thrombosis related to antiphospholipid antibodies, soluble CD40L and P selectin seric levels in patients with antiphospholipid syndrome secondary to SLE. Revista Română de Medicina de Laborator 2010; 18 (3):23-30.

---

Riscul de tromboză recurentă la pacienții (pt.) cu sindrom antifosfolipidic (APS) este crescut, dar există opinii contradictorii cu privire la anticorpii care ar trebui măsurați pentru a detecta pacienții cu risc de tromboză recurentă (Groot et al., Garcia et al., 2004). Observațiile experimentale sugerează că trombocitele au un rol important în patogeneza APS, iar CD62P și sCD40L sunt markeri independenți ai activării trombocitelor (Garcia et al., 2004; Urbanus et al., 2008; Espinosa et al., 2008). Există acum numeroase dovezi în literatura de specialitate (Cervera et al., 2002; Urbanus et al., 2008; Espinosa et al., 2008) că aPL sunt asociate în special cu un risc de tromboză, în special evenimente recurente și morbiditatea sarcinii. Riscul pare să fie mai mare pentru LA decât pentru aCL, dar când se ia în considerare un titru ridicat de aCL, riscurile sunt, de asemenea, mari (Groot et al., 2005; Galli et al., 2003). Cercetările privind patologia sindromului au fost dominate de multă vreme de ideea că fosfolipidele încărcate

negativ sunt tema centrală în jurul căreia există manifestările clinice ale sindromului (Galli et al., 2003; Galli, Borrelli et al., 2007). Astăzi, studiile s-au concentrat pe un concept de celule și de activare celulară (Urbanus et al., 2008; Horstman et al., 2009) drept cheie pentru dezvoltarea patofiziologiei sindromului. În ultimii 15 ani, au fost identificate proteine plasmatică și receptori celulari care sunt implicați în activarea celulară mediată de anticorpi antifosfolipidici. Mai multe tipuri de celule, printre altele trombocitele (Vega-Ostertag et al., 2004; Pereira et al., 2006; Joseph et al., 2006; Joseph et al., 1998), monocitele și celulele endoteliale, au fost investigate în laboratoare cu privire la posibila lor contribuție la boala mediată de anticorpi antifosfolipidici (Vega-Ostertag, Pierangeli et al., 2007; Raschi et al., 2003)). Activarea trombocitelor, exprimarea factorului tisular pe celulele endoteliale și leucocite și activarea sistemului complementului (Lopez-Pedraza et al., 2006; Sorice et al., 2007) se observă în prezența anticorpilor antifosfolipidici, oferind o posibilă explicație pentru manifestările clinice ale sindromului. Probabil cea mai larg acceptată ipoteză este că unele aPL pot activa trombocitele și alte celule pentru a promova tromboza. Se propune un scenariu cu două etape: o activare inițială slabă și subclinică, cum ar fi a plachetelor, expunerea suficientă aPL anionic favorizând legarea  $\beta$ 2-GPI sau anti- $\beta$ 2-GPI sau a altor aPL, urmată de activare trombotică completă, posibil implicând Receptorii Fc (Oku et al., 2008; Pennings et al., 2007).

Obiective: evaluarea semnificației nivelurilor de Pselectină și sCD40L pentru evoluția cu tromboză recurentă venoasă și arterială la pacienții cu APS. Ne-am propus să clarificăm dacă determinarea nivelurilor de Pselectină și sCD40L ar putea prezice evenimente tromboembolice ulterioare la pacienții cu APS. Al doilea scop a fost identificarea factorilor de risc clinici și serologici pentru evoluția cu evenimente trombotice recurente.

Metodă: studiu de cohortă nerandomizat, ambispectiv (retrospectiv și prospectiv pe 2 ani), a înrolat 20 de persoane. cu APS secundar LES (4 bărbați și 16 femei) vârsta medie de 47,87 (18-74) ani care au fost evaluați pentru istoricul trombotic și urmați 24 de luni pentru

evoluția cu noi evenimente trombotice. Douăzeci de subiecți sănătoși demografici au servit în mod similar drept martori. Anticorpii serici IgG sau IgM anticardiolipină (aCL), nivelurile serice de Pselectină și sCD40L (R&D Minneapolis, SUA) au fost evaluate folosind metoda ELISA la momentul inițial (V1) și după 12 luni (V2). Pacienții au fost diagnosticați conform clasificării Sapporo revizuite pentru criteriile APS. Pacienții au fost excluși dacă au fost tratați cu aspirină sau clopidogrel înainte de prelevarea de sânge, deoarece impactul potențial al acestor medicamente asupra activității trombocitelor nu poate fi determinat. La pacienții cu eveniment trombotic acut, moleculele de adeziune solubile au fost măsurate în momentul determinării aPL (2-3 zile după tromboză). Episoadele trombotice sau pierderile de sarcină înainte de prima vizită au fost considerate evenimente trombotice. Două episoade de tromboză din istoric au fost considerate tromboze recurente și mai mult de 3, tromboze multiple. Noile episoade de tromboză venoasă sau arterială au fost considerate eveniment trombotic acut. Metodele de diagnostic utilizate pentru depistarea trombozei în timpul urmăririi au fost ultrasonografia pentru tromboza venoasă profundă, tomografia computerizată (CT) pentru tromboza cerebrală, arteriografia pentru ocluziile arteriale periferice și angio-CT pentru embolia pulmonară. Evenimentele clinice survenite în timpul urmăririi au fost clasificate ca: 1) tromboză venoasă (membre inferioare, embolie pulmonară, tromboză retiniană, cerebrală și mezenterică); 2) tromboză arterială (artere retiniene, cerebrale, renale, mezenterice, coronare sau periferice); 3) evenimente de sarcină (avort spontan cauzat de o indicație legată de sindromul antifosfolipidic); nu a existat niciun pacient cu eveniment catastrofal (dovezi clinice de implicare a mai multor organe pe o perioadă scurtă). Analiza statistică a fost efectuată utilizând pachetul statistic SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Valorile cantitative au fost exprimate ca medie  $\pm$  abaterea standard, iar valorile calitative ca procent. În timp ce testul  $\chi^2$  a fost utilizat pentru valori categorice, analiza varianței (ANOVA) a fost utilizată pentru a compara variabilele continue, după caz. O valoare  $p < 0,05$  a fost considerată semnificativă statistic. În analiza multivariabilă, variabilele independente pentru tromboza recurentă au fost

Pselectina, nivelurile de sCD40L și aCL. Analiza de regresie logistică multiplă a fost utilizată pentru a investiga dacă titrul mare de Pselectin, sCD40L și aCL au fost asociate cu tromboză recurentă și evenimente trombotice acute. Studiul a fost aprobat de comitetul local de etică a cercetării și a fost obținut consimțământul informat scris de la toți pacienții.

Rezultate: Caracteristicile inițiale, evenimentele trombotice și rezultatele urmăririi populației studiate sunt prezentate în Tabelul 1. Pacienții cărora li s-a administrat warfarină au raportul mediu internațional normalizat fiind de 2,1 la momentul înscrierii. Un singur pacient cu LES a suferit un eveniment trombotic acut până la sfârșitul urmăririi (tromboză venoasă). Pct. cu APS secundar LES au prezentat niveluri semnificativ mai mari de V1 Pselectin și V1sCD40L decât subiecții sănătoși ( $209,46 \pm 145,01$  față de  $94,20 \pm 20,75$  ng/dl;  $p=0,0011$ ) și ( $13339,64 \pm 12960,74$  față de  $3450,17 \pm 1244,02$  ng/dl  $p=0,0021$ ); S-au observat corelații pozitive semnificative între nivelurile de sCD40L și P selectină. La V2 Pselectina solubilă și sCD40L au fost  $198,52 \pm 192,50$  ng/ml și  $5891,93 \pm 4845,03$  pg/ml în cazuri și  $94,20, \pm 20,75$  ng/ml și  $3277,66 \pm 1435,73$  pg/ml la controale respectiv ( $p=0,0210$ ;  $p=0,0266$ ). Pacienții cu SPA cu antecedente de tromboză recurentă au avut niveluri mai mari de pselectină V1 decât pacienții cu SPA fără antecedente de tromboză ( $256,63 \pm 145,79$  față de  $121,85 \pm 101,47$  ng/dl;  $p=0,04$ ) (fig 1). Nu s-au observat corelații semnificative între nivelurile sCD40L și aCL la pacienții cu tromboză recurentă și la pacienții fără tromboză recurentă ( $15402,29 \pm 15290,62$  versus  $9508,99 \pm 6164,03$  pg/dl;  $p=0,34$ , respectiv  $194,25 \pm 194,237,59$  față de  $52,57 \pm 10,64$  UPL  $p=0,13$ ). Nivelurile V1 Pselectinei au fost semnificativ mai mari la pacienți. cu evenimente arteriale recurente comparativ cu pacienții fără antecedente de tromboză arterială ( $256,63 \pm 145,79$  versus  $121,85 \pm 101,47$  ng/dl;  $p=0,04$ ) (Fig 1). Nivelurile V2sCD40L au fost semnificativ mai mari la pt. cu evenimente venoase recurente comparativ cu pacienții fără antecedente de tromboză venoasă ( $13433,2 \pm 8249,39$  versus  $5004,72 \pm 3769,62$  pg/dl;  $p=0,015$ ) (Fig1).

Factori de risc pentru tromboză. Caracteristicile clinice și de laborator ale pacienților la diagnostic au fost analizate folosind modele univariate și multivariate pentru a evalua valoarea lor predictivă. Analiza univariată a arătat că predictorii semnificativi pentru tromboza recurentă au fost un titru ridicat de Pselectină V1 (>113 ng/ml) și un titru ridicat de sCD40L (>11451pg/ml) pentru tromboza venoasă. Analiza de regresie logistică multivariată a confirmat doar un titru de pselectină V1 de >113ng/ml ca factor de risc independent pentru tromboză la pacientul nostru. Nu a existat nicio diferență în frecvența aCL, nici IgG sau IgM, între grupurile trombotice și non-trombotice. A existat o tendință de creștere a LAC în grupul trombotic, dar nu semnificativă statistic.

Age,years	47±27
Male/female,n	4/16
Duration of APS(years)	5,6
Hypertension,n(%)	11 (50%)
Diabetes mellitus,n(%)	3 (15%)
Current smoker	3 (15%)
Hipercholesterolemia	11 (55%)
Hipertrigliceridemia	13 (65%)
Low HDL	2 (10%)
High LDL	8 (40%)
BMI ≥ 25,n(%)	8 (40%)
Warfarin,n(%)	8(40%)
aCL(-)LA(+),n(%)	5(25%)
aCL(+)LA(-),n(%)	15(75%)
ACL(+)LA(+),n(%)	5(25%)
Clinical findings,n(%)	
Venous thrombosis	5(25%)
Arterial thrombosis	10(50%)
Abortion	4(20%)
Recurrent thrombosis,n (%)	13(65%)
Multiple thrombosis,n(%)	3(15%)
Acute thrombotic event during follow-up, n(%)	1(5%)
L anticoagulant	
Percentage above normal	20%
Anticardiolipin antibodies IgG	
Percentage above normal	40%
Mean titre(GPL/ml)	85,5
Anticardiolipin antibodies IgM	
Percentage above normal	35%
Mean titre(MPL/ml)	58
VIP selectin	
Mean titre(ng/ml)	409,45

V1sCD40L	
mean titre (pg/ml)	13340
Thrombocytopenia	7(35%)
Livedo reticularis	2(10)

Table 1 Caracteristicile și evenimentele trombotice în grupul de studiu

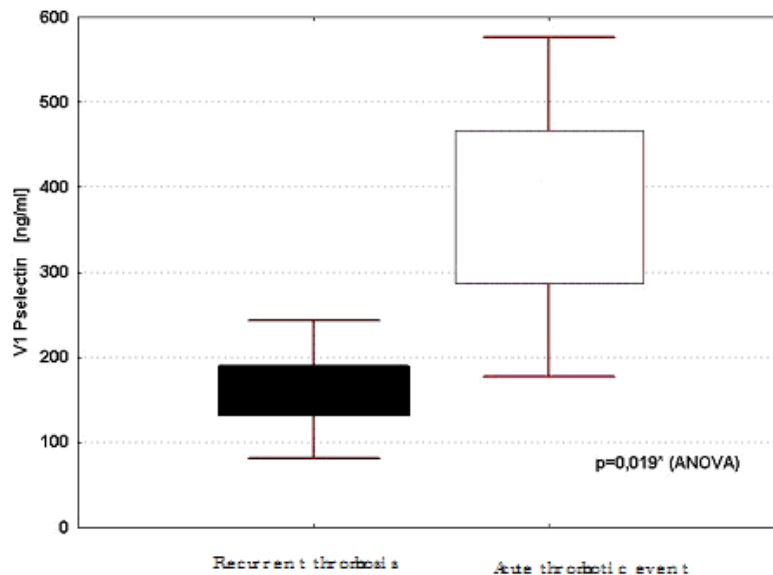


Fig 1 Valorile Pselectinei la pacienții cu PAPS și tromboză acută, versus pacienți cu PAPS și tromboză recurentă

**Discuții:** Deși au existat numeroase studii care au raportat riscul de tromboză arterială sau venoasă asociat cu anticorpii antifosfolipidici, există limitări metodologice importante și diferențe în caracteristicile studiilor, care pot explica rezultate contradictorii. Anomaliile ale hemostazei, fibrinolizei, endoteliului și trombocitelor au fost toate descrise în APS. Activarea anormală a trombocitelor în SPA poate reprezenta un statut „preembolic”. În APS este prezentă o stare procoagulantă persistentă, o activare continuă a endoteliului și a trombocitelor (Urbanus et al., 2008; Espinosa et al., 2008; Raschi et al., 2003; Oku et al., 2008), iar aceasta poate fi detectată prin niveluri crescute de molecule de adeziune solubile (Pennings et al., 2007; Turiel et al., 2005; Ferro et al., 2004; Inwald et al., 2003). În studiul nostru, pacienții cu evenimente trombotice recurente au avut niveluri semnificativ mai mari de Pselectină (V1 și V2), reflectând o activare a trombocitelor. Pselectina plasmatică s-a corelat și cu evenimentele



trombotice acute. În plus, Pselectina poate prezenta o țintă pentru dezvoltarea de noi agenți tromboprolifacți în APS. Determinarea acestui marker de activare a membranei poate oferi un marker util pentru identificarea pacienților cu risc tromboembolic ridicat. Deși studiul nostru susține existența unei asocieri între evenimentele tromboembolice și Pselectină în APS, există multe probleme care necesită investigații suplimentare. Garcia și colab. ( Garcia et al., 2004) a studiat nivelurile de molecule de adeziune solubile la trei grupuri de subiecți: 20 de pacienți cu APS primar și asociat cu lupus eritematos (toți cu un episod trombotic arterial sau venos sau ambele), 20 de subiecți cu aPL fără nicio tromboză clinică și 20 subiecți sănătoși. Prezența aPL cu și fără constatări clinice este legată de niveluri crescute de E-selectină, un marker al activării endoteliale. Concentrația serică a ICAM-1, moleculă care mediază aderența fermă a celulelor circulante a fost normală (absența evenimentelor clinice în timpul urmăririi cu posibilitatea unei niveluri crescute de ICAM-1 în raport cu apariția de noi trombi).

Prezența simultană a nivelurilor crescute de Pselectină la pacienții cu APS susține dovada unei activări plachetare, stare ca explică descoperirea clinică a acestei boli. Persistența unor niveluri crescute de molecule de adeziune guvernează o exprimare crescută a acestor antigene ca o consecință a trombozei sau avorturilor recente. Sistemul ligand CD40–CD40 (CD40L) a fost implicat în patofiziologia complicațiilor aterotrombotice și prognosticul bolilor cardiovasculare, precum și în procesele de inflamație și tromboză [27,28]. CD40L exprimat la suprafață este scindat din trombocite pe o perioadă de la minute la ore, generând ulterior un fragment solubil. Se crede că ligandul CD40 solubil circulant (sCD40L) derivă predominant din trombocitele activate și, prin urmare, poate reflecta activarea trombocitelor. Concentrațiile plasmatice mari de sCD40L au fost propuse a fi asociate cu risc vascular crescut. Domenico Ferro și colab. au investigat relația dintre anticorpii antifosfolipidici și nivelurile de sCD40L la pacienții cu LES care au fost aPL pozitiv (Ferro et al., 2004). Grupul lor a demonstrat că sCD40L este mai crescut în LES cu APL în comparație cu cei fără acești anticorpi; specificitatea acestor constatări a fost coroborată de lipsa de diferență a activității bolii, care ar putea afecta

nivelurile de sCD40L în cele două subgrupuri. Pacienții cu LES aPL(+) cu antecedente de tromboză au avut sCD40L circulant mai mare decât cu LES aPL(+) fără antecedente de tromboză în opoziție cu pacienții cu LES aPL(+) cu tromboză anterioară și cu pacienții cu LES(+) cu tromboză anterioară care au prezentat niveluri normale de sCD40L. Deoarece sCD40L este cunoscut că exercită un efect protrombotic, creșterea nivelurilor circulante de sCD40L poate reprezenta un nou mecanism de tromboză în SPA. În studiul nostru, pacienții cu evenimente trombotice recurente au avut niveluri mai mari de sCD40L V1 și V2, reflectând o activare sporită a trombocitelor (cum ar fi nivelurile de Pselectină) pe parcursul întregii perioade de urmărire. Este primul studiu care a efectuat determinarea în serie a acestui marker de activare a membranei la pacientul cu APS. Studiul nostru susține existența unei asocieri între evenimentele tromboembolice și Pselectină ca marker al activării trombocitelor în SPA, existând multe aspecte care necesită investigații suplimentare. Prezentul studiu are mai multe limitări. În primul rând, dimensiunea eșantionului din studiu a fost mică. În cele din urmă, populația noastră de studiu are o rată de evenimente relativ scăzută, în ciuda pacienților cu risc relativ ridicat.

Concluzii: Pselectina pare a fi un test serologic cel mai probabil să fie corelat cu tromboza recurentă la pacienții cu APS.

---

Recurrent thrombosis related to platelet activation in patients with SLE. Authors: Gavriș C, Rădoi M, Gheorghită E, Anghel M, Gorgon P, Duca L, Pamfil.G, Pandeles G I 7th International Congress on Autoimmunity

---

Background : Activarea trombocitară identifică riscul de tromboză la subiecții pozitivi pentru anticorpi antifosfolipidici, iar Pselectina și CD40L sunt markeri mai direcți ai activării trombocitelor.

Obiective: evaluarea valorii prognostice a P selectinei și CD40L pentru evoluția cu tromboză recurentă la pacienții cu SLE asociat.

Metode: 20 pacienți cu APS asociat LES, vârsta medie .47,67(18-74) ani, 17 femei și 3. bărbați au fost urmăriți 24 de luni pentru evoluția cu tromboză recurentă .Activarea trombocitară a fost măsurată prin CD40L și Pselectină atât prin citometrie în flux cât și prin ELISA la momentul inițial si dupa 12 luni. Douăzeci de subiecți sănătoși demografic au servit în mod similar drept martori. Statistici: test t/ANOVA, regresie logistică.

Rezultate O corelație pozitivă semnificativă a fost observată între nivelurile de Pselectină la pacienți. cu și fără antecedente de tromboză recurentă (256,632±112,22 versus 121,85±20,12ng/ml;p=0,043). Nu s-a evidențiat nicio diferență în ceea ce privește nivelul Pselectinei, respectiv tromboza legată de activarea plachetară la pacienții cu sindrom anrifosfolipidic secundar LES. Procentul de trombocite CD40L-pozitiv în flux-citometrie între pacienții cu SPA cu și fără tromboză acută sau recurentă.

Concluzii: Analiza de regresie logistică a evidențiat că numai Pselectina s-a corelat cu tromboza recurentă.

### **1.1.2. Riscul trombozei recurente în APS**

---

Risk of recurrent thrombosis related to antiphospholipid antibodies, soluble CD40L and Pselectin seric levels in patients with antiphospholipid syndrome. Authors: Gavriș C, Rădoi M, Gheorghiuță E, Anghel M, Pandele G I. EULAR Congress 2010

---

Gavriș C, Dimienescu O, Bărăcan A, Neculoiu D, Cobelschi C. Risk of recurrent thrombosis related to antiphospholipid antibodies, soluble CD40L and P-selectin seric levels in patients with antiphospholipid syndrome. *Archives of the Balkan Medical Union* 2017; vol 52(2):166-171.

---

Riscul de tromboză recurentă la pacienții cu sindrom antifosfolipidic (SAF) este ridicat, însă există opinii contradictorii cu privire la anticorpii care ar trebui măsurați pentru a detecta pacienții cu risc de tromboză recurentă (Proulle et al., 2014). Observațiile experimentale sugerează că trombocitele joacă un rol important în patogeneza SAF, iar CD62P (P-selectină) și sCD40L sunt markeri independenți ai activării plachetare (Giannakopoulos et al., 2013; Espinosa et al., 2010).

Datele publicate au arătat că anticorpii antifosfolipidici (aPL) sunt asociați în special cu un risc de tromboză, în special evenimente recurente și morbiditate în sarcină (de Groot et al., 2011). Riscul pare să fie mai mare pentru anticoagulantul lupic (LA) decât pentru aCL, dar atunci când sunt luați în considerare titruri mari de aCL, riscul este, de asemenea, crescut (Jacob et al., 2002).

Cercetările în patologia SAF au fost „orbite” mult timp de ideea că fosfolipidele încărcate negativ reprezintă principalii determinanți ai manifestărilor clinice ale sindromului 13. Studii mai recente s-au concentrat pe un concept al celulelor și activării celulare ca fiind cheia pentru descifrarea fiziopatologiei sindromului (Fanelli et al., 1997). În ultimii 20 de ani, au fost identificați proteine serice și receptori celulari care sunt implicați în activarea celulară mediată de aPL. Activarea plachetară, expresia factorului tisular pe celulele endoteliale și leucocite și activarea sistemului complementului 2, au fost observate la pacienții aPL pozitivi (aPL+), oferind o posibilă explicație pentru manifestările clinice ale sindromului. Probabil cea mai larg acceptată ipoteză în prezent este că unii aPL pot activa trombocitele și alte celule pentru a promova tromboza. În modelele de șoarece cu APS, celulele endoteliale, monocitele și trombocitele s-au activat toate atunci când au fost perfuzate anticorpi anti-beta 2-glicoproteină I 25.

Lucrarea lui Proulle (Proulle et al., 2014) și colab. a relevat că inhibarea activării plachetare previne a doua activare a celulelor endoteliale 1. În acest context, ideea de a identifica un marker de activare plachetară, util ulterior în prezicerea riscului de evenimente trombotice la pacienții cu SAF, este o provocare.

**OBIECTIVUL STUDIULUI** a fost de a evalua valoarea prognostică a nivelurilor de P-selectină și sCD40L pentru evoluția cu tromboză venoasă sau arterială recurentă la pacienții cu APS. Ne-am propus să aflăm dacă nivelurile serice de P-selectină și sCD40L ar putea prezice evenimente tromboembolice ulterioare la pacienții cu APS

### **MATERIAL ȘI METODE**

Patruzeci și unu de pacienți cu SAF, diagnosticați conform criteriilor de clasificare revizuite Sapporo pentru SAF, cu vârsta medie de  $47,87 \pm 12,91$  ani, dintre care 30 de femei, au fost urmăriți timp de 24 de luni în ceea ce privește evoluția cu tromboză recurentă (venoasă sau arterială) (Grupul 1). Douăzeci de subiecți sănătoși cu caracteristici demografice similare au servit drept grup de control (Grupul 2).

Nivelurile serice de anticorpi IgG sau IgM anticardiolipină (aCL), P-selectină și sCD40L au fost evaluate (ELISA - R&D Minneapolis, SUA) la momentul inițial (V1) și după 12 luni (V2) în grupurile studiate. Paisprezece dintre pacienții din grupul cu SAF aveau sindrom antifosfolipidic primar (PAPS), 20 de pacienți aveau SAF secundar asociat cu lupus eritematos sistemic (LES), iar alți 7 pacienți aveau SAF secundar neasociat cu LES (non-LES).

Pacienții au fost excluși în cazul terapiei cu aspirină sau clopidogrel înainte de recoltarea probelor de sânge, deoarece impactul potențial al acestor medicamente asupra activității plachetare nu a putut fi determinat.

La pacienții care au prezentat un eveniment trombotic acut, moleculele de adeziune solubile au fost măsurate în momentul evaluării aPL (2-3 zile după tromboza acută). Cercetarea a fost aprobată de Comitetul de Etică local, iar fiecare pacient înscris a semnat un consimțământ informat.

Analiza statistică a fost efectuată folosind pachetul statistic SPSS 22.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Variabilele cantitative au fost exprimate ca mediană (percentila 25; percentila 75) (în cazul distribuției non-normale) sau medie  $\pm$  deviație standard (SD) (pentru variabilele distribuite normal), iar valorile calitative ca număr (n) și procent (%). În timp ce testul  $\chi^2$  a fost utilizat pentru valorile categorice, analiza varianței (test t/ANOVA) a fost utilizată pentru a compara variabilele continue și testul U Mann-Whitney pentru a compara medianele, după caz. O valoare  $P < 0,05$  a fost considerată semnificativă

statistic. Corelația variabilelor continue cantitative a fost evaluată prin testul Pearson, iar testul Spearman a fost utilizat pentru a studia corelațiile variabilelor calitative. Variabilele independente asociate cu tromboza recurentă, cum ar fi nivelurile serice de P-selectină, sCD40L și aCL, au fost luate în considerare pentru analiza de regresie multivariată. Analiza de regresie logistică a fost utilizată pentru a investiga dacă titrurile mari de P-selectină, sCD40L și aCL au fost asociate independent cu tromboza recurentă și evenimentele trombotice acute și ar putea prezice independent un eveniment trombotic.

## REZULTATE

Caracteristicile de bază, evenimentele trombotice și rezultatele urmăririi populației studiate sunt prezentate în Tabelul 1.

Pacienții care au primit warfarină au avut un raport internațional normalizat (INR) mediu = 2,1 la momentul includerii în studiu. Șapte pacienți au prezentat un eveniment trombotic acut până la sfârșitul perioadei de urmărire: 5 pacienți cu PAPS (dintre care 4 au avut tromboză venoasă și 1 a fost diagnosticat cu embolie pulmonară); 1 pacient cu LES (tromboză venoasă); și 1 pacient cu APS secundar non-LES (eveniment trombotic arterial).

Pacienții cu APS au prezentat niveluri serice V1 de P-selectină și V1 sCD40L semnificativ mai mari decât controalele sănătoase [195,4 (94,51; 316,27) vs. 102,92 (86,06; 109,17),  $P < 0,0003$ ], respectiv, [16871,6 (5727,90; 25670,40) vs. 4031,79 (2710,62; 4301,50),  $P = 0,000008$ ]. O corelație pozitivă semnificativă a fost observată între nivelurile lor serice. Nivelurile serice de P-selectină au fost semnificativ și pozitiv corelate cu nivelurile serice de sCD40L ( $R = 0,453$ ,  $P = 0,0004$ ).

La V2 (după 12 luni de urmărire), nivelurile de P-selectină și sCD40L solubile au fost semnificativ mai mari la pacienții cu APS față de controale [119,52 (73,79; 278,59) vs. 102,92 (86,06; 109,178),  $P = 0,019$ ], respectiv, [4767,9 (2873,47; 6837,75) vs. 4031,39 (2337,17; 4289,75),  $P = 0,045$ ].

Pacienții cu APS cu antecedente de tromboză recurentă au avut niveluri V1 de P-selectină mai mari decât pacienții cu APS fără antecedente de tromboză [212,203 (126,834; 316,05) vs. 94,51 (78,01; 316,27) ng/dL,  $P = 0,04$ ]. Nu s-a observat nicio diferență semnificativă în nivelurile de sCD40L la

pacienții cu APS primar și secundar cu tromboză recurentă, comparativ cu pacienții cu APS fără tromboză recurentă [4767,9 (2873,47; 6837,72) vs. 4031,39 (2337,17; 4289,75),  $P = 0,15$ ].

Regresia multivariată a titrurilor serice mari de P-selectină, sCD40L și aCL ca variabile asociate cu apariția evenimentelor trombotice, urmată de analiza de regresie logistică, a relevat P-selectina ca fiind cea mai potrivită variabilă pentru a prezice independent tromboza recurentă în grupul de pacienți cu APS (OR = 1,01, interval de încredere 95% (CI) = 1,0004-1,0207,  $P = 0,0028$ ).

Pacienții cu APS cu tromboză acută în timpul perioadei de urmărire au avut niveluri V1 de P-selectină semnificativ mai mari decât pacienții cu APS cu antecedente de tromboză recurentă [318,57 (222,89; 416,94) vs. 187,705 (120,54; 267,64),  $P = 0,04$ ] și comparativ cu pacienții fără antecedente de tromboză [92,11 (77,00; 289,36),  $P = 0,04$ ].

## DISCUȚII

Deși au existat numeroase studii care raportează riscul de tromboză arterială sau venoasă asociat cu aPL, există limitări metodologice importante și diferențe în caracteristicile studiilor, care pot explica rezultatele contradictorii.

Anomalii ale hemostazei, fibrinolizei, endoteliului și trombocitelor au fost descrise în APS. Activarea plachetară anormală în APS poate reprezenta un status „pre-embolic”. Nivelurile crescute ale moleculelor de adeziune solubile relevă o stare procoagulantă persistentă, o activare continuă a endoteliului și a trombocitelor la pacienții cu APS (Joseph et al., 1998; Kamath et al., 2001). În studiul nostru, pacienții cu APS cu evenimente trombotice recurente au avut niveluri semnificativ mai mari de P-selectină (atât la V1, cât și la V2), reflectând o activare plachetară crescută. Mai mult, nivelurile serice de P-selectină au fost semnificativ și pozitiv corelate cu apariția evenimentelor trombotice acute. Evaluarea acestui marker de activare a membranei plachetare poate oferi un marker util pentru identificarea pacienților cu APS cu risc tromboembolic ridicat. În plus, P-selectina poate reprezenta o țintă pentru noii agenți tromboprolifacți care urmează să fie dezvoltați pentru pacienții cu APS. Deși studiul nostru susține corelația dintre nivelurile serice ridicate de P-selectină și evenimentele tromboembolice în APS, există încă multe aspecte care trebuie investigate.

Fanelli și colaboratorii au investigat activarea plachetară la pacienții cu neuro-PAPS 15. Ei au investigat 16 pacienți cu PAPS prin citometrie în flux în prezența trombocitelor activate circulante, așa cum este definită de expresia de suprafață a glicoproteinei CD62 (P-selectină) dependentă de activare. În plus, a fost evaluată relația dintre trombocitele activate și anticorpul aCL. Comparativ cu subiecții normali, CD62 a fost găsit semnificativ crescut la pacienții cu PAPS. Mai mult, un procent semnificativ crescut de trombocite CD62-pozitive a fost găsit în grupul neuro-PAPS (9 pacienți) comparativ cu pacienții non-neuro-PAPS (7 subiecți),  $p < 0,01$ . Dimpotrivă, nu s-a găsit nicio diferență semnificativă între cele două grupuri, în ceea ce privește aCL IgG și numărul de trombocite din sânge. Mai mult, în grupul neuro-PAPS, nu s-a găsit nicio diferență în procentul de trombocite CD62-pozitive între cei 4 pacienți cu trombocitopenie și cei 5 pacienți cu număr normal de trombocite din sânge. În mod similar, subiecții neuro-PAPS cu tromboză arterială periferică și/sau venoasă anterioară nu au prezentat un nivel semnificativ mai ridicat de trombocite CD62-pozitive. În cele din urmă, s-a găsit o corelație liniară între nivelul de aCL IgG și procentul de trombocite CD62-pozitive la toți pacienții și, mai semnificativ, în grupul neuro-PAPS, dar nu și la pacienții non-neuro-PAPS. Datele noastre demonstrează că trombocitele activate circulante sunt detectabile prin citometrie în flux la majoritatea pacienților cu PAPS și sugerează existența unei relații între trombocitele activate, aCL și boala neurologică pe care pacienții cu PAPS ar putea să o dezvolte.

Garcia E. și colab.(Garcia et al., 2003) au studiat nivelurile moleculelor de adeziune solubile în trei grupuri de subiecți: 20 de pacienți cu PAPS asociat cu LES - toți cu un episod trombotic (arterial, venos sau ambele), 20 de subiecți cu aPL fără nicio manifestare clinică și 20 de controale sănătoase. Prezența aPL cu și fără manifestări clinice este legată de creșterea nivelurilor de E-selectină, un marker al activării endoteliale. Concentrația serică a moleculei de adeziune intercelulară-1 (ICAM-1) (o moleculă care mediază aderența fermă a celulelor circulante) a fost normală (absența evenimentelor clinice în timpul urmăririi, cu posibilitatea unui nivel crescut de ICAM-1 în raport cu apariția de noi trombi). Prezența nivelurilor crescute simultan de P-selectină la pacienții cu APS susține ideea unui status de activare plachetară ca o posibilă explicație a constatărilor clinice în această boală. Persistența nivelurilor crescute de molecule de adeziune exclude o expresie crescută a acestor antigeni ca o consecință a unei tromboze sau a unor avorturi recente.



Joseph JE. și colab. (Joseph et al., 1998) au examinat expresia markerilor de activare plachetară CD62P (P-selectină) și CD63 prin citometrie în flux la 20 de pacienți cu PAPS. Nivelurile de P-selectină solubilă au fost, de asemenea, testate. Nivelul median al P-selectinei solubile a fost semnificativ mai mare la pacienții cu PAPS comparativ cu pacienții de control. Pacienții care au primit aspirină au avut valori mediane CD63 mai mici comparativ cu pacienții care nu au urmat tratament cu aspirină. Terapia cu aspirină nu a prevenit semnificativ activarea plachetară care apare la unii pacienți individuali. Aceste date sugerează că, deși nu este excesivă, există un grad de activare plachetară crescută la unii pacienți cu PAPS, care nu poate fi întotdeauna suprimată prin terapia antiplachetară cu aspirină (Romay-Panabad et al., 2014; Mason et al., 2005).

Sistemul CD40-ligand CD40 (CD40L) a fost implicat în fiziopatologia complicațiilor aterotrombotice și în prognosticul bolilor cardiovasculare, precum și în procesele de inflamație și tromboză<sup>26,28</sup>. CD40L exprimat la suprafață este clivat de pe trombocite pe o perioadă de minute până la ore, generând ulterior un fragment solubil. Se crede că ligandul CD40 solubil circulant (sCD40L) derivă predominant din trombocite activate și, prin urmare, poate reflecta activarea plachetară. Concentrațiile serice ridicate de sCD40L au fost propuse a fi asociate cu un risc vascular crescut.

Ferro D. și colaboratorii au investigat relația dintre anticorpul APL și nivelurile de sCD40L la pacienții cu LES și aPL+. Ei au demonstrat că sCD40L a fost mai crescut la pacienții cu LES cu aPL comparativ cu cei fără aPL; specificitatea acestor constatări a fost coroborată de lipsa diferenței de activitate a bolii, care ar putea afecta nivelurile de sCD40L în cele două subgrupuri. Pacienții cu LES aPL (+) cu antecedente de tromboză au avut sCD40L circulant mai mare decât LES aPL (+) fără antecedente de tromboză. Deoarece se știe că sCD40L exercită un efect protrombotic, nivelurile circulante crescute de sCD40L pot reprezenta un nou mecanism de tromboză în APS.

Depozitarea complementului pe trombocite a fost identificată ca un marker al trombozei venoase, dar nu și arteriale, la pacienții cu LES, independent de factorii de risc tradiționali și de anticorpul aPL<sup>29</sup>. În studiul nostru, pacienții cu evenimente trombotice recurente au avut niveluri semnificativ mai mari de V1 și V2 sCD40L, reflectând o activare plachetară crescută (cum ar fi nivelurile de P-selectină) pe toată perioada de urmărire. Acesta este primul studiu care a efectuat determinări în serie ale acestui marker de activare a membranei plachetare la pacienții cu APS. Studiul nostru susține existența unei

asocieri între evenimentele tromboembolice și P-selectina serică ca marker al activării plachetare în APS. Cu toate acestea, există încă multe controverse care necesită investigații suplimentare.

### Limitări și perspective

Prezentul studiu are câteva limitări. Prima limitare a fost dimensiunea mică a populației studiate. În final, rata relativ scăzută a evenimentelor (tromboembolice) în grupul nostru APS, în ciuda pacienților cu risc relativ ridicat. Tromboza este caracteristica definitorie a sindromului antifosfolipidic, dar numai tromboza nu poate explica multe dintre caracteristicile clinice ale sindromului. Terapia anticoagulantă poate deveni un tratament incomplet pentru multe dintre simptomele sale. Studiul a constatat necesitatea de a lua în considerare factori de risc suplimentari (markeri de activare plachetară, markeri de activare endotelială) pentru cea mai bună informație clinică privind riscul trombotic, în special la pacienții care nu asociază prezența LA cu APS. Studiile recente au identificat P-selectina ca având proprietăți procoagulante și reflectând un status protrombotic. P-selectina crescută a fost identificată ca un factor de risc pentru tromboembolism și ca biomarker cu valoare predictivă pentru tromboza recurentă la pacienții cu anticoagulant lupic care au prezentat un prim eveniment trombotic. Acest studiu a identificat doi astfel de markeri pentru evaluarea riscului trombotic APS: P-selectină și sCD40L. Analiza utilității acestor doi markeri nu exclude alți markeri suplimentari în sindromul antifosfolipidic. Utilizarea combinației lor pentru evaluarea riscului trombotic ar putea avea o contribuție suplimentară la evaluarea riscului de recurență trombotică la pacienții cu sindrom antifosfolipidic. Evaluarea riscului trombotic este mai dificilă la pacienții cu sindrom antifosfolipidic seronegativ. La pacienții cu sindrom antifosfolipidic seronegativ, utilizarea combinată a P-selectinei și sCD40L poate avea o valoare suplimentară pentru evaluarea riscului trombotic. Markerii de activare plachetară pot juca un rol important în evaluarea riscului de tromboză la pacienții asimptomatici cu persistența pozitivității aCL, care este în prezent o controversă terapeutică. În prezent, la acești pacienți, riscul individual de tromboză trebuie evaluat, luând în considerare factorii de risc congenitali sau dobândiți pentru tromboză, combinația unei boli autoimune (în special lupus eritematos sistemic) și profilul anticorpilor antifosfolipidici (LA; IgG și/sau anti- $\beta$ 2-GPI titru moderat mai mare) pentru a lua în considerare inițierea profilaxiei primare pentru tromboză, cu doze mici de aspirină (75 până la 100 mg pe zi).

## CONCLUZIE

P-selectina s-a dovedit a fi un predictor independent al trombozei recurente în grupul nostru de studiu de pacienți cu sindrom antifosfolipidic, fiind astfel un posibil marker serologic promițător pentru evoluția/predicția evenimentelor trombotice la pacienții cu sindrom antifosfolipidic.

### 1.2. Rolul markerilor de activare plachetară în flowcitometrie la pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar (PAPS)

---

Gavriș C, Rădoi M, Gheorghită E, Anghel M, Bârsășteanu R, Gorgon P, Duca L, Pamfil.G, Pandele G I. Markerii de activare plachetară în flow-citometrie la pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar. Jurnalul Medical Brașovean 2010;2:64-67.

---

Studiile experimentale sugerează că trombocitele au un rol important (Espinosa et al., 2008; Garcia et al., 2004; Hughes et al., 1986) în patogenia sindromului antifosfolipidic, iar CD62P (Pselectina) și sCD40L sunt markerii independenți ai activării plachetare (Jankowski et al., 2003; Joseph et al., 1998).

Determinarea activării plachetare prin determinarea expresiei de suprafață a P-selectinei poate fi realizată folosind tehnica flow-citometriei cu fluorocromi în combinație cu anticorpi monoclonali. Chiar dacă diferiți markerii sunt considerați ca markerii ai activării plachetare și sunt utili în aprecierea participării plachetare în procesul patogenic al bolii, ei nu corelează absolut necesar cu severitatea și evoluția bolii. Deși rămâne parțial inexplicabil, nu este surprinzător faptul că o creștere în severitate a evoluției bolii nu determină în mod necesar o creștere corespunzătoare a activității plachetare (Joseph et al., 1998, Kamath et al., 2021).

Flow-citometria este un test care poate fi efectuat indiferent de numărul plachetelor și permite urmărirea sub tratament antiplachetar. Acest test poate fi efectuat cu colorări multiple în fluorescență a plachetelor în combinație cu anticorpi monoclonali, pentru a măsura

plachetele activate circulante, agregatele leuco-plachetare și microparticulele procoagulante derivate din plachete.

Plachetele trebuie să fie diferențiate de celelalte celule sanguine și acest lucru poate fi făcut folosind anticorpi împotriva proteinelor specifice membranare (CD41) . Metoda este foarte sensibilă și poate detecta activarea în procent de 0,8%[12].

Este descrisă o metodă flow-citometrică de determinare a gradului de activare plachetară care furnizează informații despre interacțiunile plachetelor și are un rol potențial în identificarea și diferențierea statusului trombogenic din sindromul antifosfolipidic.

Obiectiv: evaluarea semnificației exprimării plachetare a markerilor de activare pentru evoluția cu tromboze acute recurente arteriale sau venoase la pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar, precum și stabilirea corelației între prezența acestor markeri de activare și existența și tipul evenimentelor trombotice recurente (unice sau multiple, arteriale sau venoase) în antecedentele acestor bolnavi.

Material și metodă:

Paisprezece pacienți cu SAFP diagnosticați conform criteriilor Sapporo revizuite pentru AFS, cu vârsta medie 46,5 (18-74) ani, 7 femei și 7 bărbați au fost urmăriți 24 de luni pentru evoluția cu evenimente trombotice recurente. Evaluarea markerilor de activare plachetară s-a efectuat în citometrie de flux cu un flow-citometru FACS Calibur Becton-Dickinson. Tehnica de lucru în citometrie a fost conform protocolului elaborat de firma Becton-Dickinson. Tehnică care permite examinarea plachetelor proaspete sau fixate, nestimulate sau activate in vitro din sângele necoagulat și necentrifugat. Este necesară setarea flow-citometrului BD FACS pentru a permite achiziția plachetelor. În studiul nostru au fost pregătite plachete proaspete, nefixate și nestimulate urmărindu-se gradul lor de activare in vivo. Colectarea probelor s-a făcut folosind citrat de sodiu ca anticoagulant. Au fost excluși pacienții care urmau tratament cu heparină, aceasta putând determina activare plachetară in vivo. Pentru a avea o activare

artefactuală plachetară minimă s-au folosit tuburi de recoltare acoperite cu polistiren. Deoarece fixarea plachetelor cu formaldehidă ar fi afectat activarea plachetelor și ar fi redus în același timp legarea C62P pe plachetele fixate s-a folosit colorarea directă cu fluorocrom.

S-a folosit colorarea cu mai mulți fluorocromi la o aceeași determinare. Un anticorp conjugat cu fluorocrom a fost folosit pentru separarea plachetelor și achiziția lor prin legarea de un anticorp specific plachetar independent de activare-CD41. Alți doi anticorpi (anti-CD62P și anti-CD40L) conjugați cu doi fluorocromi diferiți au fost folosiți simultan pentru a evalua activarea plachetară realizată prin exprimarea CD62P și CD40L. Această dublă colorare a evaluat două aspecte ale activării plachetare. Separarea plachetelor în fluorescență a fost făcută folosind markerul plachetar independent de activarea plachetară (CD41). Profilul populației celulare care a fost pozitivă pentru acest marker a fost apoi analizat independent existând trei subpopulații de particule pentru probele pregătite din sângele venos: plachete singure, agregate leuco-plachetare și a treia populație reprezentată de microparticule cu diametrul de 0,1  $\mu$ , care sunt mai puțin luminoase.

Rezultate: Caracteristicile clinice la includere, evenimentele trombotice existente în antecedente și rezultatele urmărite la lotul de studiu sunt prezentate în tabelul 1. Nu au existat diferențe semnificative statistic între nivelul markerilor de activare plachetară CD40L și Pselectina la pacienții cu SAFP care au prezentat istoric de recurență arterială, recurență trombotică venoasă, recurență multiplă și pacienții cu SAFP fără istoric de recurență trombotică. Recurența multiplă a fost definită prin cel puțin trei episoade de tromboză arterială și/sau venoasă la un pacient cu sindrom antifosfolipidic.

Table 1 Caracteristicile clinice la includere, evenimentele trombotice existente în antecedente și rezultatele urmărite la lotul de studiu

Vârstă, ani	45,5±27
-------------	---------

Bărbați/femei,n	7/7
Duration of APS(ani)	3,5
Hipertensiune,n(%)	5 (45%)
Diabet zaharat,n(%)	1 (10%)
Fumători	2 (45%)
Hipercolesterolemie	7 (50%)
Hipertrigliceridemie	17 (42,5%)
HDL scăzut	4 (10%)
LDL crescut	25 (64%)
BMI $\geq$ 25,n(%)	16 (39%)
Acenocumarol,n(%)	3(7,31)
aCL(-)LA(+),n(%)	1(2,4%)
aCL(+),n(%)	30(73,11%)
ACL(+),n(%)	10(24,39%)
Evenimente trombotice	14(100%)
,n(%)	5(45%)
Tromboze venoase	6(42,85)
Tromboze arteriale	2(14,28%)
Avorturi	
Tromboze recurente,n (%)	12(85,71%)
Tromboze recurente multiple,n(%)	7(14%)
Evenimente trombotice	6(42,85%)

acute pe perioada urmăririi, n(%)

L	anticoagulant,	6(42,85%)
procent(%)		
Atc. anticardiolipinici tip		
IgG		6(42,85%)
Percent peste normal		41,22(GPL)
Titru mediu (GPL/ml)		
Trombocitopenia,n (%)		0(0%)
Livedo reticularis,n (%)		1(7,14)

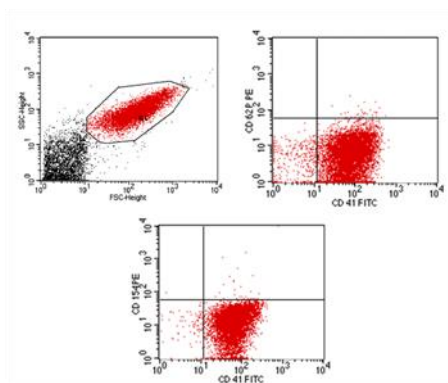


Fig 1. Histograma plachetelor: intensitatea fluorescenței pe FITC pe axa x și a ficoeritrinei (PE) pe axa y. Particulele CD41+ sunt împărțite în trei populații pe baza LFS (forward-scattered light) pe axa y și LLS (side-scattered light) pe axa x: plachetele libere (aria delimitată), agregatele plachetare și agregatele microplachetare. FITC este fixat pe markerul specific plachetar CD41 și PE este fixată pe markerul de activare CD62P și respectiv CD40L.

Un singur pacient dintre cei șase care au avut un eveniment trombotic acut pe perioada urmăririi a exprimat markeri de activare plachetară.

Discuții

Deși există numeroase studii care au raportat riscul trombozei arteriale sau venoase determinat de prezența aFL, există importante limite metodologice și diferențe între designul studiilor care explică rezultatele contradictorii raportate (Kaplanski et al., 2000; Perry et al., 2003; Shechter et al., 19).

Anomalii ale hemostazei, fibrinolizei, endoteliului și trombocitelor, toate au fost descrise în sindromul antifosfolipidic. Activarea anormală din SAF poate reprezenta un status „pre-embolic”, continua activare plachetară și endotelială (Levine et al., 2002; Patrick et al., 2002; Tănăsescu et al., 2007) prezentă în SAF determinând un status procoagulant, poate fi detectată prin creșterea nivelelor serice ale moleculelor de adeziune.

În studiul nostru pacienții cu SAF cu episoade trombotice recurente în antecedente, au avut nivele comparabile față de cei fără evenimente trombotice recurente, Determinarea acestor markeri de activare plachetară poate reprezenta o modalitate de identificare a pacienților cu risc crescut tromboembolic. De asemenea P selectina poate reprezenta o țintă pentru demonstrarea unor noi agenți terapeutici antitrombotici.

Faneli și colaboratorii (Faneli et al., 1997) au găsit valori crescute ale CD62P (Pselectinei) și CD63 (amândoi markeri ai activării plachetare) pe plachete la pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar. Emmi (Emmi et al., 1997) și colab. au confirmat aceste nivele crescute plachetelor CD62 pozitive la 16 pacienți cu sindrom antifosfolipidic primar. De asemenea au găsit nivele crescute ale CD62 la pacienții cu complicații neurologice față de pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar fără complicații neurologice. De asemenea au găsit o relație lineară între nivelul anticorpilor anticardiolipinici tip IgG și procentul trombocitelor CD62 pozitive. Nivelul trombocitopeniei este moderat, rareori fiind sub  $80 \times 10^9/L$  și de obicei nu are semnificație clinică.



Limitele acestui studiu sunt reprezentate de existența unui lot mic de pacienți; de asemenea populația de studiu a avut o rată scăzută de evenimente trombotice acute, deși pacienții au prezentat un risc tromboembolic crescut.

### 1.3. Rolul markerilor inflamatori de grad scăzut ca predictor ai evenimentelor trombotice în APS

Gavriș C, Poroș V, Simion L, Bărcan A, Toader E, Pascu AM. Biochemical Markers with Low-grade Inflammation as Predictors of Thrombotic Events in Antiphospholipid Syndrome. *Revista de Chimie* iulie 2017; 68(7):1586-1590.

Sindromul antifosfolipidic este definit histopatologic prin prezența trombozei vasculare în absența semnelor de inflamație.

Cu toate acestea, date publicate recent au raportat dovezi pentru o stare pro-inflamatorie în APS (da Silva et al, 2015; Sciascia et al., 2016). Un răspuns pro-inflamator endotelial indus de anticorpi antifosfolipidici a fost demonstrat prin creșterea reglată a moleculelor de adeziune (molecula de adeziune a celulelor vasculare-1 - VCAM-1 și E-selectină) și sinteza și secreția de citokine pro-inflamatorii. În plus, a fost raportată activarea plachetară și creșterea aderenței leucocitelor la endoteliul activat (Salmon et al., 2007; Giannakopoulos et al., 2008). În APS catastrofic (care afectează mai puțin de 1% dintre pacienții cu APS cu evoluție invariabilă către o afecțiune care pune viața în pericol), răspunsul inflamator sistemic cauzat de eliberarea excesivă de citokine din țesuturile necrotice a fost descris ca un posibil nou mecanism patogen. Un alt exemplu de inflamație ca mecanism patogen de bază în APS este rolul deja descris al complementului în pierderile recurente de sarcină la pacienții cu APS. Pe scurt, produsele de activare a complementului pot provoca un dezechilibru al factorilor de creștere vasculară necesari pentru evoluția normală a sarcinii, provocând o perfuzie placentară insuficientă responsabilă pentru complicații (Balan et al., 2017; Navolan et al., 2016).

Activarea inflamatorului a fost demonstrată in vivo într-un model de șoarece. Mai mult, celule cu o expresie crescută a caspazei-1 și a domeniului pirinei familiei NLR care conține 3 (NLRP3) și o concentrație serică ridicată (de până la trei ori) de interleukină-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) au fost descrise la pacienții cu

APS. Aceste descoperiri ar putea sugera o activare cronică a inflammasomului și influența cofactorilor independenți de anticorpii antifosfolipidici (aPL) asupra patogenezei APS (Mulla et al., 2013; Loud et al., 2004).

Cu toate acestea, impactul inflamației în declanșarea mecanismelor patogene în SAF nu este încă definit. Studiul a avut ca scop investigarea ipotezei inflamației de grad scăzut în SAF în corelație cu riscul de evoluție cu evenimente trombotice prin evaluarea markerilor biochimici specifici pro-inflamatori și de activare plachetară.

#### Metode. Populația studiată

Studiul de cohortă ambispectiv (retrospectiv și prospectiv pentru o perioadă de urmărire de 12 luni), nerandomizat, a inclus 41 de pacienți diagnosticați cu aPS în cadrul Departamentelor de Hematologie, Neurologie, Reumatologie și Imunologie Clinică ale Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov (grupul A) și 40 de voluntari sănătoși fără risc de tromboză (grup de control). Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică local, iar toți pacienții incluși au semnat un consimțământ informat (Agheorgiesei et al., 2015), iar procedurile experimentale au fost efectuate în conformitate cu principiile obligatorii ale eticii (Toader et al., 2012; Toader et al., 2006).

Populația studiată a inclus 14 pacienți cu sindrom antifosfolipidic primar (PAPS), 20 de pacienți cu APS secundar lupusului eritematos sistemic (LES secundar APS) și 7 pacienți cu APS secundar altor boli de colagen decât LES (non-LES APS secundar). Diagnosticul de APS a fost stabilit conform criteriilor revizuite de la Sapporo (Miyakis et al., 2006).

Criterii de includere: pacienți cu APS primar și secundar cu cel puțin un criteriu clinic și unul de laborator.

În momentul includerii, pacienții au fost evaluați retrospectiv pentru antecedente de evenimente trombotice și prospectiv pentru evoluția unor noi episoade trombotice pe o perioadă de urmărire de 12 luni (numărul și tipul de tromboză: arterială, venoasă, arterială și venoasă, unică sau multiplă).

Aparitia a cel puțin două evenimente trombotice (arteriale și/sau venoase și/sau complicații obstetricale), fie în momentul includerii, fie în timpul perioadei de urmărire, a fost considerată tromboză recurentă.

Nu a existat niciun pacient cu APS catastrofic (dovadă clinică a bolii organice multiple într-o perioadă scurtă de timp). Este important de subliniat că un pacient cu LES-APS secundar din grupul de studiu a avut o evoluție normală a unei sarcini în timpul urmăririi, ceea ce este o condiție rară.

### **Evaluarea markerilor biochimici**

Nivelurile serice de anticorpi IgG sau IgM anticardiolipină (aCL), P-selectină, CD40L solubil (sCD40L) și proteină C reactivă de înaltă sensibilitate (hs-CRP) au fost evaluate la momentul inițial (V1) și după 12 luni de urmărire (V2), după cum urmează:

- Screening și tiparea aCL (IgG, IgM) (ELISA, reactiv Quanta, Litelnova Diagnostics Inc San Diego, Bio-Rad PR1100, valoare normală < 18 UI/mL). Titrurile aCL au fost exprimate în unități de fosfolipide IgG (GPL) sau IgM (MPL). Titrurile > 40 GPL sau MPL au fost considerate moderate-mari, în timp ce titrurile < 40 GPL sau MPL au fost considerate scăzute.

- Determinarea anticoagulantului lupic (LA) a fost efectuată folosind următoarele teste de coagulare: timpul de coagulare cu caolin, timpul de tromboplastină parțial activată (aPTT), timpul de protrombină (PT) și timpul de venin de viperă Russell diluat (dRVVT).

- Evaluarea hs-CRP (imunoturbidimetric, reactiv Diagnostic Systems International, Hitachi 717, valoare normală < 0,5 mg/L). Metoda este recomandată pentru probe cu concentrații < 20 mg/L (interval 0,05 - 20 mg/L).

- Evaluarea markerilor de activare plachetară a fost efectuată printr-o tehnică ELISA în fază solidă (Human s-P-selectin, R & D Systems, Minneapolis, SUA) pentru a determina nivelurile serice de P-selectină solubilă, valori normale < 113 ng/mL și

- Forma solubilă a CD40L a fost evaluată printr-o tehnică ELISA în fază solidă (Human sCD40L, R & D Systems, Minneapolis, SUA), valori normale < 11451 pg/mL.

Cei șapte pacienți cu un eveniment trombotic acut în timpul urmăririi au fost incluși în momentul internării pentru complicația trombotică. Evaluarea markerilor biochimici ai activării plachetare și inflamației a fost efectuată în același timp cu titrurile aCL (în primele două până la trei zile după diagnosticarea evenimentului trombotic).

### **Diagnosticul trombozei**

Diagnosticul de tromboză a fost realizat prin ecografie pentru tromboza venoasă profundă, angio-tomografie computerizată pentru tromboembolism pulmonar, arteriografie pentru ocluzia arterială periferică și tomografie computerizată pentru tromboza cerebrală.

### **Statistică**

Analiza statistică a fost efectuată folosind pachetul statistic SPSS 22.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Variabilele cantitative continue au fost exprimate ca mediană (percentila 25; percentila 75) (în cazul distribuției non-normale) sau medie  $\pm$  deviație standard (SD) (pentru variabilele distribuite normal), iar valorile calitative nominale ca număr (n) și procent (%). Testul chi-pătrat ( $\chi^2$ ) a fost utilizat pentru a compara valorile categorice. Analiza varianței (testul t pentru eșantioane independente/ANOVA) a fost utilizată pentru a compara mediile și testul U Mann-Whitney pentru a compara medianele, după caz. O valoare  $P < 0,05$  a fost considerată semnificativă statistic. Corelația variabilelor cantitative continue a fost evaluată prin testul Pearson, iar testul Spearman a fost utilizat pentru a studia corelațiile variabilelor calitative. Variabilele independente asociate cu tromboza recurentă, cum ar fi aCL, P-selectina serică, sCD40L și hs-CRP au fost luate în considerare pentru analiza de regresie multivariată. Analiza de regresie logistică a fost utilizată pentru a investiga dacă titrul ridicat de aCL, hs-CRP, P-selectină, sCD40L ar putea prezice independent un eveniment trombotic.

### **Rezultate și discuții**

Grupul de studiu a inclus 14 pacienți cu PAPS (7 femei) cu o vârstă medie de  $45,5 \pm 27$  ani și o vârstă medie a bolii de 3,5 ani, 20 de pacienți cu APS secundar LES (16 femei), cu o vârstă medie de  $47 \pm 27$  ani și o vârstă medie a bolii de 5,6 ani, și 7 pacienți cu APS secundar non-LES (4 femei) cu o vârstă medie de  $46 \pm 21$  ani și o vârstă medie a bolii de 4,6 ani.

În grupul de 41 de pacienți cu APS, 28 au avut antecedente de tromboză recurentă (cel puțin două evenimente trombotice): 12 pacienți cu PAPS (4 pacienți cu recurențe arteriale, 6 pacienți cu recurențe venoase, 1 pacient cu recurență arterială și venoasă și 1 pacient cu avort recurent), 13 pacienți cu APS secundar LES (9 pacienți cu recurențe arteriale, 2 pacienți cu recurențe venoase și 2 cu avorturi recurente) și 3 pacienți cu APS secundar non-LES (2 pacienți cu recurențe arteriale, 1 cu recurențe venoase).

Nivelurile V1 de hs-CRP au fost semnificativ mai mari la pacienții cu APS comparativ cu controalele (tabelul 1). A existat, de asemenea, o diferență semnificativă între valorile V2 hs-CRP în grupul de studiu față de grupul de control (tabelul 2). Persistența nivelurilor serice crescute de hs-CRP în grupul APS (atât la V1, cât și la V2) relevă prezența unei inflamații de grad scăzut și confirmă ipoteza unui status pro-inflamator la pacienții cu APS. În APS, inflamația este considerată ca un posibil al doilea factor declanșator în scenariul patogen în doi pași al activării plachetare.

De asemenea, a existat o diferență semnificativă în ceea ce privește nivelurile serice de P-selectină între pacienții cu SAF și grupul de control, atât la V1, cât și la V2 (tabelul 1, 2). sCD40L a fost semnificativ mai mare la pacienții cu SAF comparativ cu grupul de control, atât la V1, cât și la V2 (tabelul 1, 2). Nivelurile serice ridicate și persistente de P-selectină și sCD40L în timpul urmăririi demonstrează activarea plachetară la pacienții cu SAF.

Mai mult, la pacienții cu SAF, hs-CRP seric a fost semnificativ corelat cu titrurile de aCL ( $R = 0,38$ ;  $p = 0,014$ ) și cu nivelurile de P-selectină ( $R = 0,296$ ;  $p = 0,05$ ).

În grupul de studiu APS, valorile V1 ale hs-CRP au fost mai mari la pacienții cu antecedente de tromboză recurentă comparativ cu pacienții fără antecedente de tromboză recurentă, dar nu semnificativ statistic (tabelul 3). La V2 (după 12 luni de urmărire), valorile serice ale hs-CRP au fost mai mari în grupul de pacienți cu APS și evenimente trombotice recurente față de grupul de pacienți cu APS fără evenimente trombotice recurente, fără semnificație statistică (tabelul 4).

În schimb, la momentul inițial (V1), P-selectina a fost semnificativ mai mare în grupul APS cu tromboză recurentă în istoric, comparativ cu pacienții APS fără antecedente de tromboză recurentă (tabelul 3). P-selectina serică a fost, de asemenea, semnificativ crescută la pacienții cu APS și tromboză

recurentă, comparativ cu cei fără niciun eveniment trombotic recurent în timpul urmăririi (V2) (tabelul 4). Nu s-au observat diferențe semnificative în nivelurile serice de sCD40L între grupul de pacienți cu APS cu tromboză recurentă comparativ cu cei fără evenimente trombotice recurente, nici la includere (V1), nici după perioada de urmărire de 12 luni (V2) (tabelul 3, 4).

Aceste rezultate susțin concluzia altor rapoarte publicate care au demonstrat deja o activare plachetară în APS (Giannakopoulos et al., 2006; de Groot et al., 2007).

La includere (V1), hs-CRP seric a fost mai mare la pacienții cu APS cu un eveniment trombotic acut decât la pacienții cu antecedente de evenimente trombotice recurente [66,09 (24,07; 71,34) mg/L versus 27,11 (12,76; 38,26) mg/L, valori exprimate ca mediane (percentila 25; percentila 75)], dar fără semnificație statistică ( $p = 0,24$ ). Nici titrurile de sCD40L nu au fost semnificativ diferite între cele două subgrupuri de pacienți APS la V1 [17976,54 (6117,78; 29274,38) versus 14856,76 (4227,34; 25267,07) pg/mL,  $p = 0,18$ , valori exprimate ca mediane (percentila 25; percentila 75)]. În schimb, s-a observat o diferență semnificativă statistic în nivelurile serice de P-selectină între cele două subgrupuri [281,76 (152,72; 379,23) comparativ cu 91,54 (61,45; 264,89) ng/mL,  $p = 0,21$ , valori exprimate ca mediane (percentila 25; percentila 75)].

Regresia logistică multiplă a variabilelor independente corelate cu probabilitatea de a dezvolta un eveniment trombotic recurent la pacienții cu APS a relevat că aCL seric și hs-CRP au fost predictorii independenți ai trombozei la pacienții cu APS din grupul studiat: Odds Ratio 1.0902, Interval de încredere 95% (C.I.): 0.9893-1.2014,  $p = 0.0006$ , respectiv 1.1215, 95% C.I.: 0.9844-1.2778,  $p = 0.0006$ . Hs-CRP seric a fost cel mai bun predictor al riscului de tromboză la pacienții cu APS înscriși în grupul nostru de studiu. Mai mult, cu cât valorile serice ale aCL sau hs-CRP sunt mai mari, cu atât este mai mare riscul de tromboză la pacienții cu APS din grupul nostru de studiu. O combinație a unui titru crescut de aCL cu creșterea nivelurilor de hs-CRP a exprimat o predicție cumulativă risc de a dezvolta un eveniment trombotic la pacienții cu APS (fig. 1).

## Concluzii

Nivelurile crescute și persistente ale markerilor biochimici serici hs-CRP, Pselectină și sCD40L observate în grupul de pacienți cu APS înrolați au relevat o inflamație de grad scăzut și o activare

plachetară în APS. Biomarkerii serici aCL și hs-CRP au fost asociați independent cu un risc crescut de tromboză la pacienții cu APS. hs-CRP s-a dovedit a fi cel mai bun predictor independent pentru evoluția cu un eveniment trombotic în grupul nostru de studiu APS. Nivelurile serice ridicate de aCL au prezis un risc trombotic cumulativ odată cu creșterea nivelurilor serice de hs-CRP la pacienții cu APS.

#### 1.4. Răspunsul inflamator în domeniul medicinei integrative

---

Moga S, Teodorescu A, Ifteni P, Gavris C, Petric PS. Inflammatory Response in SARS-CoV-2 Infection of Patients with Schizophrenia and Long-Term Antipsychotic Treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2021;17:3053-3060

---

Pacienții cu schizofrenie (SCZ) reprezintă o populație cu risc deosebit de a avea prognostic nefavorabil în cazul infecției cu COVID-19, din cauza afectării cognitive, lipsei de conștientizare a bolii dar și a statutului socio-economic precar. Aceștia prezintă multiple comorbidități care au fost identificate ca factori de risc pentru infecție severă COVID-19 : diabet, hipertensiune arterială, boală pulmonară obstructivă cronică și boală renală în stadiu terminal (Kozloff et al., 2020). Studiile anterioare au arătat, de asemenea, un acces redus la îngrijire critică pentru pacienții cu SCZ (Fond et al., 2019; Melamed et al., 2020). Pacienții cu schizofrenie care sunt spitalizați pe termen lung pot prezenta un risc crescut de complicații în cazul infecției cu SARS-CoV-2.

Încă de la începutul pandemiei, au fost făcute referiri la potențialul de morbiditate și mortalitate indus de SARS-CoV-2 în schizofrenie (Nemani et al., 2021), precum și la riscurile legate de distanțarea socială și alte restricții impuse asupra tratamentului (Ifteni et al., 2020) . De asemenea, au fost menționate posibile interacțiuni între antipsihotice și tratamentul împotriva SARS-CoV-2 (Plasencia et al., 2021). Unii autori au pus chiar sub semnul întrebării potențialul antiviral al clorpromazinei.

## Obiective

Ne-am propus să stabilim dacă rezultatele în materie de sănătate și îngrijire diferă între pacienții cu SCZ și pacienții fără diagnostic de boală mintală severă. Obiectivul principal a fost compararea răspunsului inflamator și a mortalității în spital între pacienții cu SCZ și pacienții fără diagnostic de boală mintală severă.

## Metode

Acesta este un studiu prospectiv, transversal, realizat într-un singur centru, care include 101 pacienți consecutivi cu schizofrenie tratați cu antipsihotice orale într-o unitate de îngrijire pe termen lung a Spitalului Clinic de Psihiatrie și Neurologie din Brașov, România. Acesta este un cadru academic cu 150 de paturi pentru pacienți acuti și 300 de paturi pentru pacienți cronici. Grupul de studiu reprezentat de 101 pacienți cu schizofrenie a fost comparat cu un grup de control de 101 pacienți consecutivi fără tulburări psihiatrice precum: tulburare schizoafectivă, tulburare delirantă, tulburare bipolară, demență, dizabilitate intelectuală. Pacienții cu alte tulburări psihiatrice (de exemplu, tulburare de anxietate, tulburare de personalitate) care au fost tratați off-label cu antipsihotice au fost, de asemenea, excluși. Toți pacienții din studiu au fost testați pozitiv pentru COVID-19. Toate cazurile au fost internate într-o unitate special desemnată a aceluiași spital, ca urmare a politicii Guvernului României de la începutul pandemiei de Covid-19 în martie 2020. Unitatea medicală a fost declarată "Spital pentru pacienți infectați cu SARS-CoV-2" la 7 aprilie 2020. Toate procedurile au fost în conformitate cu Declarația de la Helsinki. Aprobarea etică a fost obținută de la Comitetul local pentru Cercetare Etică (protocol nr. 23/06/2021). Toți subiecții incluși în studiu (atât cei cu schizofrenie, cât și cei din grupul de control) au furnizat consimțământ informat în scris.

Toate datele au fost colectate din dosarele fizice și electronice de către psihiatri instruiți, cu experiență anterioară în acest tip de cercetare. Au fost colectate date demografice, analize de laborator, inclusiv markeri inflamatori, durata spitalizării, severitatea formelor pulmonare de COVID-19 bazată pe simptome și imagistică (radiografie sau CT pentru toate cazurile), tipul de tratament administrat, numărul de decese. Tratamentul antipsihotic (tip, doză și durata administrării) a fost înregistrat.



Conform protocoalelor spitalului, toate probele de sânge pentru analizele de laborator au fost recoltate dimineața, pe stomacul gol. Toate probele au fost sânge venos colectat în kituri standardizate.

Infecția cu SARS-CoV-2 a fost confirmată folosind 2 teste consecutive de Reacție în Lanț a Polimerazei (PCR) (ziua 1 și ziua 5) efectuate de un specialist în medicină de laborator. Tratamentul a fost asigurat de un medic specialist în boli infecțioase, un cardiolog și un medic specialist în medicină internă.

### Statistici

Am comparat mai întâi caracteristicile de bază ale ambelor grupuri. Analiza varianței (ANOVA) și testele t-pereche au fost utilizate pentru a compara mediile. Intervalele de încredere ale proporțiilor au fost calculate folosind metoda Wilson. Datele au fost analizate folosind SPSS versiunea 26 pentru Windows. Toate valorile P au fost bilaterale, cu o valoare  $P < 0,05$  indicând semnificație statistică.

### Rezultate

O sută unu de pacienți cu schizofrenie au fost internați într-o unitate de spitalizare pe termen lung aparținând aceluiași spital între 15 aprilie 2020 și 15 aprilie 2021. Caracteristicile pacienților și ale

**Table 1** Patient's Characteristics

Characteristics		SCZ	Control	p value
		N=101	N=101	
Age	Mean (SD)	54.30 (10.83)	54.31 (10.13)	0.17
Male		51 (50.49%)	53 (52.47%)	0.67
Length of stay	Mean (SD)	15.11 (7.47)	15.50 (7.96)	0.71
Severity of Covid-19 infection	Mild	86; 85.14%	73; 72.27%	0.02
	Moderate	12; 11.87%	22; 21.78%	0.05
	Severe	2; 1.98%	6; 5.94%	0.15
Comorbidities	Respiratory	12; 11.88%	4; 3.96%	0.03
	Cardiovascular	30; 29.70%	42; 41.58%	0.07
	Metabolic	38; 37.62%	25; 24.75%	0.04
	Neurological	3; 2.97%	4; 3.96%	0.70
	Others	11; 10.89%	13; 12.87%	0.66
	Without	30; 29.70%	38; 37.62%	0.23
Deaths		0 (0%)	4 (3.96%)	0.04

controalelor sunt prezentate în **Tabelul 1**.

Toți pacienții au fost supuși unor teste complete în timpul spitalizării. Valorile obținute la internare (ziua 1) au fost considerate referință. Am observat valori mai mari ale unor markeri ai inflamației în grupul de control comparativ cu SCZ (CRP  $39,11 \pm 73,04$  vs  $21,27 \pm 51,28$ ,  $p=0,04$ ; fibrinogen  $485,06 \pm 176,45$  vs  $372,71 \pm 121,46$ ,  $p=0,0001$ ). Nivelurile D-dimer nu au fost semnificativ diferite din punct de vedere statistic. Comorbiditățile fizice au fost mai frecvente în grupul SCZ. Din

Table 2 Laboratory Results

Parameters			SCZ	Control	p value
Laboratory Analysis		Normal Values	N=101	N=101	
CRP	Mean (SD)	0–5 MG/L	21.27 (51.28)	39.11 (73.04)	0.04
D-DIMER	Mean (SD)	0–500 MG/ML	858.14 (1253.35)	658.38 (717.27)	0.16
ESR	Mean (SD)	2–20 MM/H	25.39 (20.80)	31.27 (24.66)	0.06
WBC	Mean (SD)	$4-10 \times 10^9/L$	6.58 (2.62)	7.42 (3.11)	0.03
FIBRINOGEN	Mean (SD)	200–400 MG/DL	372.71 (121.46)	485.06 (176.45)	0.0001
BAS	Mean (SD)	$0.0-0.10 \times 10^9/L$	0.02 (0.01)	0.04 (0.19)	0.29
NEU	Mean (SD)	$2.0-7.0 \times 10^9/L$	4.38 (3.85)	4.89 (2.94)	0.29
EOS	Mean (SD)	$0.02-0.5 \times 10^9/L$	0.09 (0.11)	0.05 (0.06)	0.001
LYM	Mean (SD)	$0.8-4.0 \times 10^9/L$	1.95 (0.07)	1.88 (0.74)	0.34
MON	Mean (SD)	$0.12-1.2 \times 10^9/L$	0.51 (0.25)	0.54 (0.21)	0.33
RBC	Mean (SD)	$4.39-5.5 \times 10^{12}/L$	4.33 (0.51)	4.53 (0.61)	0.01
HGB	Mean (SD)	12–16 G/DL	13.45 (1.47)	13.99 (1.36)	0.007
MCV	Mean (SD)	80–100 FL	90.38 (5.37)	89.49 (6.19)	0.27
MCH	Mean (SD)	27–34 PG	31.25 (2.17)	30.70 (2.36)	0.08
MCHC	Mean (SD)	32–36 G/DL	34.52 (0.73)	34.29 (0.89)	0.04
RDW-CV	Mean (SD)	11–16%	13.97 (1.59)	13.55 (0.94)	0.02
RDW-SD	Mean (SD)	35–56 FL	44.97 (4.65)	43.10 (3.36)	0.001
HCT	Mean (SD)	36–48%	38.93 (4.2)	40.72 (3.96)	0.002
PLT	Mean (SD)	$150-400 \times 10^9/L$	220.13 (69.87)	247.44 (99.57)	0.02
MPV	Mean (SD)	6.5–12 FL	9.99 (1.21)	9.98 (0.98)	0.94
PCT	Mean (SD)	0.108–0.282%	0.21 (0.06)	0.24 (0.08)	0.002
TGP	Mean (SD)	0–31 U/L	23.43 (22.13)	34.11 (25.10)	0.001
TGO	Mean (SD)	0–38 U/L	26.98 (24.18)	29.70 (18.93)	0.37
GLU	Mean (SD)	74–106 MG/DL	120.83 (39.4)	126.98 (43.47)	0.29
CREA	Mean (SD)	0.5–0.9 MG/DL	0.89 (0.43)	0.98 (0.87)	0.35
UREA	Mean (SD)	16.6–48.5 MG/DL	31.42 (18.24)	32.86 (18.03)	0.57
GGT	Mean (SD)	0–40 U/L	45.81 (51.48)	73.60 (110.50)	0.02
PHOSPHATASE	Mean (SD)	35–104 U/L	71.68 (18.58)	83.26 (18.19)	0.0001
HDLC	Mean (SD)	45–65 MG/DL	41.27 (9.26)	42.33 (15.87)	0.56
LDL	Mean (SD)	0–100 MG/DL	116.39 (47.55)	120.68 (54.69)	0.5526
TRIG	Mean (SD)	0–150 MG/DL	160.84 (82.06)	175.5 (89.73)	0.22
AMYL	Mean (SD)	28–100 U/L	93.09 (83.10)	64.47 (20.29)	0.0009
K+	Mean (SD)	3.5–5.1 MMOL/L	4 (0.5)	4.05 (0.47)	0.46
NA+	Mean (SD)	136–145 MMOL/L	134.74 (4.12)	136.61 (2.99)	0.0003

**Abbreviations:** CRP, C-reactive protein; ESR, Erythrocyte sedimentation rate; WBC, White blood cell; BAS, Basophils; NEU, Neutrophils; EOS, Eosinophils; LYM, Lymphocytes; MON, Monocytes; RBC, Red blood cell; HGB, Hemoglobin; MCV, Mean corpuscular volume; MCH, Mean corpuscular hemoglobin; MCHC, Mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW-CV, Red cell distribution width; RDW-SD, Red cell distribution width (standard deviation); HCT, Hematocrit; PLT, Thrombocytes; MPV, Mean platelet volume; PCT, Procalcitonin; TGP, Alanine aminotransferase; TGO, Aspartate aminotransferase; GLU, Glucose; CREA, Creatinine; GGT, Gamma-glutamyl transferase; HDLC, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein; TRIG, Triglycerides; AMYL, Amylase; K+, Potassium; NA+, Sodium.

eșantionul total, 5,94% (n = 6) au fost obezi, definiți ca un IMC (indice de masă corporală)  $\geq 30$ , 27,72% (n = 28) au fost supraponderali (IMC = 25–29) și 66,34% (n = 67) au avut un IMC normal. Au fost 55 (54,45%) cazuri cu IMC  $\geq 25$  în grupul de control. Toate rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 2**.

Cele 2 grupuri analizate (SCZ vs Control) nu au diferit în ceea ce privește vârsta medie sau grupele de vârstă (Figura 1).

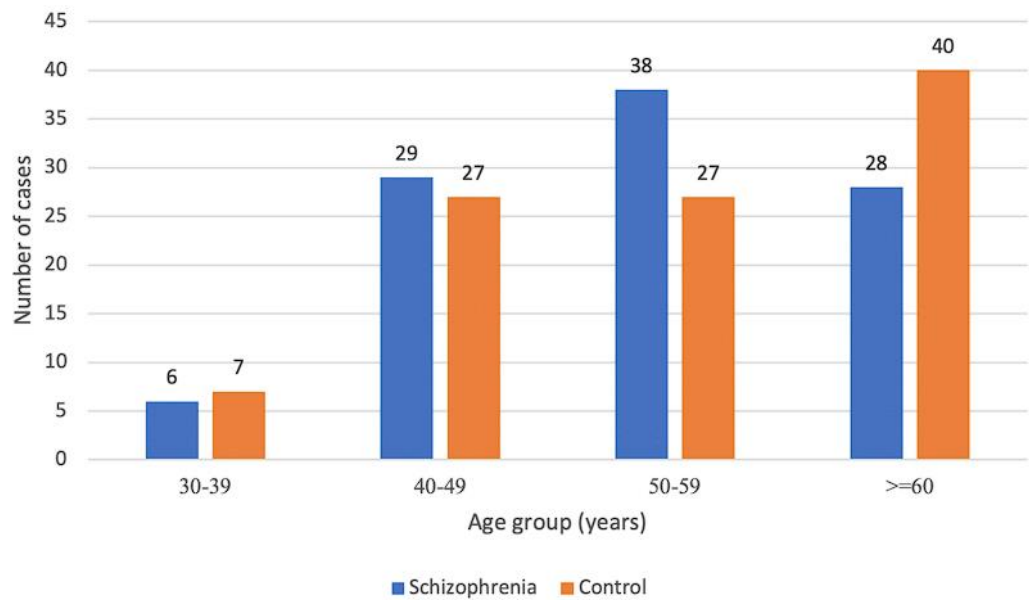


Figure 1 Age group.

În grupul SCZ există unele valori modificate (de exemplu, anemie, hiponatremie), dar aceste elemente sunt frecvent întâlnite la pacienții instituționalizați. Nu au existat diferențe semnificative statistice pentru IMC.

Toți pacienții cu SCZ au primit tratament antipsihotic. În ciuda informațiilor contradictorii de la începutul și din timpul pandemiei COVID-19, un număr semnificativ de pacienți (n=21; 21,21%) au continuat tratamentul cu clozapină în timpul spitalizării. Motivul a fost istoricul de agresivitate, violență sau TRS (schizofrenie rezistentă la tratament). Fiind pacienți sub supraveghere, stabilizați pe tratament, era normal ca aceștia să nu aibă doze mari sau maxime de antipsihotice. Un număr mare de pacienți sunt încă tratați cu haloperidol în unitatea noastră de îngrijire pe termen lung (n=24, 23,76%). Distribuția și tipurile de antipsihotice și echivalentul dozei de clorpromazină sunt prezentate în **Tabelul 3**.

**Table 3** Antipsychotics Used in Schizophrenia Patients with COVID

Antipsihotic Type	N, %	CPZ Equivalent [mg]
<b>SGA</b>		
Olanzapine	25 (25.25%)	244 (100.33)
Clozapine	21 (21.21%)	245.65 (102.43)
Risperidone	12 (12.12%)	279.17 (149.93)
Quetiapine	5 (5.05%)	746.67 (292.12)
Amisulprid	4 (4.04%)	200 (80)
Aripiprazole	1 (1.01%)	199.99
<b>FGA</b>		
Haloperidol	24 (23.76%)	259.26 (119.32)
Zuclopixol	3 (3.03%)	266.67 (115.47)
Flupenthixol	4 (4.04%)	244.56 (104.22)

Conform protocoalelor, pacienții cu SARS-CoV-2 au fost tratați cu hidroxiclorochină, lopinavir/ritonavir, azitromicină, enoxaparină, etc. Tratamentul anti SARS-CoV-2 a fost prescris și monitorizat de medicul specialist în boli infecțioase. Tratamentul a inclus, de asemenea, dexametazonă, mucolitice, antitusive, așa cum se arată în Tabelul 4.

**Table 4** Symptomatic Treatment

Type of Treatment	SCZ n=101	Control n=101	p value
Oxygen support	1 (0.99%)	7 (6.93%)	0.0308
Hydroxychloroquine	0 (0%)	4 (3.96%)	0.0439
Lopinavir/ritonavir	2 (1.98%)	14 (13.86%)	0.0018
Azithromycin	29 (28.71%)	19 (18.81%)	0.0992
Paracetamol	79 (78.21%)	77 (76.23%)	0.7379
Dexamethasone	24 (23.76%)	17 (16.83%)	0.2219
Anticoagulant	39 (38.61%)	46 (45.54%)	0.3197
Antibiotics	26 (25.74%)	31 (30.69%)	0.4356
Mucolytics	15 (14.85%)	1 (0.99%)	0.0003
Antitussive	15 (14.85%)	2 (1.98%)	0.0010
Analgesics	4 (3.96%)	8 (7.92%)	0.2350

## Discuție

Din câte știm, acesta este primul studiu care arată o evoluție favorabilă a pacienților cu schizofrenie infectați cu virusul SARS-CoV-2, tratați neîntrerupt cu antipsihotice. Rezultatele ar putea fi considerate surprinzătoare, având în vedere riscul prezis de complicații severe pentru această categorie la începutul pandemiei COVID-19, în primăvara anului 2020 (Maripuu et al., 2021). Unul dintre motivele posibile pentru evoluția favorabilă ar putea fi faptul că pacienții cu schizofrenie din grupul de studiu au fost testați în mod repetat și prin urmare, diagnosticați prompt și tratați rapid (după ce au

fost testați pozitiv pentru SARS-CoV-2) în propriul lor spital de către o echipă multidisciplinară care include un specialist în boli infecțioase, un specialist în medicină internă, neurologi și psihiatri. Acest lucru este în contrast cu ratele mai mari de spitalizare și mortalitate la pacienții cu schizofrenie și infecție cu SARS-CoV-2 care au fost raportate într-un alt studiu (Fond et al., 2021). Rezultatele unui studiu efectuat în Coreea de Sud au constatat că testarea pozitivă pentru COVID-19 a crescut riscul de severitate și mortalitate în rândul persoanelor cu tulburări mintale (Lee et al., 2020). Din cauza izolării sociale, acești indivizi se pot prezenta pentru îngrijire medicală doar atunci când starea lor s-a agravat deja (Wang et al., 2020; Fond et al., 2021).

Markeri inflamatori precum CRP, fibrinogen și D-dimeri au fost colectați de la toți pacienții. CRP și fibrinogenul în grupul de control au fost mai mari comparativ cu grupul SCZ; nivelurile D-dimer nu au fost semnificativ diferite din punct de vedere statistic.

Dovezile sugerează că unii indivizi răspund la infecția cu SARS-CoV-2 printr-o reacție de tip "furtună de citokine", cu caracteristici similare celor întâlnite în șocul septic de etiologie bacteriană. Markerii biologici asociați pot include creșteri ale proteinei C reactive și feritină, care par să se coreleze cu severitatea bolii și mortalitatea (Fu et al., 2020). La pacienții cu infecție COVID-19, valorile CRP la internare se corelează cu severitatea bolii și tind să fie un bun predictor al complicațiilor (Luo et al., 2019; Wang et al., 2020). În studiul nostru, valorile CRP au fost mai mici în grupul SCZ comparativ cu grupurile de control.

Ruan și colaboratorii au descoperit că nivelurile CRP se corelează cu riscul de mortalitate (pacienții supraviețuitori au avut un CRP mediu de 40,4 mg/L, cu un interval cuprins între 10,1-60 mg/L, în timp ce non-supraviețuitorii au avut o medie de 125 mg/L cu un interval cuprins între ~60-160 mg/L) (Ruan et al., 2020). Young și colaboratorii au descoperit niveluri mai scăzute de CRP la pacienții care nu au necesitat oxigen suplimentar (Young et al., 2020). Constatările noastre au confirmat aceste rezultate, deoarece doar un pacient cu schizofrenie a necesitat oxigenoterapie. Mulți pacienți cu forme severe de infecție COVID-19 au anomalii de coagulare care imită alte coagulopatii sistemice asociate cu infecții severe, cum ar fi coagularea intravasculară diseminată. Coagulopatia COVID-19 are caracteristici distincte și este asociată cu un risc crescut de deces, cauzând complicații tromboembolice venoase și arteriale (Levi et al., 2020). Cea mai tipică constatare la pacienții cu COVID-19 și coagulopatie este o

concentrație crescută de D-dimeri, o scădere relativ modestă a numărului de trombocite și o prelungire a timpului de protrombină. Studiile au raportat o creștere a nivelurilor de D-dimer și fibrinogen în stadiile incipiente ale COVID-19, o creștere de 3 până la 4 ori a nivelurilor de D-dimer fiind legată de un prognostic slab. În plus, bolile subiacente, cum ar fi diabetul, cancerul, accidentul vascular cerebral și sarcina, pot declanșa o creștere a nivelurilor de D-dimer la pacienții cu COVID-19 (Rostami et al., 2020).

Numeroase studii au descoperit că pacienții cu schizofrenie au niveluri sanguine crescute de citokine inflamatorii și concentrații mai mari ale acestor citokine decât grupurile de control în timpul exacerbării simptomelor, dar nu a fost găsită nicio diferență în perioadele de stabilitate clinică (Miller et al., 2019). Rezultatele noastre au confirmat această ipoteză.

Comorbiditățile fizice au fost mai frecvente în grupul SCZ. Comorbiditățile pulmonare și metabolice au fost semnificativ crescute în grupul de pacienți cu schizofrenie, aceștia fiind mai predispuși să asocieze comorbidități pulmonare, metabolice, cardiovasculare (Jaen-Moreno et al., 2021; Mitchell et al., 2013). Aceștia fumează excesiv (Krieger et al., 2019), au un stil de viață sedentar (Vancampfort et al., 2017), cu o dietă dezechilibrată (Dipasquale et al., 2013), ceea ce îi predispune la evenimente cardiace severe și moarte subită (Ifteni et al., 2014). Faptul că pacienții erau deja spitalizați și comorbiditățile lor erau monitorizate, tratate și stabile, faptul că trăiesc într-un mediu controlat cu o dietă calorică și, de asemenea, cu restricții privind fumatul, pot fi considerate factori care au contribuit la un nivel scăzut de mortalitate și la recuperarea completă după infecția cu SARS-CoV-2.

Nu au existat diferențe semnificative statistice în ceea ce privește IMC în cele două grupuri, iar procentul de pacienți obezi în grupul SCZ a fost relativ mic (5,94%); prin urmare, acest factor agravant nu a fost remarcabil. Obezitatea este cunoscută ca fiind un factor de risc important pentru un rezultat nefavorabil la pacienții cu COVID (Kompaniyets et al., 2021; Lighter et al., 2020), în special pentru cei care asociază o boală mintală severă (Hert et al., 2011).

Nu în ultimul rând, pacienții din grupul cu schizofrenie au primit tratament antipsihotic regulat în ultimele 3 luni înainte de infecție. În ciuda lipsei de date cu privire la acest subiect, putem presupune că antipsihoticele ar putea avea un efect protector împotriva formelor severe de SARS-CoV-2. Studiile viitoare vor putea aduce date noi în acest domeniu.

Studiul are câteva limitări care ar trebui menționate. Una ar putea fi numărul relativ mic de pacienți și durata scurtă de monitorizare. O altă limitare este că nu a fost un studiu randomizat. Datele privind mortalitatea absolută la nivel mondial sugerează că infecția cu COVID-19 poate avea impacturi diferite în diferite țări, din cauza mai multor factori (clima, organizarea unităților medicale, strategiile publice de gestionare a COVID-19, vaccinarea și varianta virusului SARS-CoV-2). Deoarece nu toți factorii și mecanismele leziunilor, interacțiunile medicamentoase, comorbiditățile și tratamentul implicate în rețeaua complexă a infecției cu COVID-19 au fost luate în considerare, rezultatele noastre pot fi extrapolate parțial în alte țări (Mishra et al., 2020).

### Concluzie

Principalele constatări ale studiului au fost că indivizii vulnerabili cu schizofrenie, aflați în tratament cu antipsihotice, au prezentat un risc mai scăzut de infecție severă cu SARS-CoV-2 și un prognostic probabil mai bun într-un mediu protector. S-ar putea specula că antipsihoticele ar putea juca un rol important în prevenirea manifestării severe a SARS-CoV-2 și ar putea exercita efecte protectoare împotriva evoluțiilor negative ale COVID-19. Rezultatele prezentului studiu trebuie interpretate cu precauție, deoarece nu toți factorii implicați în rețeaua complexă a infecției cu COVID-19 au fost luați în considerare.

---

Ifteni P, Barabas B, Gavris C, Moga M, Burtea V, Dracea L. Sudden Cardiac Death: Autopsy Findings in 7200 Cases Between 2001 and 2015. *Am J Forensic Med Pathol.* 2017 Mar;38(1):49-53. doi: 10.1097/PAF.0000000000000274. PMID: 27973393.

---

Moartea subită cardiacă (SCD) este un eveniment neașteptat, cauzat de o cauză cardiacă (Albert et al., 2001), care afectează milioane de cazuri în fiecare an, având un impact devastator asupra familiilor și comunităților. Aceasta reprezintă o problemă majoră de sănătate publică la nivel mondial, cu un mare impact socioeconomic (Straus et al., 2004).

Cea mai utilizată definiție afirmă că SCD este un eveniment natural care are loc în mai puțin de o oră de la debutul simptomelor la persoane fără nicio condiție preexistentă potențial fatală (Sudden Cardiac Death. Report of a WHO Scientific Group et al., 1985) . Rata medie de supraviețuire este de 10,6%, iar supraviețuirea cu o funcție neurologică bună este de 8,3%. Aproape una din trei victime supraviețuiește atunci când stopul cardiac este observat de un martor (Myerburg et al., 2007). În grupul de vârstă 1-40 de ani, proporția de SCD, moarte subită non-cardiacă (SD) și moarte subită neexplicată probabil diferă în funcție de vârstă. Deoarece incidența bolii coronariene premature (CAD) crește treptat odată cu vârsta, proporția altor cauze cardiace de SD este probabil mai mare în grupele de vârstă mai mici. Sindroamele primare de aritmie probabil domină la victimele pediatrice ale SD, în timp ce cardiomiopatiile se manifestă de obicei în timpul tinereții.

Incidența SCD a fost estimată între 180,00 și 400,00 de cazuri pe an în Statele Unite (Chugh et al., 2008), dar în România este încă necunoscută.

În toate articolele publicate anterior, rezultatele au arătat că bărbații cu vârste cuprinse între 50 și 69 de ani sunt cei mai afectați (McNally et al., 2009). Epidemiologia SCD este strâns corelată cu CAD, iar până la 80% dintre victime au (Iribarren et al., 1998). Cei mai răspândiți factori de risc care cresc foarte mult riscul de SCD sunt hipertensiunea arterială sistemică, diabetul și fumatul (Wannamethee et al, 1995). La persoanele tinere, cele mai frecvente diagnostice găsite la autopsii sunt cardiomiopatia hipertrofică, anomaliile arterelor coronare și displazia aritmogenă a ventriculului drept (Burke et al., 1991). Am efectuat anterior studii care descriu ratele de incidență ale SCD și cauzele decesului la persoanele cu schizofrenie (Ifteni et al., 2015). Constatările noastre la autopsie indică faptul că SD în schizofrenie este cauzată de anomalii structurale cardiovasculare, respiratorii și neurologice, majoritatea cazurilor fiind datorate infarctului miocardic acut. În demență, am concluzionat că principala cauză de deces a fost infarctul miocardic (25,5%) în cazurile cu moarte subită neașteptată (Ifteni et al., 2015), pe baza constatărilor la autopsie. Efectuarea unei autopsii este esențială atunci când se încearcă identificarea cauzelor la victimele SCD. Recunoașterea cauzelor SCD este imperativă, deoarece studiile anterioare au găsit un sindrom aritmogen ereditar la aproape jumătate dintre rudele de sânge, oferind astfel o posibilă cauză a decesului și identificând rudele supraviețuitoare care sunt expuse aceluiași risc (Tan et al., 2005; Behr et al., 2008; Marcus et al., 2011).



Sunt necesare mai multe informații pentru a îmbunătăți în continuare instrumentele de stratificare a riscului și strategiile preventive în viitor.

Obiectivul nostru a fost de a descrie caracteristicile SCD în județul Brașov, România, pe o perioadă de 15 ani, în conformitate cu constatările la autopsie în 6924 de cazuri.

## **METODE**

Brașov este unul dintre cele mai importante orașe din România, cu o populație heterogenă care include etnici români, germani și maghiari. Populația totală a zonei este de aproximativ 400.000 de locuitori, cu un nivel de urbanizare peste media restului țării.

Departamentul medico-legal local este responsabil pentru autopsiile victimelor deceselor violente și non-violente, trimise de către serviciul de sănătate al orașului sau de către autorități atunci când autopsia a fost solicitată pentru clarificarea cauzei decesului.

În studiul nostru, am evaluat rapoartele autopsiilor efectuate de departamentul medico-legal local între 1 ianuarie 2001 și 31 decembrie 2015. Pentru criteriile de includere, am definit moartea subită neașteptată ca fiind decesul neașteptat în termen de 1 oră de la debutul simptomelor sau, în situații de cazuri fără martori, ca decesul unei persoane văzută ultima dată în viață și funcționând bine cu 24 de ore înainte de eveniment.

Datele au fost colectate de la Serviciul de Medicină Legală al Județului Brașov, pe baza registrului și a certificatelor de deces, și au inclus cauza decesului, date demografice, comorbidități (afecțiuni medicale și boli psihiatrice, dacă sunt cunoscute), ora și locul evenimentului, manevre de resuscitare și concentrația de alcool în sânge. Cazurile au fost excluse în cazul în care cauza decesului a fost de altă etiologie (accidente vasculare cerebrale, embolie pulmonară sau astm), omucidere sau sinucidere sau dacă datele erau incomplete. Studiul a fost aprobat de comitetul de etică al instituției noastre.

### **Efectuarea autopsiilor**

În județul Brașov, România, toate autopsiile au fost efectuate la Serviciul de Medicină Legală al Județului Brașov atunci când examinarea cadavrelor nu a evidențiat o cauză concludentă sau modul de

deces. În timpul autopsiilor medico-legale, toate organele sunt examinate amănunțit, iar screening-urile toxicologice sunt efectuate în cazurile neexplicate de deces subit și neașteptat la adolescenți și adulți.

Datele au fost înregistrate în registre special desemnate și apoi arhivate în locuri speciale.

### **Analiza statistică**

Analizele statistice au fost efectuate utilizând SPSS 20.0. Datele continue sunt prezentate ca medie  $\pm$  deviație standard, în timp ce variabilele categorice au fost exprimate ca număr și/sau procent. Testul t pentru eșantioane independente a fost efectuat pentru datele continue.

Testul  $\chi^2$  pentru un tabel 2 x 2 a fost utilizat pentru a compara semnificația datelor categorice. O valoare P bilaterală mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă statistic.

## **REZULTATE**

### **Cazuri autopsiate**

Între 2001 și 2015, au fost efectuate 7200 de autopsii la Serviciul de Medicină Legală al Județului Brașov. Pentru scopul studiului, am exclus 276 de cazuri cu date incomplete. Din 6924 de autopsii, am găsit 3000 de cazuri cu deces violent (68% accidente, 23% sinucideri și 9% omucidere), 2340 bărbați (78%) cu o vârstă medie de  $44,1 \pm 13,4$  ani. Restul de 3924 de cazuri au fost decese non-violente, 2708 bărbați (69%) cu o vârstă medie de  $58,7 \pm 16,4$  ani.

Am observat că numărul de autopsii efectuate pentru cazuri violente a fost de aproximativ 200 pe an și există o tendință de scădere începând din 2011 până în prezent (Fig. 1).

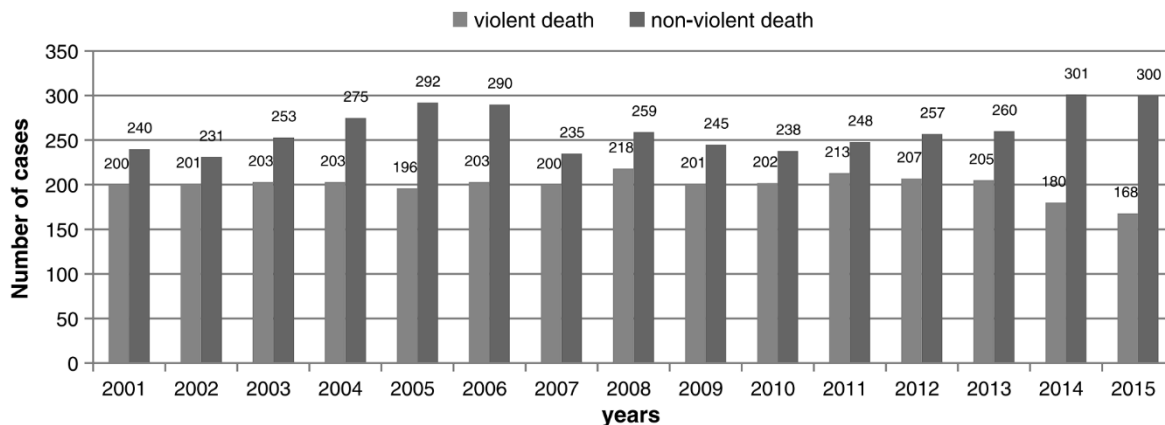


FIGURE 1. The number of autopsy for violent and nonviolent cases between 2001 and 2015.

### Cazuri de Moarte Subită Cardiacă

Concentrându-ne cercetarea asupra autopsiilor non-violente, am găsit 1085 de cazuri cu SCD, 749 bărbați (69%) cu o vârstă medie de  $56 \pm 17,4$  ani și 336 femei cu o vârstă medie de  $62 \pm 13,4$  ( $P < 0,01$ ). Numărul mediu de SCD a fost de 72,33 cazuri pe an, cu 66 de cazuri în 2001 (cel mai mic număr) și 80 în 2008 (cel mai mare număr).

Au existat 2 perioade cu un număr crescut de autopsii pentru cazuri non-violente: 2002 până în 2005 și 2010 până în 2015 (Fig. 2). Incidența SCD a fost de 16 la 100.000 de locuitori.

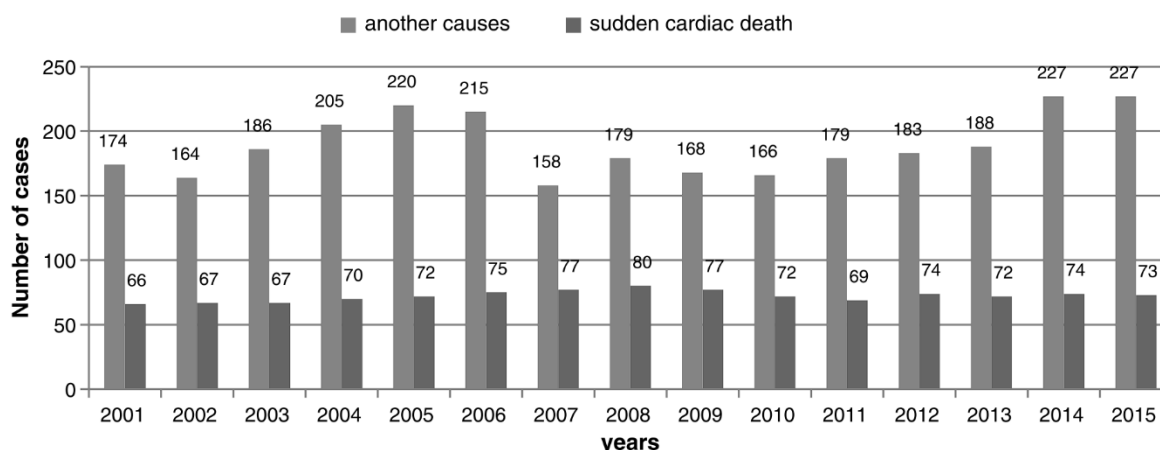


FIGURE 2. The number of nonviolent autopsy between 2001 and 2015.

Împărțind cazurile în grupe de vârstă, am constatat că 634 de autopsii (58,5%) au fost efectuate pentru persoane cu un interval de vârstă între 50 și 69 de ani. Marea majoritate a bărbaților cu SCD (536 de cazuri) se afla în intervalul de vârstă 40-69 de ani (71,5%), iar 219 femei se aflau în intervalul de vârstă 60-89 de ani (65,1%). Distribuția SCD în funcție de vârstă este prezentată în Figura 3.

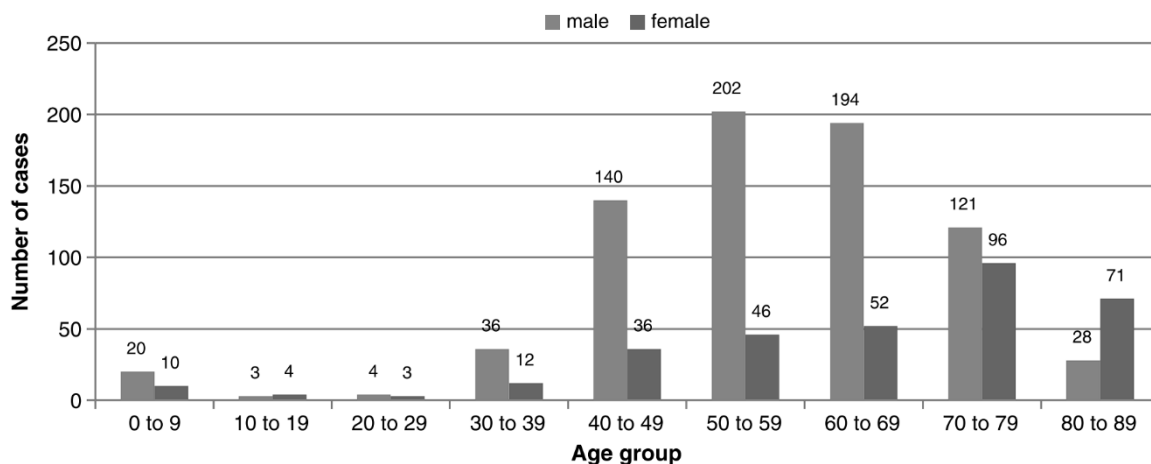


FIGURE 3. Age-related distribution of SCD.

### Cauza Decesului

Cauza decesului a fost boala coronariană (CAD) în 635 (58,5%) din 1085 de cazuri de SCD autopsiate, urmată de cardiomiopatia hipertrofică (7%, 77/1085), cardiomiopatia aritmogenă a ventriculului drept (ARVC) (6%, 65/1085) și miocardita (3%, 37/1085). Alte cazuri au inclus disecția aortică, boli valvulare, defecte congenitale și tumori. În 229 (13,5%) din 1085 de cazuri, decesul a rămas neexplicat sau neconcludent după autopsie (Fig. 4).

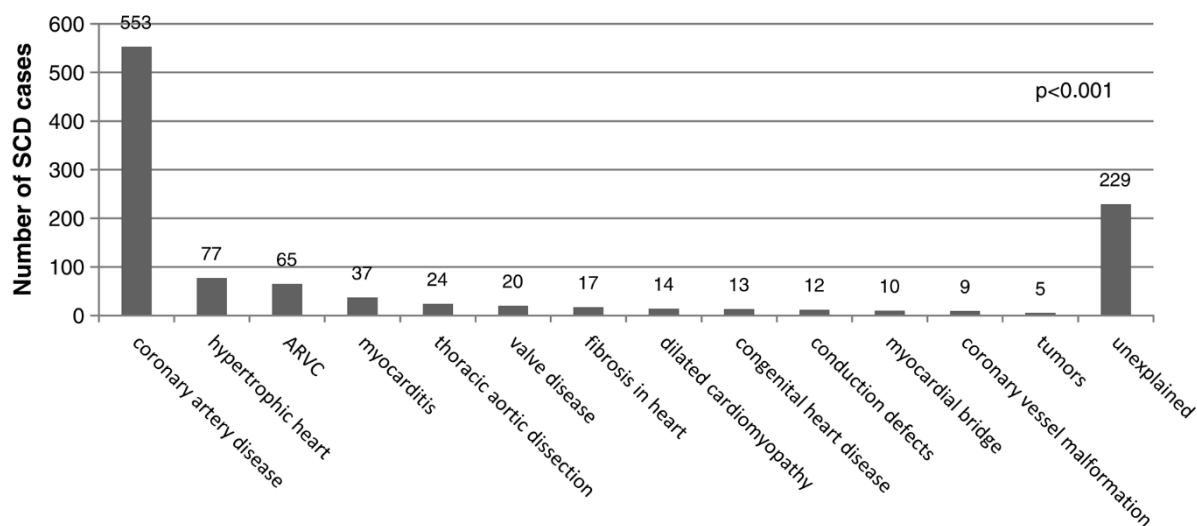


FIGURE 4. Causes of death in 1085 cases of SCD.

În grupul de copii (vârsta 1-18 ani), am avut 37 de cazuri cu SCD autopsiate între 2001 și 2015, 23 de băieți (62,1%), 30 în primul deceniu de viață și restul de 7 cazuri în al doilea deceniu de viață. Din 37 de cazuri, am identificat cauza decesului în 30 de cazuri (81%), iar în 7 cazuri concluzia a fost deces neexplicat (9%). Cauzele decesului în grupul de copii sunt prezentate în Tabelul 1.

**TABLE 1.** Cause of Death in 37 Autopsied Cases of Children With SCD

Cause of Death	N	%
Myocarditis	8	21.7
ARVC	5	13.5
Cardiac malformation	5	13.5
Valvular disease	5	13.5
Endocarditis	2	5.4
Coarctation	2	5.4
Dilated cardiomyopathy	2	5.4
Acute myocardial infarction	1	2.7
Unexplained death	7	18.9

Mai mult de 20% dintre persoanele cu SCD aveau factori de risc cardiovascular: antecedente de hipertensiune arterială (56,1%), diabet (28%), fumat (22%), obezitate (13%) și abuz de alcool (11%) (Tabelul 2).

**TABLE 2.** Risk Factors for SCD

SCD Risk factors	N	%
Systemic arterial hypertension	609	56
Diabetes	304	28
Smoking	239	22
Obesity	141	13
Alcohol abuse	119	11

### Locul Decesului

În 2200 de cazuri de SCD (56,1%), evenimentul a avut loc acasă; în 1339 de cazuri (34,1%), decesul a avut loc în camerele de urgență (numită deces la sosirea în camera de urgență). În 237 de cazuri (6,0%), persoanele au fost găsite decedate. În restul cazurilor (3,8%), decesul a avut loc în timpul activităților fizice intense (ridicare sau transport de greutate) sau sport (fotbal, alpinism, schi și ciclism).

### Resuscitarea cardio-pulmonară

În total, 2145 (54,6%) din 3924 de pacienți au primit manevre de resuscitare cardio-pulmonară (CPR). În mai puțin de 1% din cazuri, a fost disponibilă o notificare specifică de "a nu resuscita".

În județul Brașov, este obligatoriu ca serviciile publice de ambulanță să trimită o echipă dotată și personal instruit la fiecare solicitare făcută prin serviciul de apel 112. Îmbunătățirea sistemului de sănătate, cu un număr mai mare de ambulanțe în serviciul public, precum și companii private de

ambulanță și noi camere de urgență în spitalele publice și private, se poate reflecta în numărul crescut de RCP din 2009, atingând cel mai mare procent (59,6%) în 2015. Numărul pacienților care au supraviețuit după un stop cardiac în afara spitalului rămâne extrem de scăzut (mai puțin de 2%).

## DISCUȚIE

Din câte știm, acesta este primul studiu care caracterizează diferite aspecte legate de SCD în România. Principala constatare a fost rata ridicată de SCD în grupul de autopsii pentru deces non-violent. În ceea ce privește distribuția SCD în funcție de sex, raportul bărbați/femei a fost de 69:31. Nu au existat modificări majore ale acestui model de-a lungul anilor. Rapoartele anterioare au arătat un raport bărbați/femei de 75:25 (Zipes et al., 1998), cu o tendință de echilibrare a balanței în studiile recente, unde raportul de sex raportat a fost de 60:40 (McNally et al., 2011). Incidența a fost de 16 la 100.000 de locuitori, iar studiile anterioare au raportat incidența SCD între 2 la 100.000 și 40 la 100.000, în funcție de vârstă, sex și statutul economic al țării (Gerber et al., 2006; Byrne et al., 2008). În Statele Unite, incidența anuală a SCD în timpul exercițiilor fizice este de 1 la 200.000 până la 1 la 250.000 la tinerii sănătoși (Engelstein et al., 1998).

În studiul nostru, CAD a fost responsabilă pentru majoritatea cazurilor de SCD (58,5%), urmată de cardiomiopatia hipertrofică (7%), ARVC (6%) și miocardita (3%). Studiile anterioare au arătat că peste 75% din cazurile de SCD au fost corelate cu CAD preexistentă. Dintre cazuri, 10% până la 15% au fost identificate leziuni concludente pentru boli miocardice, cum ar fi cardiomiopatia hipertrofică, cardiomiopatia dilatativă idiopatică, displazia aritmogenă a ventriculului drept sau bolile miocardice infiltrative (Fishman et al., 2010; Nanavati et al., 2014).

Deși rezultatele noastre au fost obținute în urma unui studiu retrospectiv, am găsit factori de risc importanți, cum ar fi diabetul, fumatul, obezitatea și dislipidemia. Unul dintre cele mai importante studii a arătat că vârsta, hipertensiunea arterială, hipertrofia ventriculară stângă, blocul de conducere intraventricular, colesterolul seric crescut, intoleranța la glucoză, capacitatea vitală scăzută, fumatul, indexul de masă corporală și ritmul cardiac identifică persoanele cu risc de SCD (Zipes et al., 1998). Conform studiului Framingham, incidența anuală a SCD a crescut de la 13 la 1000 la nefumători la

aproape 2,5 ori mai mult pentru persoanele care fumau mai mult de 20 de țigări pe zi (Mahmood et al., 2014).

Am constatat un număr crescut de CPR, an de an, în timpul perioadei de studiu în județul Brașov. În marea majoritate a cazurilor, pacienții cu SCD erau acasă când a avut loc evenimentul, astfel încât timpul critic pentru intervenție a fost depășit în multe cazuri. În ciuda îmbunătățirii practicilor de resuscitare, în articolele publicate recent pe acest subiect, am găsit că rata de supraviețuire pentru cei care experimentează un stop cardiac în afara spitalului este între 5% și 10% (Berdowski et al., 2010; Sasson et al., 2010). În multe cazuri, după resuscitarea cu succes, supraviețuitorii au păstrat deficiențe neurologice severe (Nolan et al., 2007).

În studiul Maastricht, 80% din stopurile cardiace au avut loc acasă și 40% au fost fără martori (de Vreede et al., 1997), cu șanse scăzute de CPR de succes.

Studiul nostru a avut unele limitări. În primul rând, a fost un studiu retrospectiv, iar unele date specifice lipsesc în ceea ce privește evenimente precum un profil complet al factorilor de risc pentru victimele SCD, o descriere mai bună a manifestărilor clinice prezentate de victime înainte de deces în cazurile cu martori și procedurile CPR efectuate sau protocoalele de autopsie, declarația rudelor și statutul socioeconomic.

A doua limitare este posibilitatea absenței unui număr întreg de cazuri reale de SD din autopsie (limitări religioase și culturale, vârstă extremă, interpretarea greșită a decesului în spitale, pacienți din zone rurale etc.).

Puterea studiului nostru, în ciuda limitărilor, este evaluarea unui număr mare de cazuri pe o perioadă semnificativă (15 ani) într-o zonă cu o populație eterogenă, ceea ce a făcut ca rezultatele să fie generalizabile pentru o parte importantă a Europei de Est.

Moartea subită cardiacă a reprezentat mai mult de 25% din totalul deceselor non-violente în această importantă comunitate urbană românească. Pe baza rapoartelor de autopsie, am constatat că bolile coronariene sunt cea mai frecventă cauză de deces; bărbații sunt mai vulnerabili în a șasea decadă de viață. Evenimentele apar frecvent acasă, iar manevrele de CPR au fost efectuate în mai mult de

jumătate din cazuri. Sunt necesare strategii preventive pentru reducerea acestei probleme majore de sănătate cu un impact emoțional, social și economic imens

---

Wahid M, Saqib F, Chicea L, Ahmedah HT, Sajer BH, Marc Vlaic RA, Pop OL, Moga M, [Gavris C](#). Metabolomics analysis delineates the therapeutic effects of hydroethanolic extract of *Cucumis sativus* L. seeds on hypertension and isoproterenol-induced myocardial infarction. *Biomed Pharmacother.* 2022 Apr;148:112704.

---

Bolile cardiovasculare (BCV) reprezintă o povară semnificativă pentru sănătatea publică, iar prevalența lor crește într-un ritm alarmant atât în țările emergente, cât și în cele dezvoltate. BCV-urile sunt o problemă gravă de sănătate care afectează societatea din punct de vedere economic și social, prin reducerea capacității productive, creșterea nevoilor de asistență medicală și, cel mai important, prin decesul prematur. Infarctul miocardic acut (IMA) este o boală cardiovasculară severă care cauzează morbiditate și mortalitate semnificativă la nivel global (Nakamura et al., 2018).

Infarctul miocardic (IM) duce la hipertrofie cardiacă anormală prin mărirea cardiomiocitelor individuale și creșterea grosimii peretelui ventricular stâng, cauzând o scădere a capacității ventriculului stâng (Li F et al., 2014). În timpul hipertrofiei cardiace, apar o serie de modificări patologice, cum ar fi mortalitatea cardiomiocitelor, contracția mușchiului cardiac, dilatarea cardiomiocitelor și alte afecțiuni cardiace, ducând la disfuncții cardiace din cauza afectării aportului de sânge oxigenat către cardiomiocite.

Ischemia prelungită cauzată de un dezechilibru între aportul și necesarul de sânge oxigenat a dus la necroză acută în miocard și IM (Nakamura et al., 2018; Abdelmomem et al., 2021; Shaito et al., 2020). IM generează, de asemenea, radicali liberi, peroxidare lipidică, inflamație și apoptoză. Producerea de specii reactive de oxigen (ROS), cum ar fi radicalii hidroxil și anionul superoxid, perturbă sistemul antioxidant, provocând leziuni celulare și leziuni ischemice (Shaito et al., 2020). Inima suferă o remodelare printr-o serie de modificări structurale pentru a compensa pierderea cardiomiocitelor funcționale. Remodelarea cardiacă post-IM, în special hipertrofia asociată cu fibroza, este determinată de stresul oxidativ la nivel molecular și celular (Minaiyan et al., 2011). La pacienții cu IM, gradul de



remodelare cardiacă este un predictor substanțial al decesului și morbidității (Minaiyan et al., 2011; Hossain et al., 2010). Într-adevăr, hipertrofia cardiacă și fibroza sunt semne timpurii ale progresiei bolilor de inimă, crescând riscul de insuficiență cardiacă, IM recurent, aritmie și moarte subită (Hossain et al., 2010). Hipertrofia prelungită duce la pierderea cardiomiocitelor și la dezvoltarea insuficienței cardiace, anginei pectorale și aterosclerozei arteriale (Tuama 2019).

Hipertensiunea arterială este un "ucigaș tăcut", crescând semnificativ riscul de accident vascular cerebral, boală coronariană și insuficiență cardiacă. Rezistența vasculară periferică este determinată de starea contractilă a mușchiului neted vascular, în special în arteriole (Touyz et al., 2018). Creșterea rezistenței vasculare periferice și creșterea tensiunii arteriale rezultă din disfuncția endotelială și vasoconstricția hiperactivă mediată adrenergic. Disfuncția endotelială apare atunci când există un dezechilibru în sinteza factorilor de relaxare derivați din endoteliu (EDRF) și a factorilor de contracție derivați din endoteliu (EDCF). Acest dezechilibru, împreună cu o creștere a biodisponibilității speciilor reactive de oxigen (ROS) și o reducere a capacității antioxidante, este denumit stres oxidativ (Silva et al., 2012). Reducerea vasorelaxării dependente de endoteliu și creșterea vasoconstricției induse de agonist au fost asociate cu hipertensiunea legată de stresul oxidativ (Sorriento et al., 2018).

Așa cum s-a stabilit la oameni și modele animale, supraîncărcarea cardiacă și pierderea de miocite induse de creșterea reglării  $\beta$ -adrenergice pot duce la remodelarea camerei ventriculare și insuficiență cardiacă, cauzând în cele din urmă CH și HF (Nichtova et al., 2012). IM indus de ISO este unul dintre modelele experimentale de IM care imită îndeaproape fiziopatologia și morfologia IM uman (Abdelmomem et al., 2021). ISO este o catecolamină sintetică care se leagă de  $\beta$ -adrenoceptori și crește influxul de calciu în cardiomiocite. Injectarea subcutanată repetată de ISO a cauzat necroză cardiacă și mărire la animalele de experiment. Aceasta crește cererea de oxigen miocardic, ducând la ischemie, leziuni cardiace asemănătoare infarctului și IM prin vasospasticitate (Shen et al., 2012). Efectele patogene ale ISO includ degradarea miofibrelor, edem interstițial și congestie subcutanată cu neutrofile și limfocite. IM indus de ISO generează, de asemenea, radicali liberi și perturbă sistemul de apărare antioxidant (Steven et al., 2019). Astfel, acest model a fost utilizat pentru a explora rețelele de semnalizare adaptate ROS care determină etiologia IM.

Comparativ cu alte modele de IM, cum ar fi ligatura arterei coronare, modelul IM indus de ISO are o rată de mortalitate mai mică și nu necesită intervenții chirurgicale invazive (Filfo et al., 2011). Astfel, IM indus de ISO este utilizat pe scară largă ca model non-chirurgical pentru a evalua posibila protecție medicamentoasă (Nichtova et al., 2012). Prin monitorizarea metaboliților endogeni cu greutate moleculară mică cu NMR, LC-MS sau GC-MS, profilarea metabolică facilitează identificarea diferiților metaboliți și a căilor metabolice asociate în sistemele de reglare complexe.

În ultimele decenii, cercetările în cardiologie s-au concentrat pe descoperirea unor intervenții care ar putea proteja țesuturile miocardice de infarcturile miocardice. Aceste terapii aveau efecte secundare severe și o dependență prelungită (Pasupathy et al., 2012). Remediile pe bază de plante conțin compuși bioactivi puternici care au câștigat interesul cercetătorilor, deoarece sunt considerați mai siguri, eficienți și economici (Shaito et al., 2020). *Cucumis sativus* L., castravetele, aparține familiei Cucurbitaceae și este cultivat pe scară largă ca legumă comestibilă, în special în zonele tropicale din Africa, Asia și America de Sud și este frecvent utilizat ca aperitiv verde și consumat împreună cu masa principală datorită prezenței vitaminelor, proteinelor, carbohidraților și acizilor grași (Mariod et al., 2017). Practicanții de medicină pe bază de plante din Pakistan și India folosesc semințele sale pentru a trata problemele gastrointestinale și urinare și pentru a întări inima. Fructul este, de asemenea, utilizat pentru a trata senzațiile de arsură, arsurile și rănilor deschise. Are proprietăți antioxidante, antiulceroase (Rajasree et al., 2016), citotoxice (Tuama et al., 2019), inflamatorii, antihipertensive (Pertami et al., 2017) și analgezice (Agatemor et al., 2015). Semințele de *C. sativus* sunt folosite împotriva hiperlipidemie (Soltani et al., 2017), ca diuretice (Vincenza et al., 2021), în diabetul zaharat (Mlnaiyan et al., 2011), în febre intermitente, ca analgezice, pentru senzații de arsură și inflamații (Vetriselvan et al., 2013; Wahid et al., 2021). Gill și colab., (Gill et al., 2009; Wahid, Saqib et al., 2021) au raportat că semințele de *C. sativus* au proprietăți anti-ulcer și anti-depresie. Semințele și fructele de *C. sativus* conțin ulei volatil, ulei fix, flavone, steroizi, flavonoide, taninuri, fitosteroli.

Acest studiu a avut ca scop investigarea capacităților cardioprotectoare și a perspectivelor metabolice ale semințelor de *C. sativus* în modele *in vitro*, *in vivo* și de andocare moleculară. Modelul de infarct miocardic indus de isoproterenol a fost utilizat pentru a clarifica mecanismele potențiale ale *C. sativus* pe baza metabolomicii inimii și serului și a expresiilor genelor (Wahid, Saqib et al., 2021).

## 2. Materiale și metode

### 2.1. Prepararea extractului

Semințele de *C. sativus* au fost colectate din pulpa fructelor proaspete cultivate în câmpurile locale din Multan, Punjab, Pakistan, în mai 2018, fiind astfel eliberate de pulpa fructului. Semințele și fructele de *C. sativus* au fost identificate de către specialistul Dr. Zafarullah Zafar (număr de voucher în herbar: Sp. Pl. 1012/1753, Taxon Id: 200022616) Institutul de Biologie Pură și Aplicată, Universitatea Bahauddin Zakariya Multan, Pakistan. Un specimen de plantă a fost depus la Herbarul aceluiași institut sub numărul de înregistrare Sp. Pl. 1012/1753, Taxon Id: 200022616).

După îndepărtarea cojii semințelor, partea interioară a fost măcinată cu o râșniță de plante pentru a obține o pulbere grosieră de semințe. Materialul măcinat a fost procesat în aparatul Soxhlet pentru macerare la cald pentru extracție succesivă, urmând polaritatea solvenților. Materialul măcinat a fost procesat în aparatul Soxhlet pentru macerare la cald cu solvenți hidroetanolici (70% etanol și 30% apă, Cu.EtOH) și vaporizat sub presiune redusă la  $30 \pm 5$  °C într-un evaporator rotativ (Buchi R-200) pentru a obține un extract gros de culoare maronie-gălbuie cu profil uleios. Randamentul total al tuturor extractelor brute de semințe de *C. sativus* (Cu.EtOH) a fost de 45%. Extractele EtOH au fost plasate într-un recipient de chihlimbar și depozitate la -20 °C. Extractul a fost dizolvat în apă distilată sau soluție salină normală în ziua experimentului și diluat la concentrația necesară ulterioară.

### 2.2. Substanțe chimice și solvenți

Solvenții etanol, metanol, acetonitril, acid trifluoroacetic și acid formic au fost achiziționați de la Sigma Chemical, SUA. Merck și Sigma au furnizat, de asemenea, toate substanțele chimice pentru soluțiile tampon, standardele de grad analitic pentru HPLC și experimente.

### 2.3. Prepararea probelor pentru HPLC și LC-ESI-MS/MS

Cu.EtOH a fost dizolvat în 1 ml metanol și centrifugat timp de 10 minute la 14000 rpm. Înainte de injectarea în LC-MS/MS, supernatantul a fost transferat în flacoane LC-MS/MS curate și uscate și filtrat folosind un filtru de seringă (0,22 μm).

### 2.4. Analiza LC ESI-MS/MS

Cu.EtOH a fost supus analizei LC ESI-MS/MS (spectrometru de masă LTQ XL, Thermo Electron Corporation, SUA) [31,32] pentru a avea o screening preliminar al compușilor potențial bioactivi. Proba a fost analizată prin injecție directă în sonda de ionizare prin electrospray setată în modul de ionizare pozitivă și negativă. Faza mobilă compusă din acid formic (0,1%) cu metanol (solvent A) și acid formic (0,1%) cu apă și acetonitril (80:20) (solvent B) la 0,4 ml/min, coloană C18 (C18, 2,1 × 100 mm, 3,0 μm) la 25 °C cu un volum de injecție a probei de 8 μL cu un interval de spectru de masă 50-1000 m/z au fost găsite optime pentru separarea compușilor. Gradientul fazei mobile a fost setat după cum urmează: 98% A (v/v), 98-80% A (v/v), 80-10% A (v/v), 10% A (v/v) și 10-98% A (v/v) de la 0 la 4,0 min, 4,0-7,0 min, 7,0-14,0 min, 14,0-15,0 min, 10- și 15,0-17,0 min, respectiv. Parametrii optimi ai sursei de ioni pentru analiza spectrometriei de masă în modul de ionizare pozitivă și negativă au fost setați după cum urmează: tensiune de pulverizare ionică, 5500 V; gaz de perdea, 25 psi; gaz nebulizator (GS1) și gaz auxiliar (GS2), 55 psi; temperatura sursei de ioni, 400 °C. Azotul a fost utilizat ca gaz de perdea și de coliziune. X-Calibur 3.0 (Thermo Scientific, SUA) a fost utilizat pentru achiziția și procesarea datelor ESI-MS/MS.

#### 2.4.1. Identificarea compușilor

Constituenții majori au fost identificați provizoriu prin spectre de masă din date publicate anterior și biblioteci de referință, cum ar fi Mass Bank of North America (MoNA; <http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu>) și Mass Bank of Europe. Spectrele compușilor au fost comparate cu mase de înaltă rezoluție și fragmentarea MS/MS a bibliotecilor și bazelor de date [33]. Elucidarea structurală a fost realizată folosind ChemDraw 18.0.

### 2.5. Cuantificarea compușilor bioactivi folosind HPLC-DAD UV/Vis analitic

#### 2.5.1. Optimizarea metodei HPLC

Cu.EtOH a fost supus HPLC-DAD UV/Vis în fază inversă (Agilent LC) pentru reconfirmarea și cuantificarea compușilor bioactivi identificați provizoriu folosind LC ESI-MS/MS (epigallocatechină, acid clorogenic, acid protocatehuic, hesperidină, acid galic, rutină și vitexină) [34]. Faza mobilă compusă din solvent A (0,1% acid trifluoroacetic cu metanol) și solvent B (0,1% 0,1% acid trifluoroacetic cu apă și acetonitril (80:20)) la 0,8 ml/min la diferite lungimi de undă de detecție, adică 250, 280 și 320 nm la 25

°C și volumul de injecție a probei de 8 μL au fost găsite optime pentru separarea compușilor și dimensiunea coloanei C18 (SB-C18, 4,6 × 150 mm, 5,0 μm). Gradientul de eluție liniară a fost setat după cum urmează: 95% A (v/v), 95-90% A (v/v), 90-70% A (v/v), 70-10% A (v/v), 10% A (v/v) și 10-95% A (v/v) de la 0 la 2,0 min, 2,0-7,0 min, 7,0-12,0 min, 12,0-20,0 min, 20-25 și 25,0-35,0 min, respectiv. Datele au fost procesate prin compararea standardelor externe pe baza timpului de retenție și a spectrelor UV.

## 2.5.2. Validarea metodei analitice

Metoda de validare a fost determinată în conformitate cu liniile directoare prescrise de Conferința Internațională privind Armonizarea (ICH) și descrisă în raportul nostru anterior [31,34].

**2.5.2.1. Liniaritate, limite de detecție și cuantificare.** Diluțiile standardelor externe (epigallocatechină, acid clorogenic, acid protocatechuic, hesperidină, acid galic, rutină și vitexină) au fost preparate pentru validarea liniarității pentru a construi curba standard corespunzătoare concentrației fiecărui standard și a ariei de vârf pe cromatogramă pentru a evalua liniaritatea răspunsului detectorului. Următoarele ecuații au determinat limitele de detecție și cuantificare;

### Ecuții:

- $LOD = 3 \cdot 3\sigma \div S$
- $LOQ = 10\sigma \div S$

unde  $\sigma$  este abaterea standard a interceptului, iar  $S$  este panta ecuației de regresie liniară.

**2.5.2.2. Specificitate.** O soluție standard cuprinzând standarde externe (epigallocatechină, acid clorogenic, acid protocatechuic, hesperidină, acid galic, rutină și vitexină) a fost preparată în metanol (100%) la o concentrație de 100 μg/ml, iar soluția de probă a fost preparată așa cum este menționat în Secțiunea 2.3. Soluțiile standard și de probă (20 μL) au fost injectate în sistemul HPLC cu gradient binar în condițiile cromatografice menționate în Secțiunea 2.5.1. Vârfurile cromatografice din Cu.EtOH au fost comparate cu timpii de retenție ai standardelor externe pentru puritatea vârfului și cuantificate folosind o curbă de calibrare a standardului extern.

**2.5.2.3. Precizie și repetabilitate.** Precizia metodei a fost determinată prin injectarea soluției standard externe în zile diferite (citire în triplicat) și în aceeași zi (trei zile consecutive și citiri în triplicat) în condițiile cromatografice menționate mai sus, iar abaterea standard relativă (RSD) a fost calculată.

**2.5.2.4. Acuratețe.** Acuratețea metodei a fost evaluată prin recuperarea standardelor externe în proba Cu.EtOH. Apoi, trei concentrații standard externe (50, 100 și 150 g) au fost preparate și amestecate cu proba Cu.EtOH, iar volumul final a fost adus la 1 ml, astfel încât concentrația finală a standardului extern și a probei Cu.EtOH să nu fie perturbată. Un volum de 20 μL din soluția preparată a fost injectat în sistemul HPLC cu gradient binar, așa cum este menționat în Secțiunea 2.5.1. Rata de recuperare a probei de standard extern în proba Cu.EtOH a fost calculată folosind următoarea ecuație:

$$\% \text{ Recovery} = (\text{observed concentration} \div \text{actual concentration}) \times 100$$

## 2.6. Animale și condiții de adăpostire

Comitetul de etică al Facultății de Farmacie a aprobat procedurile (vide nr. EC /04PhDL/S2018), iar experimentele au fost efectuate în conformitate cu liniile directoare ale Comisiei pentru Resurse Animale de Laborator [35]. În scopuri experimentale, iepuri albinoși (♀/♂, greutate: 1,2-1,6 kg), șobolani Sprague-Dawley (♀/♂, greutate: 170-250 g) și șoareci (♀/♂, greutate: 20-30 g) au fost furnizați de Facultatea de Farmacie, Universitatea Bahauddin Zakariya, Multan. Animalele au fost ținute în condiții controlate ( $23 \pm 2$  °C) în adăpostul pentru animale al facultății, urmând un ciclu de lumină și întuneric, cu hrană standard și apă de la robinet ad-libitum. Înainte de experiment, hrana a fost îndepărtată de la animale peste noapte. Pentru experimentele in vitro, șobolanii și șoarecii au fost eutanasiați prin dislocare cervicală.

## 2.7. Declarație de etică

Toate experimentele pe animale au respectat liniile directoare ARRIVE și au fost efectuate în conformitate cu Legea privind animalele (proceduri științifice) din Marea Britanie, 1986 și liniile directoare asociate, Directiva UE 2010/63/UE pentru experimentele pe animale sau ghidul Institutelor Naționale de Sănătate pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator (NIH Publications No. 8023, revizuit 1978). Animalele au fost tratate cu mare grijă, iar experimentele au fost executate în conformitate cu regulile elaborate pentru științele vieții privind resursele animale, comandate de

Laboratorul Universității Bahauddin Zakariya ca și comitet de autorizare pentru instituția etică din Multan (EC/06 PhL-2019-2021). Aprobarea etică a fost obținută de la Comitetul de Etică al Universității Bahauddin Zakariya, Multan (EC /04PhDLS2018) la data de 26 martie 2018.

## 2.8. Experimentare pe țesut izolat

Metodele prescrise anterior de Saqib și Janbaz [36] și Gilani et al., [37] pentru experimente pe țesut izolat în baia de organe tisulare au fost utilizate cu modificări.

### 2.8.1. Prepararea aortei izolate

După dislocarea cervicală a șobolanilor, aorta toracică a fost disecată și imersată în soluție Krebs (pH 7,4), oxigenată cu carbogen. Toate țesuturile adipoase aderente au fost îndepărtate cu grijă, fără a deteriora căptușeala endotelială a aortei. Inelele aortice (2-3 mm) au fost preparate și suspendate în baia de organe tisulare, umplută cu soluție Krebs. Baia de organe tisulare a fost oxigenată cu carbogen la 36,9 °C printr-un termoregulator circulant. A fost ajustată o preîncărcare de 2 g tensiune, iar preparatul de țesut aortic a fost lăsat să se echilibreze timp de  $60 \pm 10$  min. Răspunsul fiziologic al țesutului a fost înregistrat printr-un traductor de forță-deplasare (Model FORT100), iar semnalele au fost amplificate de un dispozitiv de achiziție de date Power Lab® (4/25) și vizualizate în Lab Chart Pro (Versiunea 7). Răspunsul fiziologic a fost calculat ca procent de contracție, măsurat imediat înainte de administrarea dozei de medicament test. După echilibrare, materialele test sau medicamentoase au fost administrate cumulativ.

Mecanismul vasorelaxant dependent de colinergic și oxid nitric (NO) al factorului de relaxare derivat din endoteliu (EDRF) a fost studiat pe preparate aortice cu endoteliu intact și denudat. Pentru preparatul aortic cu endoteliu denudat, intima inelului aortic a fost frecată cu pense curbate. Prezența sau absența funcției endoteliale a fost determinată prin relaxarea contracțiilor induse de fenilefrină (1  $\mu$ M) cu o doză bolus de acetilcolină (1  $\mu$ M); o relaxare de 70-80% a contracției a indicat existența funcției endoteliale (endoteliu intact). Dacă contracțiile ulterioare cresc, aceasta a indicat absența funcției endoteliale (endoteliu denudat) [38]. Posibila activitate vasorelaxantă a Cu.EtOH a fost determinată prin contracții provocate de  $K^+$  (80 mM), fenilefrină (1  $\mu$ M) și  $K^+$  (25 mM) pe ambele preparate aortice într-o baie de organe tisulare.

## 2.8.2. Prepararea atriilor împerecheați izolați

Inima a fost disecată pentru preparate de atriu împerecheați izolați după dislocarea cervicală a șobolanilor și imersată în soluție Krebs (pH 7,4) oxigenată cu carbogen. Ventriculele și toate țesuturile adipoase aderente au fost îndepărtate cu grijă, fără a deteriora stimulatorul cardiac, și suspendate în baia de organe tisulare, care conținea soluție Krebs. Baia de organe tisulare a fost oxigenată cu carbogen la 36,9 °C printr-un termoregulator circulant. A fost ajustată o preîncărcare de 1 g tensiune, iar preparatul de țesut aortic a fost lăsat să se echilibreze timp de 35 ± 10 min. Răspunsul fiziologic al țesutului a fost înregistrat printr-un traductor de forță-deplasare (Model FORT100), iar semnalele au fost amplificate de un dispozitiv de achiziție de date Power Lab® (4/25) și vizualizate în Lab Chart Pro (Versiunea 7). Răspunsul fiziologic a fost calculat ca procent de contracție, măsurat imediat înainte de administrarea dozei de medicament test. După echilibrare, materialele test sau medicamentoase au fost administrate cumulativ.

## 2.9. Experimentare in vivo

### 2.9.1. Prepararea dozelor pentru experimentele in vivo

Cu.EtOH, carvedilol și verapamil au fost dizolvate în soluție salină normală și diluate la concentrația necesară ulterioară.

### 2.9.2. Evaluarea dozei maxime tolerate

Au fost alese șase grupuri de șobolani pentru a stabili doza maximă tolerabilă de Cu.EtOH. Timp de 28 de zile consecutive, au fost administrate oral soluție salină normală și cinci doze (50, 100, 150, 200 și 300 mg/kg pe zi) de Cu.EtOH. Timp de 28 de zile, au fost monitorizate greutatea corporală, modificările comportamentale, simptomele clinice de distres și mortalitatea animalelor [39].

### 2.9.3. Evaluarea tensiunii arteriale și a parametrilor hemodinamici la șobolanii anesteziati

Șobolanii sănătoși (200-250 g) au fost anesteziati separat cu diazepam (i.p. 5 mg/kg) și ketamină (i.p. 85 mg/kg) pentru o anestezie satisfăcătoare, fără a modifica parametrii cardiovasculari în limitele normotensive [36]. Șobolanii au fost fixați pe masa de disecție în poziție supină, iar temperatura a fost menținută cu o lampă deasupra. A fost efectuată traheotomia pentru canularea



traheei cu un tub de polietilenă (18 G) pentru a ușura respirația. Canularea venei jugulare drepte a fost efectuată pentru administrarea intravenoasă a Cu.EtOH și a medicamentelor. Canularea arterei carotide a fost efectuată pentru a înregistra modificările parametrilor hemodinamici cu un traductor de presiune (MLT 0699), umplut cu soluție salină heparinată (50 UI/ml). Semnalele au fost amplificate de un dispozitiv de achiziție de date Power Lab® (4/25) și vizualizate în Lab Chart Pro (Versiunea 7). Zona incizată a fost acoperită cu un tampon de bumbac umezit cu soluție salină normală și lăsată să se echilibreze timp de 10-15 minute înainte de administrarea oricărui medicament. Acetilcolina (Ach; 1 μg/kg) și adrenalina (Adr; 1 μg/kg) au fost administrate pentru răspunsul standard hipotensiv și hipertensiv înainte de materialul de test.

#### **2.9.4. L-NAME induce hipertensiune acută la șobolanii anesteziați**

Canularea traheei, a venei jugulare drepte și a arterei carotide a fost efectuată așa cum este menționat în Secțiunea 2.9.2. pentru hipertensiunea acută indusă de L-NAME. O soluție de N $\omega$ -nitro-L-arginină metil ester (L-NAME), un inhibitor al sintazei oxidului nitric, a fost administrată intravenos (20 mg/kg) șobolanilor Wistar normotensivi. După 20 de minute de la administrarea L-NAME, Cu.EtOH a fost administrat intravenos atunci când s-a observat o creștere maximă a tensiunii arteriale. Modificările parametrilor hemodinamici au fost înregistrate printr-un traductor de presiune (MLT 0699).

#### **2.9.5. Infarctul miocardic cronic indus de isoproterenol**

Conform Eladwy et al., (2018), studiul a fost conceput pentru 21 de zile pentru a induce IM. Isoproterenolul (ISO) și Cu.EtOH au fost dizolvate în soluție salină normală. Patruzeci și doi de șobolani albinoși masculi, cu o greutate de 150-200 g, au fost împărțiți aleatoriu în șapte grupuri și adăpostiți în cuști separate. Fiecare grup conține șase animale.

1. Grupul I: Grupul de control negativ a primit oral soluție salină normală la o doză de 10 ml/kg.
2. Grupul II: Grupul de control intoxicat a primit ISO subcutanat la o doză de 5 mg/kg/zi timp de 14 zile (din ziua a 8-a a experimentului până în ziua a 21-a).
3. Grupul III: Grupul de tratament standard cu medicament a primit carvedilol oral la doza de 10 mg/kg/zi timp de 21 de zile.

4. Grupul IV: Grupul de tratament standard cu medicament a primit verapamil oral la doza de 10 mg/kg/zi timp de 21 de zile.
5. Grupul V: Grupul de tratament cu extract a primit Cu.EtOH oral la doza de 75 mg/kg/zi timp de 21 de zile.
6. Grupul VI: Grupul de tratament cu extract a primit Cu.EtOH oral la doza de 150 mg/kg/zi timp de 21 de zile.
7. Grupul VII: Grupul de control al extractului a primit Cu.EtOH oral la doza de 150 mg/kg/zi timp de 21 de zile. Grupul de control al extractului a fost utilizat pentru a determina efectele Cu.EtOH în absența ISO asupra parametrilor modelului.

După o oră de pretratament cu carvedilol, verapamil și Cl.EtOH, a fost administrată o injecție subcutanată de ISO (5 mg/kg) timp de 14 zile consecutive, începând din ziua a 8-a până în ziua a 21-a, cu excepția Grupului VII, care nu a primit ISO.

#### **2.9.6. Colectarea probelor**

După 24 de ore de la ultima administrare de ISO, animalele au fost anesteziate (ketamină i.p. 40 mg/kg), iar sângele a fost colectat din sinusul retroorbital pentru a determina indicii biochimici în tuburi coagulante și anticoagulante care conțin EDTA. Probele au fost centrifugate la 4500 rpm timp de 15 minute la 4 °C pentru a separa serul și plasma de sânge și depozitate la -20 °C. Dislocarea cervicală a fost utilizată pentru a eutanasia animalele, iar țesuturile cardiace au fost îndepărtate imediat și curățate rapid cu soluție salină rece și congelate pentru RT-PCR sau fixate în formalină 10% pentru examinări histopatologice.

#### **2.9.7. Determinarea indicilor biometrici**

Hipertrofia cardiacă a fost evaluată cu indici biometrici, adică greutatea inimii, diametrul inimii, greutatea ventriculului stâng (LHV), grosimea LHV, indicele greutății inimii (raportul greutate inimă/greutate corporală), indicele LHV (ventriculul stâng/greutate corporală), indicele lungimii cozii (greutate inimă/lungime coadă), indicele lungimii tibiei (greutate inimă/lungime tibie) [39].

#### **2.9.8. Examinări histopatologice**

Pentru autopsia inimii, inimile fixate au fost deshidratate cu diluții seriale de alcool (70-100%), clarificate cu xilen și fixate în parafină la 56 °C. Secțiunile (cu o grosime de 4 μm) ale specimenelor au fost plasate pe lame de microscop, deparafinate pe placa fierbinte și în final colorate cu coloranți hematoxină și eozină (H&E). Lamele patologice preparate au fost examinate la microscopul optic pentru modificări histopatologice, iar foton micrografiile au fost realizate. Numărul total de celule, diametrul și dimensiunea au fost măsurate folosind software-ul ImageJ (ImageJ, Versiunea 1.44p, NIH, SUA).

### 2.9.9. Determinarea markerilor biochimici cardiaci serici

Markerii biochimici serici, cum ar fi profilurile cardiace, de inflamație și lipidice, au fost utilizați pentru a determina infarctul miocardic la animale. Biomarkerii de profil cardiac, cum ar fi alanin transaminaza (ALT), aspartat transaminaza (AST), creatin kinaza (CK), creatin kinaza MB (CK-MB), lactat dehidrogenază (LDH), troponină T (cTnT), troponină I (cTnI), concentrațiile de renină, peptidul natriuretic cerebral (BNP), peptidul natriuretic arterial (ANP), serul, enzima de conversie a angiotensinei (ACE) și interleukina-6 (IL-6); iar biomarkerii de profil lipidic includ HDL, LDL, trigliceride, VLDL și colesterolul total au fost determinați prin kituri enzimatiche disponibile comercial și cuantificați prin spectrofotometrie la 340 nm. Angiotensina II, nivelul de guanozin monofosfat ciclic (cGMP) și nivelurile de nitrat/nitrit (NO) au fost determinate prin teste imunoenzimatiche și kituri de testare colorimetrică conform instrucțiunilor producătorului [41].

### 2.9.10. Reacția cantitativă în lanț a polimerazei în timp real (qRT-PCR)

Țesuturile cardiace congelate au fost omogenizate, iar ARN-ul total a fost extras conform instrucțiunilor producătorului folosind reactivul TRIzol (Invitrogen). RT-PCR (sistemul Bio-Rad CFX96) a fost utilizat pentru a evalua expresia relativă a genei. Primerii utilizați în acest studiu sunt IL-6 (F: AGTTGCCTTCTTGGGACTGA R: ACAGTGCATCATCGCTGTTC), peptidul natriuretic arterial (F: ATACAGTGCGGTGTCCAACA, R: CGAGAGCACCTCCATCTCTC), Troponina T cardiacă (F: CAGAGAGGAGGAAGGTGCTG, R: TTCCCACGAGTTTTGGAGAC), oxid nitric sintază 3 (F: AACTAGACTGGGAGGGAGTCA, R: GGGCAGCAGGATGTCCCTAATA) și MMP-9 (F: CCCCCAACCTTTACCAGCTA, R: GGTCAGAACCGACCCTACAA). Nivelurile de expresie mRNA au fost

normalizate la expresia genei de menaj  $\beta$ -actină (F: AGCCATGTACGTAGCCATCC, R: CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA) într-o probă similară

### 2.9.11. Western blotting

Proteinele au fost extrase din ventriculul stâng al inimii conform metodei descrise anterior [42]. Ventriculul stâng (150 mg) a fost măcinat în 5 ml tampon RIPA conținând 1x inhibitori de protează și fosfatază. Omogenatul a fost centrifugat la 13.500 rpm timp de 20 de minute, iar supernatantul a fost transferat într-un flacon. Concentrația de proteine a fost măsurată cu BSA. Proteinele (40  $\mu$ g per bandă) au fost încărcate pe electroforeză pe gel de poliacrilamidă SDS 10% (DDS-PAGE) și transferate pe membrane de fluorură de poliviniliden (PVDF) cu pori de 0,2  $\mu$ m activate cu metanol (Millipore, SUA) timp de 2 ore la 110 V. Laptele degresat 5% a fost utilizat pentru a bloca membrana la temperatura camerei, iar membranele PVDF au fost incubate cu anticorpi primari peste noapte la 4 °C. Pentru a îndepărta anticorpii primari nelegați, membrana a fost spălată de trei ori cu 1x soluție salină tamponată cu Tris, 0,1% Tween (TBST). Membranele au fost incubate cu anticorp secundar marcat cu peroxidază de hrean (HRP, la diluția 1:3000) la temperatura camerei timp de 60 de minute. În continuare, membrana a fost spălată de trei ori cu 1x TBST, iar benzile au fost detectate în sistemul Gel Doc XR (Bio-Rad). Au fost utilizați pentru studiu anticorpi de șobolan anti ANP (diluție 1:1500), anti-IL-6 (diluție 1:500), anti eNOS3 (diluție 1:1000) și anti  $\beta$ -actină (diluție 1:1500). Image J a fost utilizat pentru a evalua expresia proteinelor specifice, iar expresia măsurată a fost normalizată la  $\beta$ -actină ca proteină de referință.

### 2.9.12. Studiu metabolomic

Analiza metabolomică a fost efectuată urmând metodele descrise anterior de Sun et al., [43] și Wu et al., [44].

**2.9.12.1. Prepararea probelor.** Pentru metabolomică, a fost utilizat LC-ESI MS/MS, iar probele au fost amestecate într-o soluție de acetonitril (ACN) și metanol (MeOH) (1:1 v/v). Probele de ser au fost decongelate la 4 °C pe o baie de gheață, 100  $\mu$ L de ser și 400  $\mu$ L de ACN: MeOH pre-răcit au fost amestecate și vortexate timp de 30-60 s, sonic

**2.9.12.2. Condiții cromatografice.** Soluțiile preparate (8  $\mu$ L) au fost injectate în sistemul LC ESI-MS/MS cu gradient binar în condițiile cromatografice menționate în Secțiunea 2.4, utilizând faza mobilă (A) 0,1% acid formic în apă (B) 0,1% acid formic în acetonitril.

**2.9.12.3. Procesarea datelor și identificarea biomarkerilor.** Achiziția și procesarea datelor ESI-MS/MS au fost realizate cu software-ul X-Calibur 3.0 (Thermo Scientific, SUA). Identitățile metaboliților au fost confirmate prin compararea spectrelor MS/MS cu căutări în bazele de date online HMDB (<http://www.hmdb.ca>) și Mass bank of North America (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>) pe baza măsurării masei exacte (eroare de masă <5 ppm). Matricea de date a fost importată în R studio cu MetaboAnalyst pentru analiza căilor și analiza de îmbogățire.

SIMCA 14.0 a fost utilizat pentru a analiza datele metabolice LC-MS/MS serice și cardiace. Analiza componentelor principale (PCA) nesupravegheată a fost efectuată pentru a detecta modele și tendințe metabolice. Ulterior, au fost efectuate analiza discriminantă a celor mai mici pătrate parțiale (PLS-DA) și analiza discriminantă a proiecțiilor ortogonale pe structuri latente (OPLS-DA) pentru a analiza și discrimina între grupurile experimentale. În plus, au fost efectuate teste riguroase de permutare pentru a valida aceste modele. Importanța variabilei (VIP,  $VIP > 1$ ) și testul t ( $p\text{-value} < 0.05$ ) au fost utilizate pentru a filtra metaboliții esențiali ca potențiali biomarkeri.

## 2.10. Andocare moleculară

Studiile de andocare moleculară au fost efectuate urmând procedura descrisă anterior de Sirous et al., [45].

### 2.10.1. Pregătirea ligandului

Structurile bidimensionale ale compușilor cuantificați prin HPLC au fost obținute de la PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) și supuse modulului ligprep din Maestro (Schrodinger suite 2015) pentru ionizare, minimizare și optimizare a liganzilor. Instrumentul Epik al acestui modul a fost utilizat pentru a produce formele de ionizare ale liganzilor la pH ( $7,4 \pm 0,5$ ) și a aplicat câmpul de forță OPLS3e prin intermediul modulului pentru minimizarea și optimizarea liganzilor, care produce conformerul cu cea mai mică energie a liganzilor.

### 2.10.2. Pregătirea proteinelor

Pentru andocarea moleculară, structurile cu raze X cu cea mai mare rezoluție ale proteinelor au fost descărcate de la banca de date a proteinelor (RCSB PDB) (<https://www.rcsb.org>) și tratate cu asistentul de preparare a proteinelor din Maestro (Schrodinger suite 2018). Acesta a adăugat atomi de hidrogen la structura proteinei, a îndepărtat moleculele de solvent (apă), a atribuit ordine de legătură, a creat legături disulfurice și a completat lanțurile laterale și buclele lipsă și a generat o stare de protonare utilizând instrumentul Epik pentru structurile proteinelor la pH-ul biologic ( $7,40 \pm 0,5$ ) pentru liganzi. După procesarea structurilor proteinelor, aceste structuri au fost optimizate folosind PROPKA la pH 7,0, iar câmpul de forță OPLS3e a fost utilizat pentru a efectua minimizarea restricționată pentru minimizarea energiei și optimizarea geometriei structurii proteinei.

### 2.10.3. Andocare moleculară și generarea grilei receptorului

Locurile active ale structurilor proteice pentru andocarea moleculară au fost definite în modulul de generare a grilei receptorului din Maestro (Schrodinger suite 2018). O cutie de grilă cubică pentru fiecare proteină a fost determinată cu ajutorul unei revizuirii a literaturii sau a unei selecții a liganzilor proteici deja legați. Lungimea cutiei de grilă a fost ajustată la lungimea de 16 Å. Potențialul părților nepolare ale receptorului a fost scăzut la un factor de scalare de 1,0 Å pe raza van der Waals a atomilor nepolari ai proteinei având o tăiere parțială a sarcinii atomice de 0,25 Å.

Pentru andocarea moleculară, liganzii și structurile proteice preparate au fost supuse modulului de precizie extra (XP) al modulului de andocare a ligandului (Glide) din Maestro (Schrodinger suite 2018) folosind fișierul de grilă pre-generat pentru receptor. Factorul de scalare 0,80 Å a fost ajustat pentru razele van der Waals cu o tăiere a sarcinii parțiale de 0,15 Å. Rezultatele andocării au fost supuse modulului Prime MM-GBSA pentru a calcula energiile de legare ale liganzilor cu structura proteinei folosind modelul de solvatare VSGB cu câmpul de forță OPLS3e.

### 2.10.4. Constanta de inhibiție ( $K_i$ )

Constanta de inhibiție a fost determinată din energia liberă de legare a ligandului generată anterior de Prime MM-GBSA, conform următoarei ecuații:

$$\Delta G = -RT(\ln K_i) \text{ sau } K_i = e^{(-\Delta G/RT)}$$

Unde  $\Delta G$  este energia liberă de legare a ligandului,  $R$  este constanta gazelor ( $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ), iar  $T$  este temperatura camerei (298 Kelvin).

### 2.11. Analiza statistică

Valorile experimentelor au fost exprimate ca medie  $\pm$  deviație standard (SD). Concentrația mediană eficientă (EC50) cu un interval de încredere de 95% (CI) a fost determinată folosind un model de ajustare a curbei de regresie neliniară pentru graficele sigmoide doză-răspuns. Graficele sigmoide doză-răspuns logaritmice au fost trasate pentru curbele concentrație-răspuns. Analiza ANOVA unidirecțională a fost aplicată pe studiile in vivo, urmată de testul Dunnett, unde  $p < 0,05$  a fost considerat semnificativ. GraphPad Prism (Versiunea 8.0) și R studio cu pachetul principal "ggplot" au fost utilizate pentru analiza statistică și trasarea tuturor graficelor.

## 3. Rezultate

### 3.1. Identificarea compușilor bioactivi prin analiza LC-ESI-MS/MS

Analiza LC ESI-MS/MS a identificat 13 compuși bioactivi în *C. sativus* EtOH. Principalii compuși bioactivi identificați folosind LC ESI-MS/MS sunt acidul clorogenic, acidul galic, epigallocatechina, galactinolul, catechina, kaempferitrina, naringenin-7-o-glucozid sau pruină, kaempferol-7-o-neohesperidozidă, vitexina, acidul protocatehuic, acidul 3-p-cumaroilchinic, acidul 3-feruloil chinic, hesperidina și rutina (Fig. 1 și Tabelul 1), care pot fi colectiv responsabile pentru această activitate biologică.

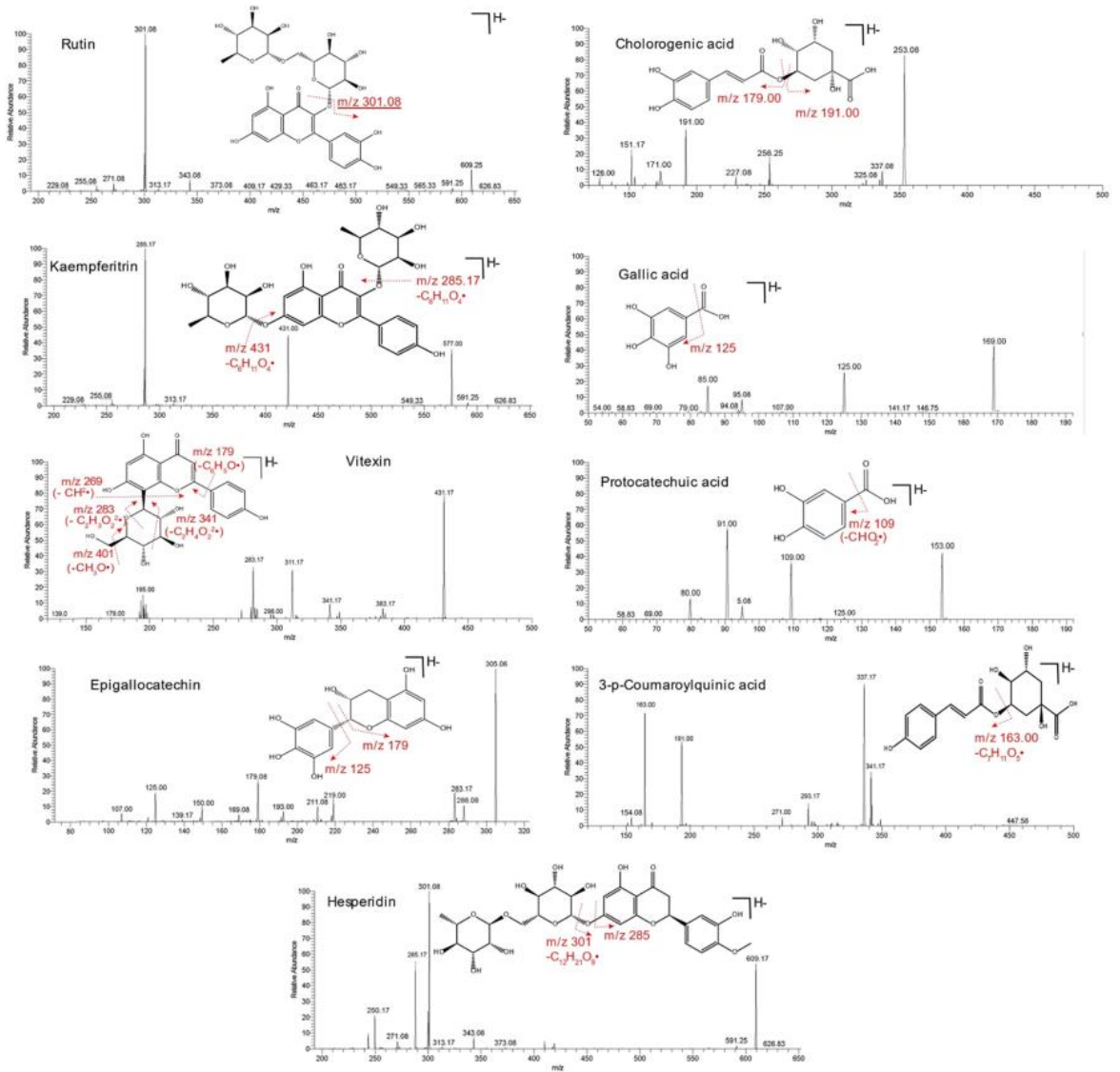


Fig. 1. ESI-MS/MS spectra in the negative mode for tentative compounds of hydroethanolic extract of *C. sativus* seeds. The tentative compounds of hydroethanolic extract of *C. sativus* seeds are rutin, chlorogenic acid, epigallocatechin, kaempferitrin, gallic acid, hesperidin, vitexin, protocatechuic acid, and 3-p-coumaroylquinic acid.



**Table 1**  
Identification of bioactive compounds in hydroethanolic extract of *Cucumis sativus* L. seeds corresponding to the chromatographic fragments by LC ESI-MS/MS.

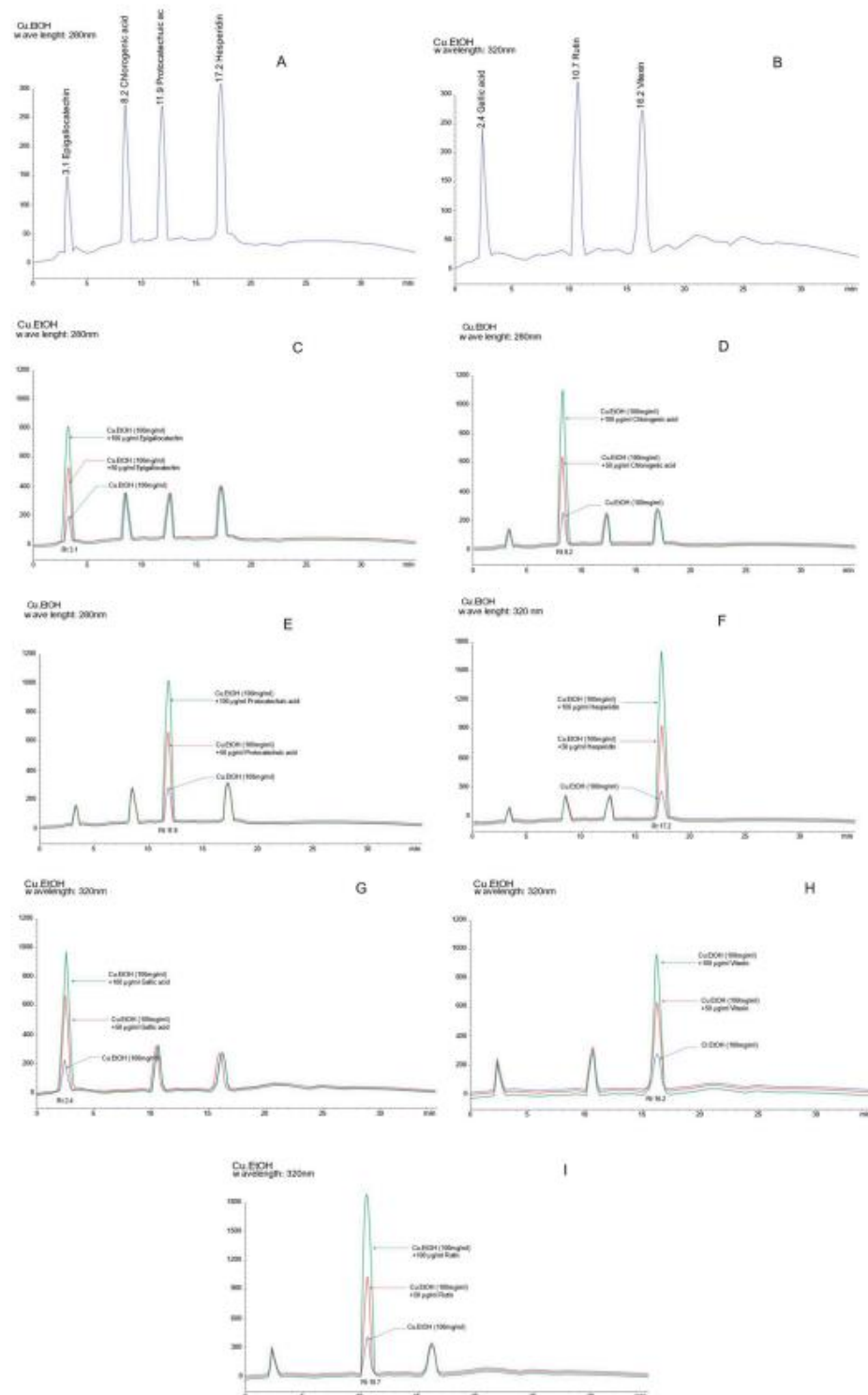
Sr. No	Rt (min)	Molecular Weight	Observed MS ( <i>m/z</i> )	Calculated MS ( <i>m/z</i> )	Error (ppm)	Precursor type	ESI-IT MS/MS (Ions)	Empirical formula	Proposed compound	Class
1.	1.98	170.12	169.0143	169.0151	4.73	[M-H]-	169, 125, 85, 79	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Gallic Acid	Hydroxybenzoic Acid Derivatives
2.	3.12	342.3	341.1084	341.1078	-1.76	[M-H]-	341.1, 179, 161, 143, 125.02, 119, 113, 101	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Galactinol	Oligosaccharides
3.	3.12	290.27	291.0863	291.0859	-1.37	[M+H]+	291, 165, 139, 123	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Catechin	Flavonoid/ Catechins
4.	4.29	578.52	577.1577	577.1579	0.35	[M-H]-	577, 431, 285, 255	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	Kaempferitrin	Flavonoid Glycosides
5.	4.3	434.4	433.1141	433.1143	0.46	[M-H]-	433, 272, 271, 177, 151, 119, 107	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	Naringenin-7-O-Glucoside or Prunin	Flavonoid Glycosides
6.	4.3	594.5	593.1516	593.1512	-0.67	[M-H]-	593, 327, 285	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	Kaempferol-7-O-Neohesperidoside or Kaempferol-3-O-Glucorhamnoside	Flavonoid Glycosides
7.	5.3	432.4	431.0985	431.0979	-1.39	[M-H]-	431, 341, 311, 283, 117	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	Vitexin	Flavone Glucoside
8.	5.7	154.12	153.0181	153.0183	1.31	[M-H]-	153, 109, 91, 80, 65	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Protocatechuic Acid	Hydroxybenzoic Acid Derivatives
9.	6.3	338.31	337.1365	337.1369	1.19	[M-H]-	337, 191, 173, 163, 119	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	3-p-Coumaroylquinic Acid	Quinic Acids
10.	8.5		369.1211	369.1223	3.25	[M-H]-	193, 191, 173, 134, 93, 85	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	3-Feruloylquinic Acid	Quinic Acids
11.	8.7	610.6	609.1817	609.1816	-0.16	[M-H]-	609, 301, 285, 151	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	Hesperidin	Flavonoid glycosides
12.	8.9	306.27	305.0367	305.0377	3.28	[M-H]-	305, 169, 125	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Epigallocatechin	Catechin Gallates
13.	11.01	354.31	353.0878	353.0868	-2.83	[M-H]-	353, 191, 173	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Chlorogenic Acid	Alcohols And Polyols
14.	12.25	610.5	609.1466	609.1469	0.49	[M-H]-	609.25, 301.08, 271	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	Rutin	Flavonoid Glycosides

### 3.2. Optimizarea condițiilor HPLC și validarea metodei

Condițiile HPLC au fost optimizate pentru a obține o separare maximă și vârfuri vizibile. Sistemul binar de fază mobilă constând din solventul A (0,1% acid trifluoroacetic cu metanol) și solventul B (0,1% acid trifluoroacetic cu acetonitril) la un debit de 0,8 ml/min a arătat separările maxime cu un timp total de rulare de 40 de minute. Timpii de retenție ai vârfurilor de separare au fost comparați cu vârfurile standardelor externe în aceleași condiții cromatografice. Epigallocatechina, acidul clorogenic, acidul protocatehuic și hesperidina au avut vârfuri vizibile la 280 nm, iar acidul galic, rutina și vitexina au avut vârfuri ascuțite la 320 nm (Fig. 2 și Tabelul 2).

Curbele de calibrare ale diluțiilor standardelor externe au fost utilizate pentru validarea liniarității. Intervalul de liniaritate al curbelor standard ale epigallocatechinei, acidului clorogenic, acidului protocatehuic, hesperidinei, acidului galic, rutinei și vitexinei a fost găsit între 7,81 și 500 μg/ml cu un coeficient de regresie semnificativ (*r*<sup>2</sup>) 0,9992-0,9998. LOD și LOQ ale metodei actuale au fost găsite între 0,43 și 0,92 μg/ml și 1,31-2,76 μg/ml, respectiv, așa cum se arată în Tabelul 2. Precizia instrumentală și repetabilitatea au fost validate prin analize inter-zi (*n* = 3) și intra-zi timp de trei zile consecutive (*n* = 9) ale standardelor externe de epigallocatechină, acid clorogenic, acid protocatehuic, hesperidină, acid galic, rutină și vitexină. Rezultatele validării preciziei prezentate în Tabelul 2 și Tabelul

S1 au arătat %RSD respective pentru inter-zi și intra-zi între 0,83% și 1,41% și 0,64-1,75%. În validarea acurateței, extractul Cu.EtOH a fost îmbogățit cu diferite concentrații de standarde externe (50, 100, 150 μg/ml) pentru a calcula procentul de recuperare. Rezultatele în procent de recuperare prezentate în Tabelul 2 și Tabelul S2 au arătat că valoarea medie a variat între  $98,03 \pm 0,88$ – $99,42 \pm 0,49$  cu %RSD 0,49–1,94%, ceea ce indică o bună acuratețe a acestei metode (Tabelul 2 și Tabelul S2).



**Fig. 2.** HPLC DAD-UV/Vis chromatograms of hydroethanolic extract of *C. sarivus* seeds at different wavelengths and standard addition validation chromatograms of bioactive compounds. HPLC chromatogram of (A) epigallocatechin, chlorogenic acid, protocatechuic acid, and hesperidin at wavelength 280 nm, (B) gallic acid, rutin, and vitexin wavelength 320 nm. The standard addition chromatograms of (C) epigallocatechin, (D) chlorogenic acid, (E) protocatechuic acid, (F) hesperidin, (G) gallic acid (H) vitexin, and (I) rutin.

M. Wahid et al.

**Table 2**  
Quantification and method validation of bioactive compounds of hydroethanolic extract of *Cucumis sativus* L. seeds by HPLC-DAD-UV/VIS.

Analytes	$\lambda$ (nm)	Rt (mins)	Linear Regression Data		LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Precision (RSD %)		Recovery		Analytes + Extract ( $\mu\text{g/g}$ )	
			Range ( $\mu\text{g/ml}$ )	Equation				Inter Day	Intra Day	Mean	RSD%	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$
Epigallocatechin	280	3.1	7.81-500	$y = 38.658x + 10.86$	0.68	2.06	195.45	0.72	1.34	99.27 $\pm$ 0.48	0.48	244.13	293.89
Chlorogenic acid		8.2	7.81-500	$y = 27.275x + 10.63$	0.92	2.76	240.75	1.08	0.98	98.60 $\pm$ 1.25	1.27	288.65	339.19
Protocatechuic acid		11.9	7.81-500	$y = 39.265x + 8.463$	0.9993	1.53	201.1	0.40	1.53	98.11 $\pm$ 1.66	1.69	249.91	300.17
Hesperidin	320	17.2	7.81-500	$y = 43.267x + 7.870$	0.9996	1.31	367.53	0.77	1.17	99.25 $\pm$ 0.51	0.51	416.51	459.23
Gallic acid		2.4	7.81-500	$y = 38.662x + 9.364$	0.9997	1.72	483.40	0.92	0.51	99.36 $\pm$ 1.39	1.40	531.61	582.41
Rutin		10.7	7.81-500	$y = 62.652x + 12.78$	0.9998	1.57	647.08	1.38	0.96	99.50 $\pm$ 0.57	0.58	696.86	746.15
Vitexin		16.2	7.81-500	$y = 56.649x + 14.12$	0.9996	1.99	556.56	0.62	0.95	99.35 $\pm$ 1.14	1.14	605.79	664.91

### 3.3. Analiza cantitativă a compușilor bioactivi prin HPLC

Compușii bioactivi identificați prin LC ESI-MS/MS, epigallocatechina, acidul clorogenic, acidul protocatechuic, hesperidina, acidul galic, rutina și vitexina, au fost cuantificați pe baza curbelor de calibrare standard ale diluțiilor standard externe. Tabelul 2 prezintă concentrația compușilor bioactivi în Cu.EtOH, arătând rutina cu o concentrație mai mare de 647,08  $\mu\text{g/g}$ , urmată de vitexină (556,56  $\mu\text{g/g}$ ), acid galic (483,40  $\mu\text{g/g}$ ), hesperidină (367,53  $\mu\text{g/g}$ ) și acid clorogenic (240,75  $\mu\text{g/g}$ ). Acidul protocatechuic și epigallocatechina au fost cuantificate la 201,1  $\mu\text{g/g}$  și respectiv 195,45  $\mu\text{g/g}$ , pe baza curbelor de calibrare ale diluțiilor standard, așa cum este prezentat în Tabelul 2.

### 3.4. Experimente in vitro

#### 3.4.1. Efecte asupra preparatului de aortă izolată de șobolan

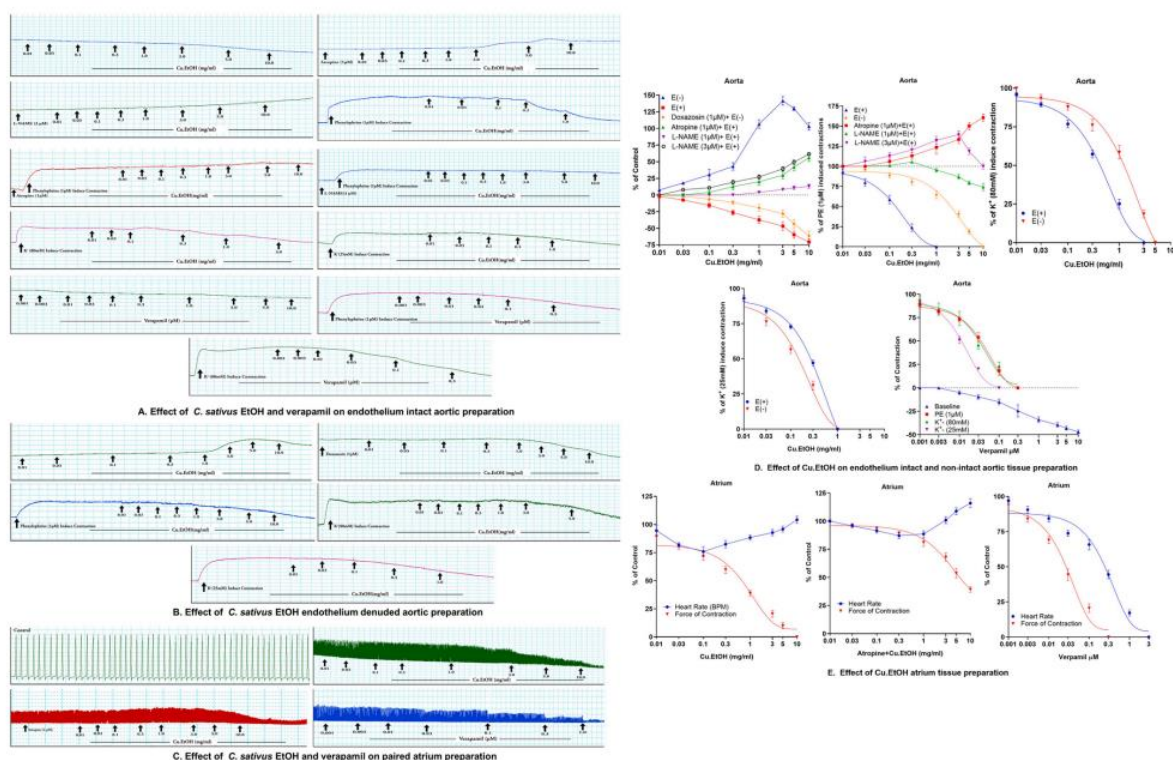
Cu.EtOH a fost aplicat pe preparatul aortic cu endoteliu intact pentru a examina efectul vasorelaxant al extractului EtOH (Fig. 3). Extractul EtOH exercită efectul relaxant fără constricție în preparatele aortice izolate cu endoteliu intact. Cu toate acestea, preparatele aortice denudate au cauzat constricție la doze de 0,1-3 mg/ml, dar constricțiile s-au relaxat parțial la doze de 5-10 mg/ml. Aceste constricții în preparatele aortice denudate au fost blocate cu doxazosin (1  $\mu\text{M}$ ), un blocant alfa-adrenergic. Atropina (1  $\mu\text{M}$ ) și L-NAME (1 și 3  $\mu\text{M}$ ) au fost utilizate pentru a bloca răspunsul vasorelaxant bazat pe EDRF indus de colinergic și NO pe țesutul aortic cu endoteliu intact și Cu.EtOH induce constricții în preparatele aortice cu endoteliu intact. Cu.EtOH a inversat constricția indusă de fenilefrină (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{K}^+$  (80 mM) și  $\text{K}^+$  (25 mM) în preparatele aortice cu endoteliu și denudate.

EC50 pentru constricția indusă de fenilefrină (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{K}^+$  (80 mM) și  $\text{K}^+$  (25 mM) pe preparatele aortice cu endoteliu intact au fost 0,1785 mg/ml (95% CI: 0,1210-0,2654 mg/ml), 0,5740 mg/ml (95% CI: 0,4384-0,7581 mg/ml), 0,7413 mg/ml (95% CI: 0,5022-1,195 mg/ml), respectiv, în timp ce EC50 pentru contracțiile menționate mai sus pe preparatele aortice denudate au fost 3,383 mg/ml (95% CI: 2,233-5,216 mg/ml), 2,643 mg/ml (95% CI: 1,614-4,764 mg/ml), 0,2063 mg/ml (95% CI: 0,1231-0,3526 mg/ml), respectiv. În prezența atropinei (1  $\mu\text{M}$ ) și L-NAME (1 și 3  $\mu\text{M}$ ), Cu.EtOH nu a reușit să relaxeze contracțiile provocate de fenilefrină (1  $\mu\text{M}$ ) pe țesutul aortic cu endoteliu intact. S-a observat că atropina (1  $\mu\text{M}$ ) a blocat complet relaxarea indusă de Cu.EtOH a contracției provocate de fenilefrină (1  $\mu\text{M}$ ) pe preparatele aortice. Cu toate acestea, L-NAME (1  $\mu\text{M}$ ) a blocat parțial relaxarea, dar, la 3  $\mu\text{M}$ ,

răspunsul de relaxare al Cu.EtOH a fost blocat cu o relaxare inițială la 5 și 10 mg/ml. Aceasta indică prezența activității antagoniste a canalelor de calciu pe lângă mecanismul EDRF bazat pe NO. Aceste rezultate au fost verificate și comparate cu verapamilul, un blocant al canalelor de calciu, pentru posibila activitate antagonistă a calciului a Cu.EtOH. Verapamilul a relaxat constricțiile induse de fenilefrină (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{K}^+$  (80 mM) și  $\text{K}^+$  (25 mM) în preparatele aortice cu endoteliu intact cu EC50 respective de 0,05608  $\mu\text{M}$  (95% CI: 0,04019-0,07924  $\mu\text{M}$ ), 0,03896  $\mu\text{M}$  (95% CI: 0,02382-0,06550  $\mu\text{M}$ ) și 0,01280  $\mu\text{M}$  (95% CI: 0,01072-0,01529  $\mu\text{M}$ ), respectiv (Fig. 3).

### 3.4.2. Efectul asupra preparatelor de atrii împerecheați izolați de șobolan

Cu.EtOH a fost indus pe preparate de atrii împerecheați de șobolan pentru a explora posibilul său efect inotrop și cronotrop (Fig. 3). Cu.EtOH scade forța de contracție într-o manieră dependentă de concentrație la doze de 0,3-10 mg/ml cu un EC50 respectiv de 0,8731 mg/ml (95% CI: 0,5549-1,392) pentru a provoca un efect inotrop negativ. Cu.EtOH scade ritmul cardiac într-o manieră dependentă de concentrație la doze de 0,01-0,1 mg/ml, dar ritmul cardiac crește într-o manieră dependentă de concentrație la doze de 0,3-10 mg/ml, ritmul cardiac în preparatul de atriu exercitând astfel efectul cronotrop pozitiv la concentrații mai mari. Atropina (1  $\mu\text{M}$ ) a atenuat inotropul negativ al Cu.EtOH cu EC50 5,369 mg/ml (95% CI: 2,978-10,48 mg/ml). Aceste rezultate au fost comparate cu verapamilul, care a cauzat un răspuns inhibitor dependent de concentrație față de forța de contracție și ritmul cardiac în preparatul de atriu împerecheat cu valori EC50 respective de 0,02998  $\mu\text{M}$  (95% CI 0,02013-0,04510  $\mu\text{M}$ ) și 0,3077  $\mu\text{M}$  (95% CI: 0,1969-0,4830  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3).



**Fig. 3.** Effects of Cu.EtOH on isolated aorta preparation, paired atrium. Vasorelaxant effects of Cu.EtOH and verapamil on **A.** endothelium intact and **B.** endothelium non-intact (denuded) aortic preparation in phenylephrine (1  $\mu$ M),  $K^+$  (80 mM) and  $K^+$  (25 mM) spastic contractions in absence and presence of atropine (1  $\mu$ M) and L-NAME (1 and 3  $\mu$ M), **C.** Chronotropic and inotropic effect of Cu.EtOH and verapamil on isolated paired atrium preparation in absence and presence of atropine. **D.** Vasorelaxant effects of Cu.EtOH and verapamil on endothelium intact (E+) and B. denuded aortic (E-) preparation in phenylephrine (1  $\mu$ M),  $K^+$  (80 mM), and  $K^+$  (25 mM) spastic contractions in the absence and presence of atropine and L-NAME. **E.** Negative inotropic and positive chronotropic effect of Cu.EtOH on isolated paired atrium preparation in the absence and presence of atropine (1  $\mu$ M). Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D. (n = 4), and the dose-response curve analyzed data for *in-vitro* and student t-test for blood pressure, compared to control group and p < 0.05 was considered significant.

### 3.5. Experimente in vivo

#### 3.5.1. Doza maximă tolerată

Când Cu.EtOH a fost studiat pentru o doză maximă tolerată de extract la șobolani, s-a constatat că este sigur, fără modificări ale greutății corporale, modificări comportamentale, semne clinice de distres și mortalitate la șobolani observate pe parcursul a 28 de zile.

#### 3.5.2. Efectul asupra tensiunii arteriale și a parametrilor hemodinamici

Figura 4 prezintă efectul Cu.EtOH asupra tensiunii arteriale sistolice, diastolice și a parametrilor hemodinamici la șobolanii anesteziați normotensivi. Administrarea intravenoasă a Cu.EtOH a atenuat tensiunea arterială sistolică (SBP), tensiunea arterială diastolică (DBP), tensiunea arterială medie (MABP) și presiunea pulsului, dependent de doză, cu scăderea bătăilor inimii pe minut (BPM). Răspunsul hipotensiv al Cu.EtOH a fost dependent de doză la doze de 0,1, 0,3, 0,5 și 1 mg/kg. Cu.EtOH a scăzut MABP în intervalul  $78,32 \pm 5,2$ ,  $69,73 \pm 3,04$ ,  $52,34 \pm 6,5$  și  $48,50 \pm 8,02$  mmHg la dozele respective

de 0,1, 0,3, 0,5 și 1 mg/kg. În prezența atropinei, efectul hipotensiv a fost atenuat, iar MABP a scăzut în intervalul  $112,96 \pm 2,1$ ,  $109,74 \pm 3,8$ ,  $97,80 \pm 2,7$ ,  $69,53 \pm 5,5$  mmHg la dozele de 0,1, 0,3, 0,5 și respectiv 1 mg/kg (Fig. 4). Compușii bioactivi care pot provoca un răspuns hipotensiv nu pot stimula receptorii muscarinici; prin urmare, răspunsul hipotensiv este diminuat. Aceste rezultate au fost comparate cu verapamilul. Acesta a scăzut MABP al șobolanilor anesteziați normotensivi în intervalul  $93,34 \pm 0,92$ ,  $75,95 \pm 3,18$ ,  $53,61 \pm 4,5$ ,  $46,20 \pm 2,15$  mmHg la dozele respective de 1, 3 și 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Fig. 4).

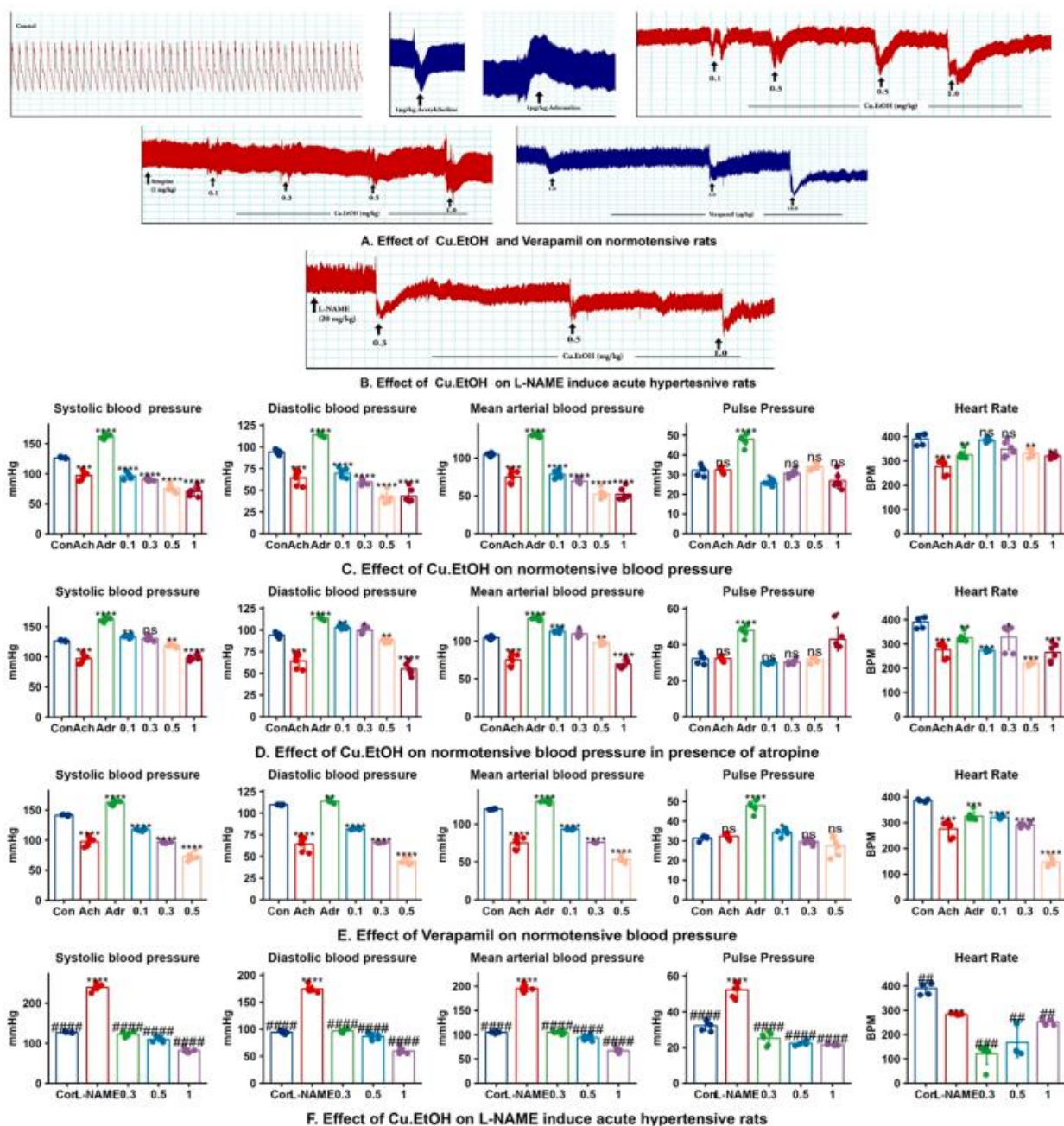
### 3.5.3. Hipertensiune acută indusă de L-NAME

Figura 4 a demonstrat o creștere substanțială ( $p\text{-value} < 0,05$ ) a MABP ( $195,88 \pm 7,15$  mmHg) la șobolanii normotensivi anesteziați, atunci când au fost tratați cu L-NAME pentru a induce hipertensiune acută. Cu toate acestea, tratamentul cu Cu.EtOH (0,3, 0,5 și 1 mg/kg, i.v.) a dus la o scădere semnificativă ( $p\text{-value} < 0,05$  față de L-NAME) a MABP la  $104,95 \pm 3,75$ ,  $94,105 \pm 5,3$  și  $67,046 \pm 3,65$  mmHg la dozele de 0,3, 0,5 și 1 mg/kg.

### 3.5.4. Efectul asupra leziunilor miocardice cronice induse de ISO

Efectul Cu.EtOH asupra leziunilor miocardice cronice induse de isoproterenol a fost studiat în indici preliminari ai hipertrofiei cardiace, cum ar fi indicii biometrici, parametrii histopatologici și markerii biochimici cardiaci. S-a observat că extractul Cu.EtOH protejează animalele de leziunile miocardice cronice induse de ISO.





**Fig. 4.** Effects of Cu.EtOH normotensive and L-NAME induce acute hypertensive rats anesthesia rats. **A.** The hypotensive and hypertensive control responses with acetylcholine (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and adrenaline (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The hypotensive effect of Cu.EtOH and verapamil in the absence and presence of atropine (1 mg/kg) in normotensive anesthesia rats. **B.** The hypotensive effect on L-NAME (20 mg/kg) induces acute hypertensive rats anesthesia rats. The hypotensive effect of **C.** Cu.EtOH (mg/kg) **D.** in the presence of atropine (1 mg/kg) **E.** verapamil ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in normotensive anesthesia rats and **F.** on L-NAME induce acute hypertensive rats anesthesia rats with changes in systolic, diastolic, mean atrial blood pressure, pulse pressure (MABP) and heart rate. Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D. (n = 4), and student t-test was applied and compared to control group and  $p < 0.05$  was considered significant. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs L-NAME group and # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  vs L-NAME group). Con: Control, Ach: acetylcholine, Adr: adrenaline.

### 3.5.5. Activitate fizică și rata de supraviețuire

Activitatea fizică și rata de supraviețuire în timpul studiului indică semnificativ infarctul miocardic sau insuficiența cardiacă. În timpul acestui studiu, mortalitatea este așteptată din cauza ischemiei miocardice. Nu a fost înregistrată mortalitate la animalele tratate cu Cu.EtOH (75 și 150

mg/kg), verapamil și carvedilol, dar mortalitatea a fost observată în grupul cu boală (ISO); 2 animale au murit din cauza infarctului miocardic din șase animale.

Asociația Inimii din New York (NYHA) clasifică insuficiența cardiacă în patru categorii (Clasa I, II, III și IV) pe baza biochimiei sângelui și a dizabilității fizice. În acest studiu, administrarea de ISO a scăzut activitatea fizică după a 4-a administrare subcutanată de isoproterenol, iar activitatea fizică a scăzut complet după a 10-a administrare cu scurtarea respirației, în timp ce animalele tratate cu verapamil, carvedilol și Cu.EtOH (150 mg/kg) au fost active și au avut o scurtare neglijabilă a respirației. S-a observat că animalele din grupul ISO au pierdut în greutate în timpul studiului, dar au crescut în alți parametri, cum ar fi oboseala, scurtarea respirației și activitățile fizice. Cu toate acestea, pierderea în greutate sau creșterea altor parametri nu au fost observate în grupurile de tratament cu Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol.

### 3.5.6. Efectul asupra parametrilor histopatologici

Modificările histologice ale țesutului cardiac au fost examinate pentru a determina prezența necrozei asociate cu creșterea fibroblastelor și infiltrarea celulelor inflamatorii. De asemenea, au fost studiați și alți parametri, precum numărul de celule, diametrul și grosimea atât a celulelor, cât și a mușchiului. Rezultatele au arătat că țesuturile miocardice ale grupului ISO au prezentat leziuni semnificative ale fibrelor musculare, inclusiv creșterea fibrozei, hiperplazia locală a fibrelor de colagen, infiltrarea celulelor inflamatorii și edem interstițial. Mai mult, aceste țesuturi au prezentat o infiltrație ridicată de neutrofile, cu miofibre slabe, picnoză, cariorexis (Fig. 5) și multe țesuturi fibroase dezordonate structural. Cu toate acestea, tratamentul cu Cu.EtOH, verapamil și carvedilol a scăzut semnificativ ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul ISO) infiltrarea celulelor inflamatorii și fibroza, cu leziuni minore în țesuturile miocardice, cu excepția dozei mici (75 mg/kg) de extract EtOH, care a avut o protecție mai puțin semnificativă ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul ISO). Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol au scăzut necrobioza, ceea ce a dus la o creștere semnificativă a numărului de celule ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul ISO) și, de asemenea, au menținut diametrul celular și suprafața celulară în mod semnificativ ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul ISO), comparativ cu grupul ISO (Fig. 5). Aceste rezultate indică protecția oferită de Cu.EtOH împotriva deteriorării țesutului cardiac la șobolanii cu infarct miocardic.

### 3.5.7. Efectul asupra indicilor biometrici

Figura 6 (A) ilustrează efectul Cu.EtOH asupra indicilor biometrici ai hipertrofiei cardiace induse de ISO. S-a observat că administrarea de ISO a crescut semnificativ ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul de control) indicele biometric, cum ar fi în grupul cu boală (ISO). Toți indicii biometrici, adică greutatea inimii, diametrul inimii, greutatea ventriculului stâng (LHV), indicele greutății inimii, indicele LHV, indicele lungimii tibiei și indicele lungimii cozii, au fost crescuți în grupul ISO și scăzuți în grupurile tratate cu Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol. Aceste grupuri tratate au avut o protecție semnificativă ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul ISO) împotriva hipertrofiei cardiace în comparație cu grupul ISO și nicio diferență semnificativă ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul de control) între grupul de control și aceste grupuri tratate. Doza mică (75 mg/kg) de extract EtOH a fost găsită cu o protecție scăzută semnificativă ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul ISO) la animale. Investigarea macroscopică a grosimii LHV a arătat prezența semnificativă ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul de control) a hipertrofiei în grupul ISO (Fig. 5(A), 6(A)) în comparație cu grupul de control; cu toate acestea, grupurile tratate cu Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol nu au avut o grosime remarcabilă.

### 3.5.8. Efectul asupra markerilor biochimici cardiaci serici

Markerii biochimici serici, cum ar fi CK, CK-MB, cTnT, cTnI, LDH, ANP și profilul lipidic, au semnificație clinică în diagnosticarea infarcturilor miocardice. Pe lângă aceștia, concentrațiile de ACE, NO, renină, ALT, AST, IL-6 seric, BNP și cGMP susțin studiul leziunilor cardiace. Figura 6 (B) a arătat că a existat o diferență semnificativă ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul de control) între biomarkerii ISO și cei de control. Creșterea acestor biomarkeri serici în grupul administrat cu ISO a indicat prezența infarctului miocardic cronic, deși grupurile tratate cu extract de Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol au avut biomarkeri serici în intervalul limită, cu excepția dozelor mici (75 mg/kg) de extract EtOH. Aceste grupuri tratate au avut o protecție semnificativă ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul ISO) împotriva infarctului miocardic în comparație cu grupul ISO și nicio diferență semnificativă ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul de control) între control și aceste grupuri tratate. Rezultatele au arătat că Cu.EtOH protejează animalele de cardiotoxicitatea indusă de ISO.

### 3.5.9. Analiza expresiei genelor

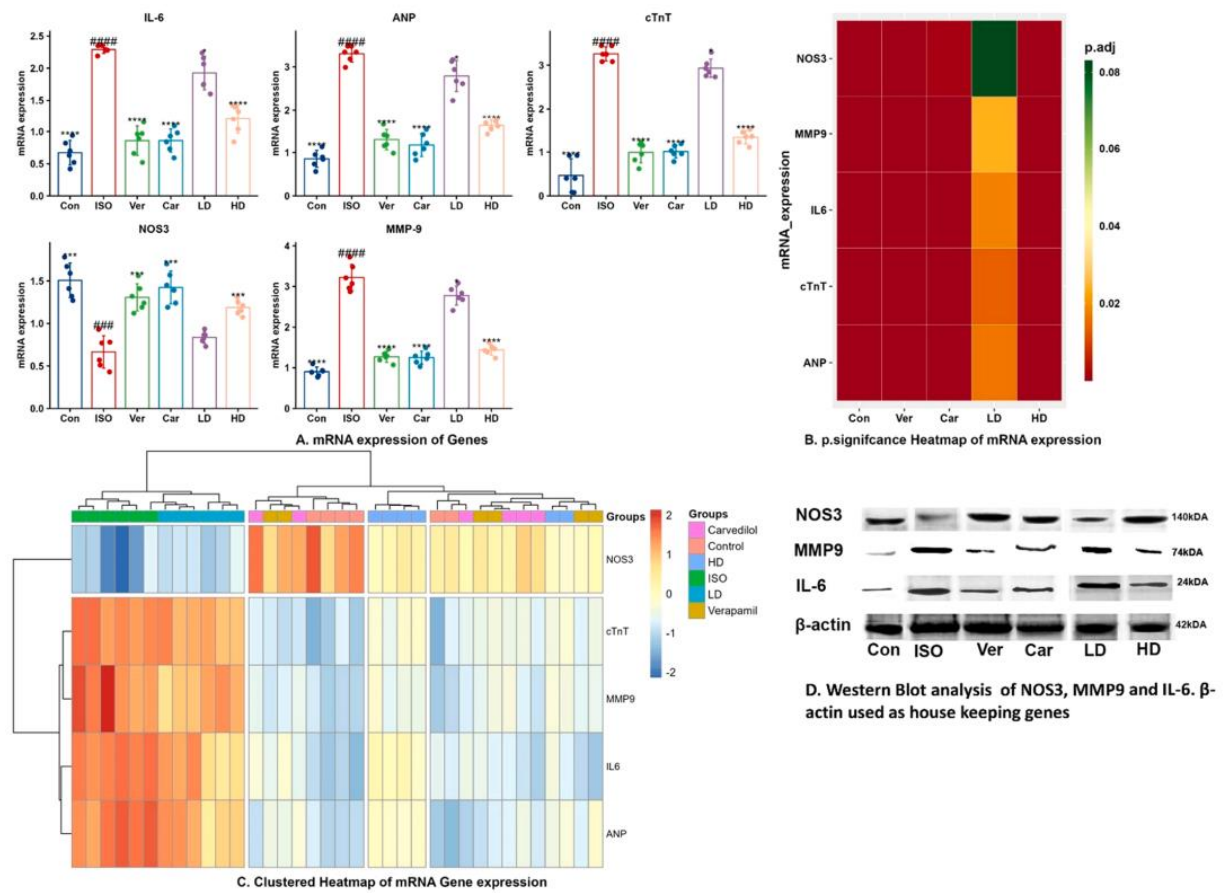
Figura 7 a prezentat expresia mRNA a genelor inflamatorii și cardiace, cum ar fi NOS3, ANP, IL-6, cTnT și MMP-9, care au fost studiate. Expresia mRNA a ANP, IL-6, MMP-9 și cTnT a fost semnificativ ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul ISO) reglată în jos în miocardul tratat cu Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol, dar expresia acestor gene a crescut semnificativ ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul de control) în grupul ISO. Doza mică (75 mg/kg) de extract EtOH a fost găsită cu o semnificație scăzută ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul ISO). Cu toate acestea, expresia mRNA a NOS3 a fost semnificativ ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul ISO) reglată în sus în țesuturile cardiace tratate cu Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol, în timp ce expresia sa a fost semnificativ ( $p < 0,05$  față de grupul de control) redusă în inimile hipertrofiate ale grupului ISO.

Analiza heatmap de clustering ierarhic a fost utilizată pentru a determina intensitățile normalizate ale expresiei genelor în ISO, control, Cu.EtOH (75 și 150 mg/kg), verapamil și carvedilol (Fig. 7). Roșu a reprezentat creșterea expresiei genelor, în timp ce albastru a reprezentat scăderea. Rezultatele indică faptul că tendința de expresie în grupurile de tratament a fost departe de expresia grupului ISO, dar aproape de grupul de control, cu excepția Cu.EtOH (75 mg/kg). În plus, aceste rezultate au demonstrat că Cu.EtOH (150 mg/kg) a inversat cu succes și a schimbat tendințele de expresie a genelor similare cu verapamilul și carvedilolul.

Cu analiza Western blot, am constatat că expresia IL-6 și MMP-9 a fost scăzută în Cu.EtOH (150 mg/kg), carvedilol și verapamil în comparație cu grupul ISO, unde acestea au fost crescute. Când expresia IL-6 și MMP-9 a crescut, aceasta a indicat inflamație în cardiomiocite. Cu toate acestea, expresia NOS3 a fost crescută în Cu.EtOH (150 mg/kg), carvedilol și verapamil în comparație cu grupul ISO, unde NOS3 a fost scăzut. Când expresia NOS3 a crescut, aceasta a indicat relaxarea în cardiomiocite (Fig. 7D).

M. Wahid et al.

Biomedicine &amp; Pharmacotherapy 148 (2022) 112704



**Fig. 7.** Effects of Cu.EtOH on mRNA gene expressions of IL-6, ANP, cTnT, NOS3, and MMP-9 in myocardial tissues after ISO induced MI. **A.** The trend of gene expression in hypertrophy myocardial tissues **B.** Heatmap of significant ( $p$ . adjusted ( $p < 0.05$ ) vs. ISO) trend changing in gene expression when compared to ISO group, red indicate the high significance and green indicate the less significant. **C.** The hierarchical clustering heatmap analysis of gene expression in myocardial tissues; red represented the increase in gene expression while blue represented the decrease. **D.** Western blot analysis to detect the expression of IL-6, MMP-9, and NOS3 in heart samples. Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), and data were analyzed by student t-test, compared to ISO group, whereas ISO group compared with control and  $p < 0.05$  was considered significant. ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$  vs ISO group and  $\#p < 0.05$ ,  $\#\#p < 0.01$ ,  $\#\#\#p < 0.001$ ,  $\#\#\#\#p < 0.0001$  vs control group). Con: Control; ISO: isoprenaline; Ver: verapamil; Car: carvedilol; LD: 75 mg/kg Cu.EtOH; HD: 150 mg/kg Cu.EtOH.

### 3.5.10. Analiza profilului metabolomic

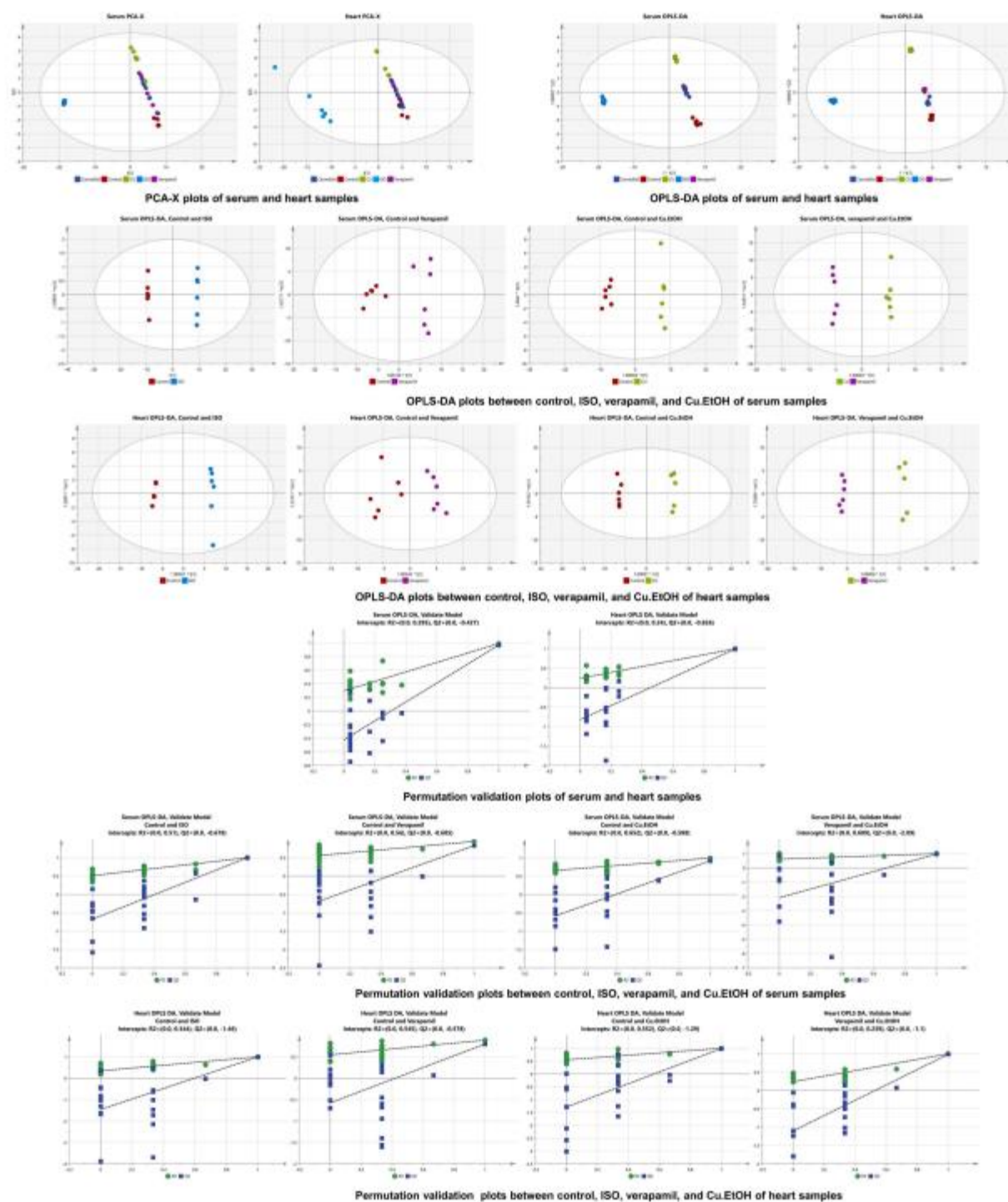
**3.5.10.1. Analiza multivariată a datelor.** Componentele principale 1 și 2 au fost utilizate pentru a evalua graficul PCA. Graficele de scor PCA nesupravegheate ale datelor metabolomice din ser ( $R2X = 0,941$ ,  $Q2 = 0,929$ ) și inimă ( $R2X = 0,938$ ,  $Q2 = 0,903$ ) au arătat o clasificare satisfăcătoare a grupurilor experimentale cu o separare explicită între grupul ISO și alte grupuri, adică Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol (Fig. 8). Dacă  $R2X$  și  $Q2$  sunt mai mari de 0,5, modelul este considerat stabil și predictiv. Aceste rezultate indică un proces de modelare de succes cu o modificare metabolică severă în grupul ISO.

Graficul OPLS-DA supravegheat discriminează metaboliții serici și cardiaci între grupurile de control, ISO, Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol. În graficul OPLS-DA, a existat o discriminare explicită a metaboliților serici și cardiaci între grupul ISO și alte grupuri, adică Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol. Grupul ISO a fost departe de grupurile tratate cu Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol, în timp ce grupurile tratate cu Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol se intersectează reciproc (Fig. 8). Valorile crescute ale R<sup>2</sup>X, Q<sup>2</sup> și CV-ANOVA ale modelului au sugerat că modelele OPLS-DA au o potrivire și o predictibilitate semnificative fără supraadaptare. Modelele OPLS-DA ale serului (R<sup>2</sup>X = 0,975, Q<sup>2</sup> = 0,979) și ale țesuturilor miocardice (R<sup>2</sup>X = 0,993, Q<sup>2</sup> = 0,998) au avut o bună stabilitate și predicție. Astfel, rezultatele analizei OPLS-DA indică o diferență semnificativă (p-value < 0,05) între metaboliții ISO și grupurile tratate.

În plus, modelele OPLS-DA între control și ISO (Ser: R<sup>2</sup>X = 0,983, Q<sup>2</sup> = 0,999; Inimă: R<sup>2</sup>X = 0,984, Q<sup>2</sup> = 0,994), verapamil (Ser: R<sup>2</sup>X = 0,695, Q<sup>2</sup> = 0,829; Inimă: R<sup>2</sup>X = 0,75, Q<sup>2</sup> = 0,8) și Cu.EtOH (150 mg/kg) (Ser: R<sup>2</sup>X = 0,783, Q<sup>2</sup> = 0,914; Inimă: R<sup>2</sup>X = 0,943, Q<sup>2</sup> = 0,988) au fost stabilite atât pentru metaboliții serici, cât și pentru cei cardiaci, iar modelul OPLS-DA a fost stabilit și pentru verapamil și extract de EtOH (150 mg/kg) (Ser: R<sup>2</sup>X = 0,85, Q<sup>2</sup> = 0,964; Inimă: R<sup>2</sup>X = 0,92, Q<sup>2</sup> = 0,983).

Pentru validitatea statistică și semnificația metaboliților din ser și țesutul cardiac ai grupurilor de control, Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil, carvedilol și ISO au fost evaluate în continuare prin teste de permutare cu validare încrucișată (Fig. 8). Parametrul R<sup>2</sup> utilizat pentru varianță și Q<sup>2</sup> explică predictibilitatea modelului, gradul de suprapunere și corelația dintre datele permutate și cele originale. Intercepția Q<sup>2</sup> negativă a sugerat buna predictibilitate și corelație a modelului. Rezultatele testului de permutare pentru ser (R<sup>2</sup> = 0,295, Q<sup>2</sup> = - 0,427) și țesuturile cardiace (R<sup>2</sup> = 0,24, Q<sup>2</sup> = - 0,826) indică faptul că modelele sunt stabile și au prezis variația. În plus, modelele de validare între control și ISO (Ser: R<sup>2</sup>X = 0,51, Q<sup>2</sup> = - 0,678; Inimă: R<sup>2</sup>X = 0,344, Q<sup>2</sup> = - 1,46), verapamil (Ser: R<sup>2</sup>X = 0,56, Q<sup>2</sup> = - 0,685; Inimă: R<sup>2</sup>X = 0,545, Q<sup>2</sup> = - 0,578) și extract de EtOH (150 mg/kg) (Ser: R<sup>2</sup>X = 0,652, Q<sup>2</sup> = - 0,588; Inimă: R<sup>2</sup>X = 0,552, Q<sup>2</sup> = - 1,29) au fost stabilite atât pentru metaboliții serici, cât și pentru cei cardiaci, iar modelul de validare a fost stabilit și pentru verapamil și extract de EtOH (150 mg/kg) (Ser: R<sup>2</sup>X = 0,609, Q<sup>2</sup> = - 2,09; Inimă: R<sup>2</sup>X = 0,239, Q<sup>2</sup> = - 1,1).





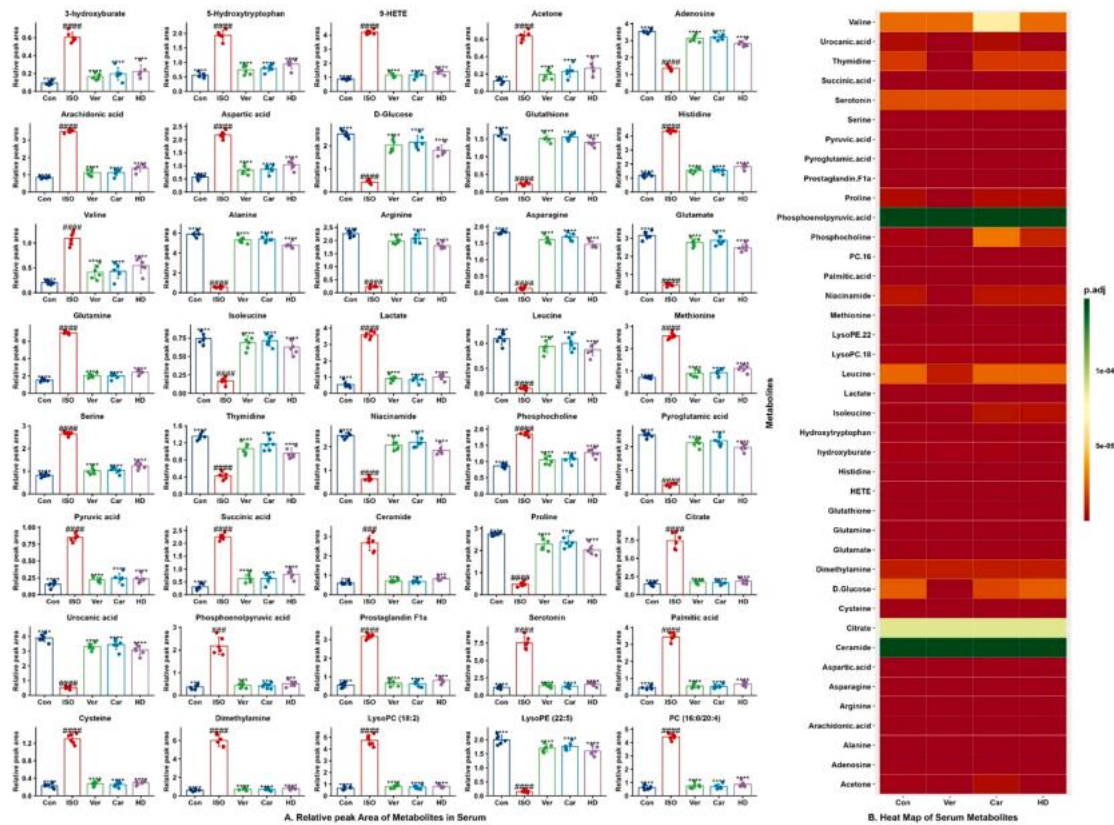
**Fig. 8.** Effects of  $\text{Cu.EtOH}$  on metabolic profiles of serum and heart samples after ISO induced MI. The PCA and OPLS-DA score plots with permutation tests plots to validate the data for all experimental groups. Comparative OPLS-DA and permutation test plots in between Control and MI induce groups (ISO, Verapamil, carvedilol, and  $\text{Cu.EtOH}$ ).

**3.5.10.2. Analiza biomarkerilor în diferite probe.** Studiul datelor metabolice a fost utilizat pentru a identifica compuși și pentru a investiga căile metabolice asociate cu infarctul miocardic. În ser, 90 de metaboliți ca potențiali biomarkeri au fost filtrați și identificați, incluzând corpi cetonici, mineralocorticoizi, eicosanoide, acizi organici, aminoacizi, glicoproteine, colină, glicerol, glucoză și

betaină. Fig. 9 prezintă alterarea a 35 de metaboliți în ser. Rezultatele au indicat că nivelurile de 3-hidroxiubutirat, 5-hidroxitriptofan, 9-HETE, acetonă, adenozină, acid arahidonic, acid aspartic, D-glucoză, glutation, histidină, valină, alanină, arginină, asparagină, glutamat, glutamină, izoleucină, lactat, leucină, metionină, serină, timidină, niacinamidă, fosfocolină, acid piroglutamic, acid piruvic, acid succinic, ceramidă, prolină, citrat, acid urocanic, acid fosfoenolpiruvic, prostaglandină-f1a, serotonină, acid palmitic, cisteină, dimetilamină, LysoPC-18, LysoPE-22, PC-16 au fost semnificativ ( $p$ -value $<0.05$ , față de grupul de control) crescute în grupul ISO în comparație cu controlul, dar Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol au inversat și au inhibat semnificativ ( $p < 0,05$ , față de grupul ISO) alterarea expresiilor acestor metaboliți la șobolani. Cu toate acestea, s-a observat că aminoacizii, adică alanină, arginină, asparagină, glutamat, glutamină, izoleucină, leucină, metionină, niacinamidă, pantotemat, acid piroglutamic, taurină și glicerol fosfocolină au fost semnificativ ( $p$ -value $<0.05$  față de control) reduși în grupul ISO în comparație cu controlul, în timp ce Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol au îmbunătățit semnificativ ( $p$ -value $<0.05$  față de grupul ISO) expresiile aminoacizilor. Aceste rezultate au arătat că Cu.EtOH (150 mg/kg) ameliorează alterarea metaboliților la șobolani cu infarct miocardic indus de isoproterenol, similar cu verapamilul și carvedilolul.

În țesutul cardiac, 60 de potențiali biomarkeri metabolici au fost filtrați și identificați. Fig. 10 a portretizat alterarea a 30 de metaboliți în inimă. Rezultatele au indicat că nivelurile de 3-hidroxiubutirat, 5-hidroxitriptofan, acid aspartic, glutation, valină, alanină, arginină, asparagină, glutamat, glutamină, izoleucină, lactat, leucină, metionină, serină, timidină, niacinamidă, fosfocolină, acid piroglutamic, acid piruvic, prolină, acid urocanic, b.pgf2a, acid citric, acid palmitic, acid fosfoenolpiruvic, serotonină, LysoPC-18, LysoPE-22 și PC-16 au fost semnificativ ( $p$ -value $<0.05$ , față de grupul de control) crescute în grupul ISO în comparație cu controlul, dar Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol au inversat și au inhibat semnificativ ( $p$ -value $<0.05$ , față de grupul ISO) alterarea expresiilor acestor metaboliți la șobolani.

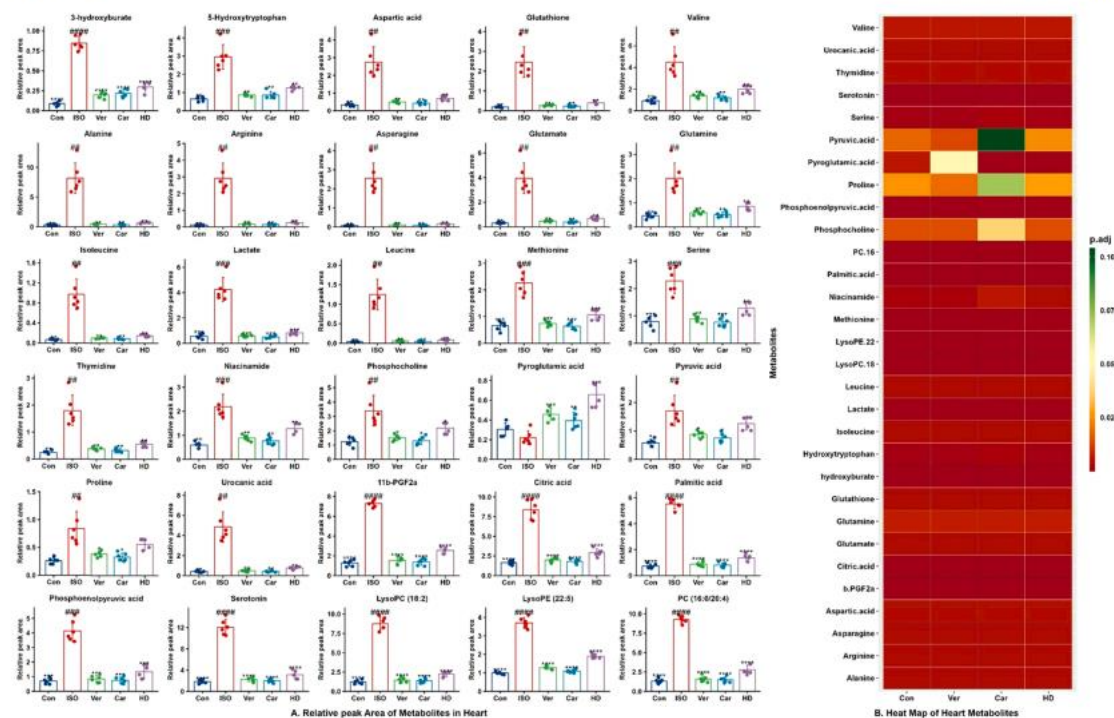




**Fig. 9.** Effects of *Cu. EtOH* on metabolic profiles of serum samples after ISO induced MI. **A.** The trend metabolic profiles of serum samples **B.** Heatmap of significant ( $p$ . adjusted ( $p < 0.05$ ) vs. ISO) trend changing in metabolic profiles when compared to ISO group, red indicate the highly significant, and green indicate the less significant. Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), and data were analyzed by student t-test, compared to ISO group, whereas ISO group compared with control and  $p < 0.05$  was considered significant. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs ISO group and # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  vs control group). Con: Control; ISO: isoprenaline; Ver: verapamil; Car: carvedilol; HD: 150 mg/kg *Cu. EtOH*.

M. Wahid et al.

Biomedicine & Pharmacotherapy 148 (2022) 112704



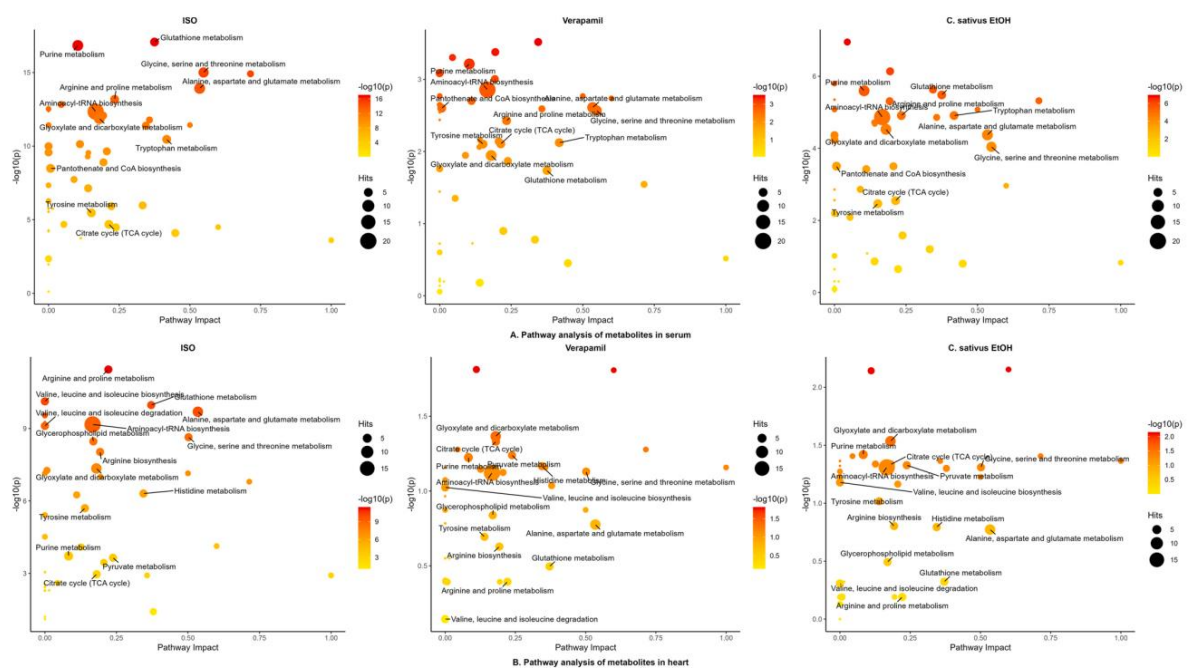
**Fig. 10.** Effects of *Cu. EtOH* on metabolic profiles of heart samples after ISO induced MI. **A.** The trend metabolic profiles of heart tissue sample **B.** Heatmap of significant ( $p$ . adjusted ( $p < 0.05$ ) vs. ISO) trend changing in metabolic profiles when compared to ISO group, red indicate the highly significant, and green indicate the less significant. Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ), and data were analyzed by student t-test, compared to ISO group, whereas ISO group compared with control and  $p < 0.05$  was considered significant. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs ISO group and # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  vs control group). Con: Control; ISO: isoprenaline; Ver: verapamil; Car: carvedilol; HD: 150 mg/kg *Cu. EtOH*.

**3.5.10.3. Analiza căilor metabolice.** MetaboAnalyst a fost utilizat pentru a analiza metabolii serici și cardiaci pentru a găsi îmbogățirea căilor și căile metabolice asociate cu infarctul miocardic. Un total de 46 de căi metabolice au fost identificate în ser și 38 în țesuturile cardiace (Fig. 11). Principalele căi metabolice modificate pentru metabolii serici au fost metabolismul nicotinatului și nicotinamidei, metabolismul histidinei, metabolismul alaninei, aspartatului și glutamatului, metabolismul glutatationului, metabolismul purinelor, metabolismul selenocompușilor, taurina și metabolismul hipotaurinei, biosinteza argininei, metabolismul D-glutaminei și D-glutamatului, metabolismul triptofanului, metabolismul argininei și prolinei, biosinteza aminoacil-tRNA, biosinteza valinei, leucinei și izoleucinei, degradarea lizinei, metabolismul glioxilatului și dicarboxilatului, degradarea valinei, leucinei și izoleucinei, metabolismul glicinei, serinei și treoninei, sinteza și degradarea corpurilor cetonice și metabolismul pirimidinei.

Căile metabolice pentru metabolii cardiaci au fost sinteza și degradarea corpurilor cetonice, metabolismul butanoatului, metabolismul glioxilatului și dicarboxilatului, metabolismul purinelor, metabolismul taurinei și hipotaurinei, metabolismul sfingolipidelor, degradarea lizinei, metabolismul biotinei, biosinteza fenilalaninei, tirozinei și triptofanului, metabolismul cisteinei și metioninei, metabolismul piruvatului, metabolismul pirimidinei, metabolismul glicinei, serinei și treoninei, biosinteza valinei, leucinei și izoleucinei, biosinteza aminoacil-tRNA, metabolismul triptofanului, metabolismul beta-alaninei, metabolismul D-glutaminei și D-glutamatului, glicoliza/gluconeogeneza, metabolismul tirozinei, biosinteza argininei, metabolismul alaninei, aspartatului și glutamatului și metabolismul histidinei; perturbarea acestor căi a indus infarctul miocardic la animale. Fig. 11 a ilustrat că grupul ISO a avut căi metabolice puternic modificate, cu o concentrație mai mare de metaboliți decât controlul, dar verapamilul și Cu.EtOH (150 mg/kg) au reglat concentrația metaboliților și au avut o modificare minoră a căilor metabolice pentru a trata leziunea miocardică. Căile metabolice menționate mai sus sunt implicate în principal în metabolismul energetic, al stresului oxidativ și al aminoacizilor. În special, căile metabolismului aminoacizilor și energiei au fost semnificativ îmbogățite în grupul ISO și inversate cu tratamentul Cu.EtOH (150 mg/kg) și verapamil, în special metabolismul BCAA, glutaminei și glutamatului, corpurilor cetonice și degradarea aminoacizilor. Astfel, analiza căilor metabolice a ilustrat mecanismul cardioprotector al Cu.EtOH (150 mg/kg).

**3.5.10.4. Analiza de corelație și Heatmap a metaboliților.** Analiza heatmap și abordările de corelație au fost utilizate pentru a restrânge semnificația Cu.EtOH și predictibilitatea exactă a eficacității între grupurile ISO și cele tratate. În primul rând, analiza de corelație heatmap bazată pe coeficientul Pearson-correlation a fost utilizată pentru a recunoaște relația dintre metaboliții modificați. Corelația pozitivă și negativă a fost prezentată în roșu și respectiv verde (Fig. 12).

Analiza heatmap de clustering ierarhic a fost utilizată pentru a determina intensitățile normalizate ale metaboliților endogeni în ISO, control, Cu.EtOH (150 mg/kg), verapamil și carvedilol (Fig. 13). Roșu a reprezentat creșterea metaboliților serici, în timp ce albastru a reprezentat scăderea. Rezultatele indică faptul că tendința metaboliților în grupurile de tratament a fost departe de metaboliții grupului ISO, dar aproape de grupul de control. În plus, aceste rezultate au demonstrat că Cu.EtOH a inversat cu succes și a schimbat tendințele metaboliților similar cu verapamilul și carvedilolul.



**Fig. 11.** Summary of metabolic pathways analysis. Metabolic Pathway analysis of ISO, verapamil, and *Cu.EtOH* in **A.** serum and **B.** heart. The data were normalized with the control group. The size and color of each circle represented the significance (p-value) of metabolic pathway and pathway impact, respectively. The red indicated the higher p-value, and the yellow represented the lower p values.

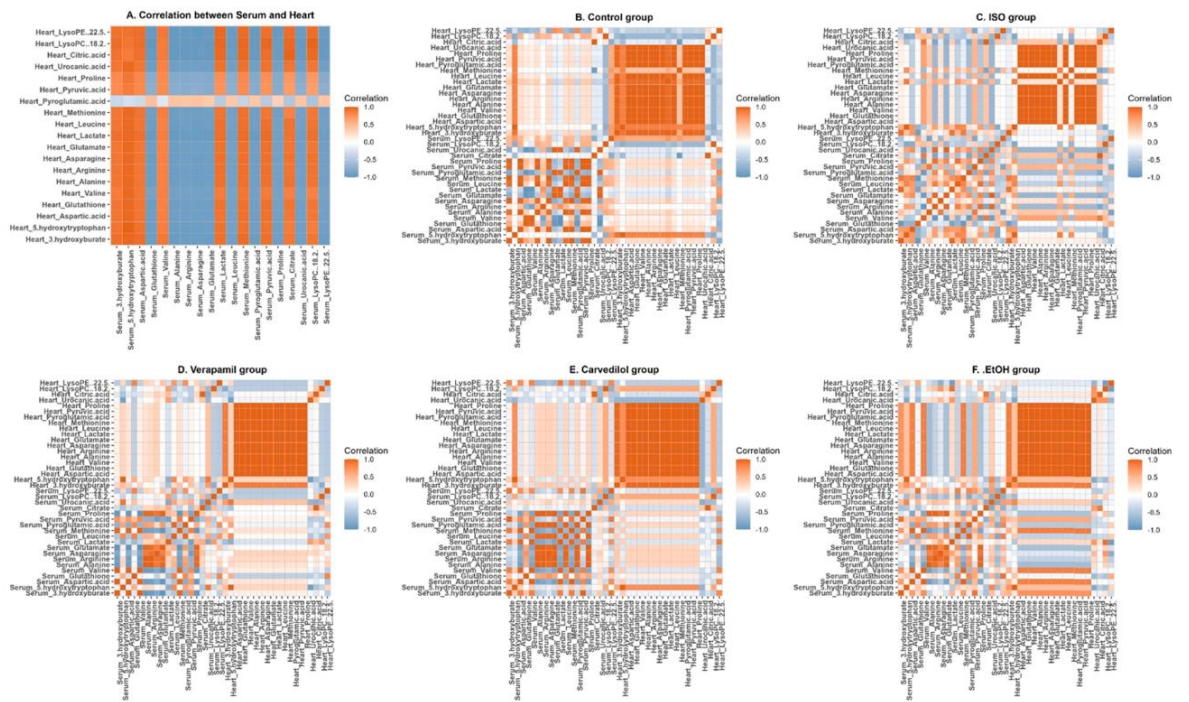
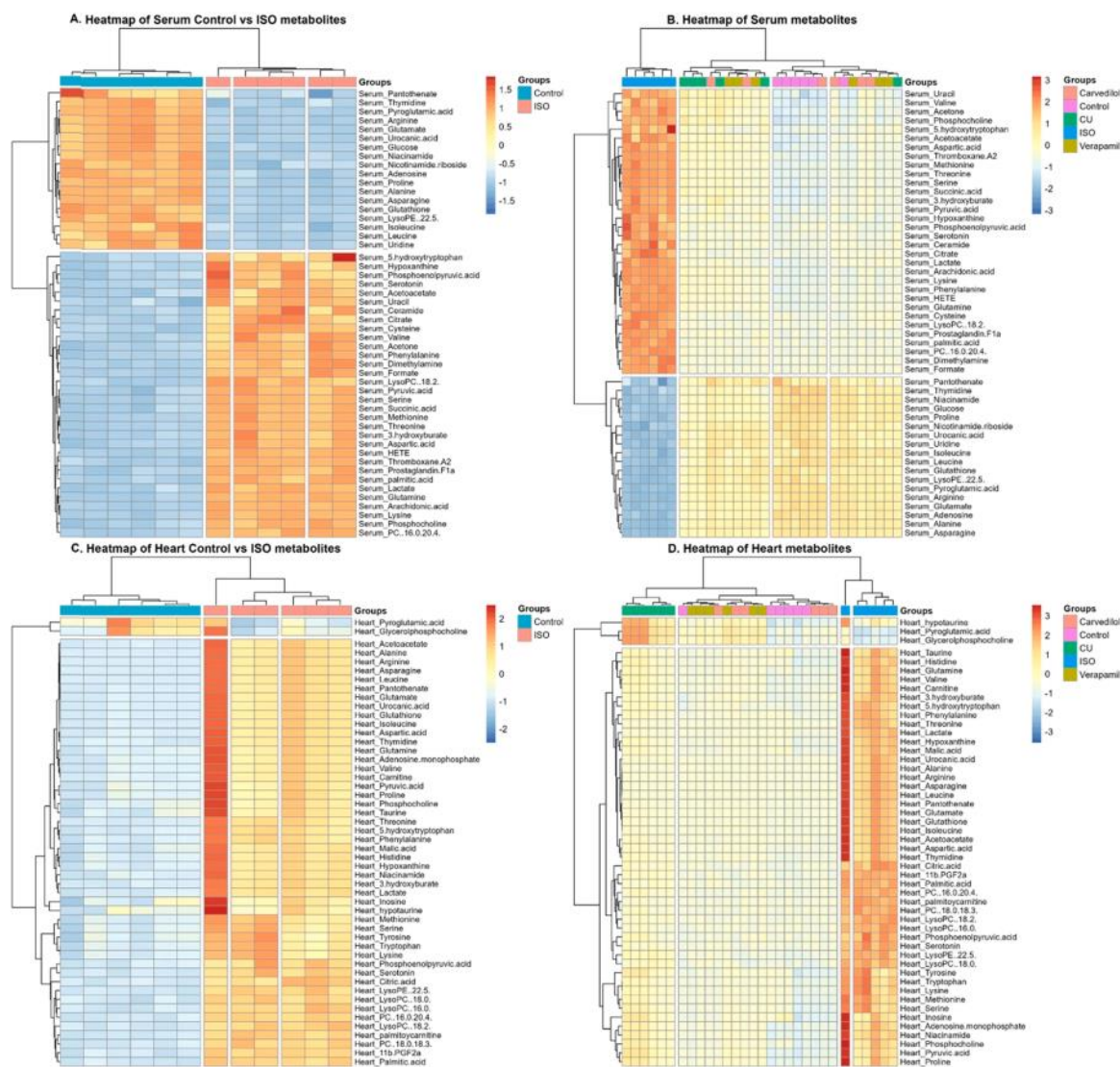


Fig. 12. Correlation Heatmap analysis of serum and heart metabolites varied significantly after ISO induced MI. A. Correlation between serum and heart metabolites. Correlation Heatmap analysis of serum and heart metabolites in B. Control group, C. ISO group, D. Verapamil group, E. Carvedilol group F. *Cu.EtOH* (150 mg/kg) group. S: Metabolites identified in the heart; H: Metabolites identified in the heart.



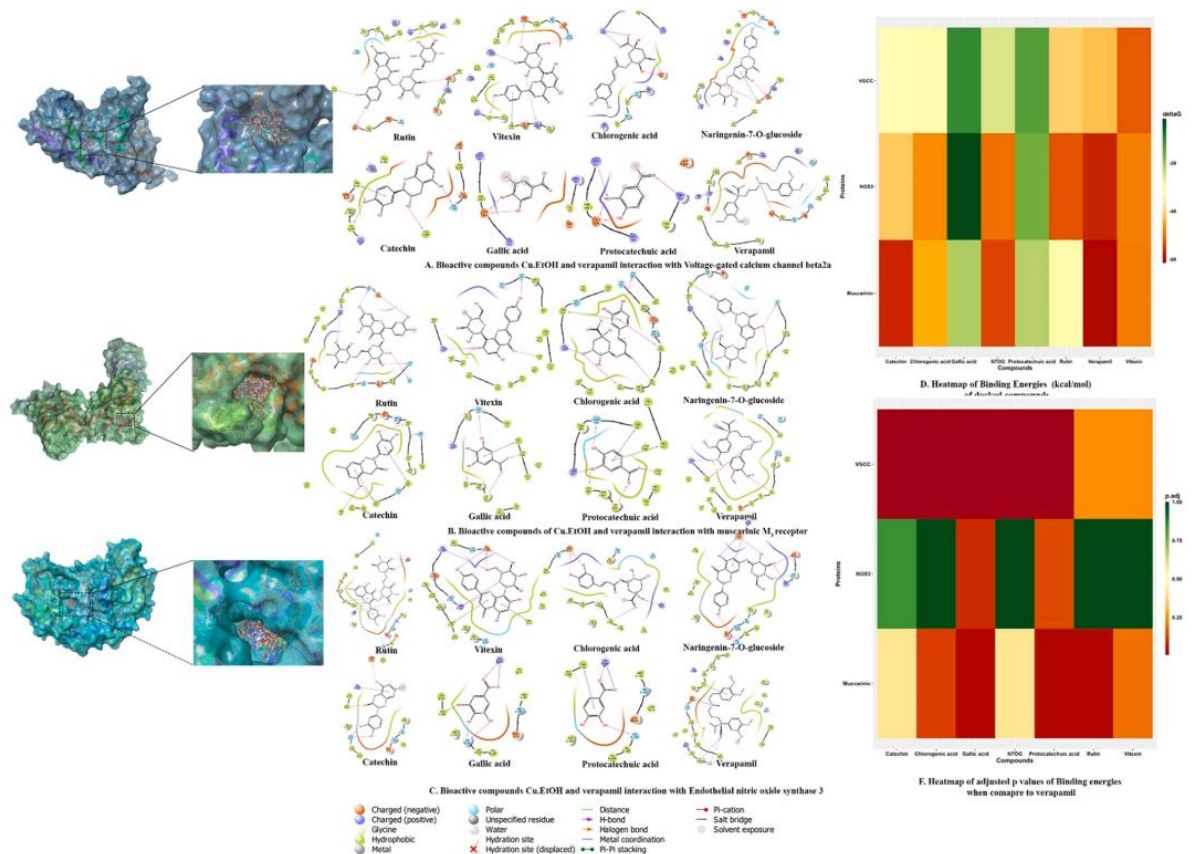


**Fig. 13.** The hierarchical clustering heatmap analysis for the alterations of metabolites after ISO induces MI. **A.** Hierarchical cluster heatmap of serum metabolites between control and ISO groups, **B.** Hierarchical cluster heatmap of serum metabolites between control, ISO, verapamil, carvedilol, and Cu.EtOH (150 mg/kg). **C.** Hierarchical cluster heatmap of heart metabolites between control and ISO groups, **D.** Hierarchical cluster heatmap of metabolites of heart between control, ISO, verapamil, carvedilol, and Cu.EtOH (150 mg/kg).

### 3.5.11. Andocare moleculară

Calculule de andocare sunt avantajoase pentru precizarea poziției ligandului în cadrul locului de legare al proteinei țintă. Implicarea termenilor de energii fizice (de exemplu, energia de solvatare) cu un câmp de forță adecvat face ca calculul andocării compușilor să fie mai acceptabil cu acuratețe [45,46]. Pentru a valida efectele benefice ale compușilor bioactivi din semințele de *C. sativus* (rutină, vitexină, acid clorogenic, catechină, naringenin-7-o-glucozidă, acid galic, acid protocatehuic și medicamentul standard verapamil), aceștia au fost andocați cu proteine țintă cu canal de calciu voltaj-dependent  $\beta_2a$  (VGCC, PDB:1T0J), receptor muscarinic 3 (PDB ID: 5ZHP) și oxid nitric sintază 3 (NOS3, PDB: 1M9R), care

au fost membri ai EDRF și căilor de semnalizare mediate de calciu (Fig. 6) [47]. Rutina, acidul clorogenic, naringenin-7-o-glucozidul și vitexina au fost prezise ca fiind compuși bioactivi proeminenți printre alții, care au avut cele mai mici energii de legare a ligandului cu contribuția energiilor Van der Waals ( $\Delta G_{vdW}$ ) și a interacțiunilor lipofile ( $\Delta G_{Lipo}$ ) pentru proteinele țintă. Catechina, acidul galic și acidul protocatehucic au arătat, de asemenea, afinități de legare notabile față de proteinele țintă ale aminoacizilor (AA), așa cum este reprezentat în Tabelul 3 și Fig. 14.



**Fig. 14.** Depicted the 2D protein-ligand interaction between bioactive compounds (catechin, chlorogenic acid, gallic acid, naringenin-7-o-glucoside, protocatechuic acid, rutin, and vitexin) and proteins; **A.** voltage-gated calcium channel  $\beta$ 2a (VGCC, PDB:1TOJ), **B.** muscarinic receptor 3 (PDB ID: 5ZHP), **C.** nitric oxide synthase 3 (NOS3, PDB: 1M9R). **D.** Heatmap of binding energies (kcal/mol), of bioactive compounds (rutin, quercetin, scopoletin, and kaempferol) and proteins. **E.** Heatmap of p-adjusted values of binding energies when compared to verapamil. ( $p < 0.05$  vs verapamil). N7OG: Naringenin-7-O-glucoside.

**Table 3**  
Binding energies (kcal/mol) of compounds with Voltage-gated calcium channel beta2a, muscarinic receptor 3, and nitric oxide synthase 3 calculated by Prime MMGBSA.

Name	Docking score	$\Delta G_{\text{binding}}$	$\text{Log } K_i$ ( $\mu\text{Molar}$ )	$\Delta G_{\text{Coulomb}}$	$\Delta G_{\text{Covalent}}$	$\Delta G_{\text{Hbond}}$	$\Delta G_{\text{Lipophilic}}$	$\Delta G_{\text{Solv}}$ GB	$\Delta G_{\text{vdw}}$	Residue-Ligand Interactions with Distance (Å)	Electrostatic / Hydrophobic Bonds
Voltage-gated calcium channel beta2a (PDB: 1TUJ)											
Hydrogen Bonds											
Electrostatic / Hydrophobic Bonds											
Rutin	-8.089	-37.56	-13.08	-34.83	10.08	-3.82	-9.25	47.21	-45.58	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Asp91 (1.98), Val109 (1.89), Val109 (2.60), Pro336 (2.11), Tyr402 (1.97), Asp384 (2.63), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Val109 (2.61), Lys90 (2.47), Asp91 (2.51), <b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Arg65 (2.17), Arg227 (3.01), Lys90 (1.96), Asp384 (2.01), Gln380 (1.85), Phe383 (2.98), Val109 (1.69), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Arg65 (2.38), Asp384 (2.70), Gln380 (2.96), Glu381 (2.46), Asp384 (2.64)	<b>Electrostatic <math>\pi</math>-Anion:</b> Asp384 (4.24)
Vitexin	-6.542	-48.43	-17.80	-40.91	5.46	-3.29	-9.9	40.04	-39.06	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Lys254 (2.25), Asp319 (1.88), Asp319 (2.16), Ile261 (3.06), <b><math>\pi</math>-Donor Hydrogen Bond:</b> Ile263 (3.31)	<b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> T-Shaped:</b> Phe92 (5.15), <b><math>\pi</math>-Alkyl:</b> Lys90 (4.63)
Chlorogenic acid	-6.503	-27.48	-8.71	1.34	1.38	-3.44	-9.87	14.47	-30.45	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Lys254 (2.25), Asp319 (1.88), Asp319 (2.16), Ile261 (3.06), <b><math>\pi</math>-Donor Hydrogen Bond:</b> Ile263 (3.31)	<b>Electrostatic Attractive Charge:</b> Lys254 (3.40) <b><math>\pi</math>-Alkyl:</b> Ile263 (4.46)
Catechin	-4.878	-28.32	-9.07	-21.72	8.07	-2.6	-10.41	26.29	-26.91	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Phe92 (2.41), Tyr402 (2.09), Gln380 (1.66), Phe383 (2.82), Asp91 (2.97), Val109 (1.71), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Asp384 (2.49)	<b>Electrostatic <math>\pi</math>-Anion:</b> Asp384 (3.57), <b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> T-Shaped:</b> Phe92 (5.06)
Naringenin-7-O-glucoside	-4.047	-23.3	-6.89	-20.03	10.15	-2.05	-7.67	36.17	-38.67	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Phe92 (2.27), Val109 (2.84), Asp91 (2.49), Ser382 (1.84), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Asp91 (2.59), Val109 (2.42), Val109 (2.49)	
Gallic acid	-3.26	-9.38	-0.84	1.03	-0.09	-2.42	-2.95	8.02	-12.95	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> ASP251 (1.86), ASP251 (1.75)	
Protocatechuic acid	-2.809	-12.11	-2.03	2.31	-0.03	-3.05	-4.45	6	-12.38	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Lys247 (2.07), Arg265 (2.48), Asp251 (1.99), Asp251 (1.91)	<b>Salt Bridge; Electrostatic Attractive Charge:</b> Arg265 (2.91) <b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> Stacked:</b> Phe250 (5.54)
Verapamil	-2.518	-44.45	-16.08	-19.55	3.75	-1.21	-14.26	29.51	-41.79	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Arg227 (2.65) <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Tyr402 (2.72), Asp384 (2.54), Tyr402 (2.69), Glu111 (2.61), Ser330 (2.75), Pro336 (2.49), Glu381 (2.67), Ser382 (2.43)	<b>Electrostatic Attractive Charge:</b> Asp384 (4.51) <b>Electrostatic <math>\pi</math>-Cation:</b> Arg227 (4.00) <b>Electrostatic <math>\pi</math>-Anion:</b> Asp384 (3.66) <b>Alkyl:</b> Ala335 (4.32), Ala405 (3.99), Lys110 (4.24), Pro326 (5.46), Ile338 (4.46) <b><math>\pi</math>-Alkyl:</b> Phe92 (5.37), Lys110 (5.11), Ala409 (4.44)
<b>Muscarinic receptor 3 (PDB ID: 5ZHP)</b>											
Chlorogenic acid	-10.905	-41.34	-14.72	-54.69	8.43	-3.49	-18.41	68.22	-40.1	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Ile222 (2.01), Tyr506 (2.88), Lys222 (2.35), Cys220 (2.55), Cys220 (1.92), Leu225 (1.67), Asn513 (1.63) <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Phe221 (2.92), Pro228 (2.73), Pro228 (2.59), Thr231 (2.88), Cys220 (2.98), <b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Leu225 (2.66), Asn513 (1.78), Cys220 (2.71), Ser518 (1.81), Asp517	<b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> Stacked:</b> Phe221 (4.37), Pro228 (4.77)

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Name	Docking score	$\Delta G_{\text{binding}}$	$\text{Log } K_i$ ( $\mu\text{Molar}$ )	$\Delta G_{\text{Coulomb}}$	$\Delta G_{\text{Covalent}}$	$\Delta G_{\text{Hbond}}$	$\Delta G_{\text{Lipophilic}}$	$\Delta G_{\text{Solv}}$ GB	$\Delta G_{\text{vdw}}$	Residue-Ligand Interactions with Distance (Å)	Electrostatic / Hydrophobic Bonds
Hydrogen Bonds											
Electrostatic / Hydrophobic Bonds											
Catechin	-8.096	-52.43	-19.54	-35.62	8.18	-2.48	-16.16	27.1	-30.05	(1.86), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Pro228 (2.35), Trp525 (2.64), Leu225 (2.41), <b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Tyr148 (2.32), Tyr529 (2.38), Leu225 (1.70), Asn513 (1.62), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Pro228 (2.71), Pro228 (2.52), Thr231 (2.84), <b><math>\pi</math>-Donor Hydrogen Bond:</b> Tyr506 (3.02), <b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Tyr148 (1.88), Lys222 (2.06), Cys220 (2.32), Asn513 (1.71), <b><math>\pi</math>-Donor Hydrogen Bond:</b> Phe221 (2.73), Trp525 (2.52)	<b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> Stacked:</b> Tyr529 (4.29), <b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> T-Shaped:</b> Tyr506 (5.74)
Vitexin	-7.965	-45.42	-16.50	-36.9	7.14	-2.3	-10.29	31.77	-32.7	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Tyr148 (2.89), Cys220 (1.84), Asn526 (2.38), Asn526 (1.70), Leu225 (2.47), Thr231 (2.44), Ile520 (1.76), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Trp525 (2.82)	<b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> T-Shaped:</b> Trp525 (4.90)
Naringenin-7-O-glucoside	-7.793	-50.26	-18.60	-27.77	10.37	-3.64	-15.72	28.65	-38.53	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Tyr148 (1.87), Ile222 (2.66), Cys220 (1.67), Asn526 (2.31), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Phe221 (2.59)	
Gallic acid	-6.598	-19.63	-5.30	-39.36	1.65	-2.69	-10.44	49.65	-16.14	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Tyr148 (1.75), Ile222 (2.51), Lys222 (2.24), Lys222 (2.45), Lys222 (2.58), Cys220 (1.80), Asn526 (1.90), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Phe221 (2.47), Lys222 (2.98)	<b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> T-Shaped:</b> Tyr529 (4.88)
Protocatechuic acid	-6.565	-19.99	-5.45	-45.25	0.97	-3.19	-10.04	54.46	-15.3	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Ile222 (2.45), Lys222 (2.03), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> Phe221 (2.73), Lys222 (2.42), Asn513 (3.04), Glu219 (2.69), Glu219 (2.63), Cys220 (3.03), Cys220 (2.66), Ile222 (2.53)	<b>Electrostatic <math>\pi</math>-Cation:</b> Trp525 (4.66), Trp525 (4.11), <b><math>\pi</math>-Donor Hydrogen Bond:</b> Tyr506 (2.95), <b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> Stacked:</b> Phe221 (4.95), Tyr529 (5.24), <b>Alkyl:</b> Ile222 (4.67), Leu225 (4.88), Leu144 (4.82), <b><math>\pi</math>-Alkyl:</b> Tyr127 (4.92), Trp143 (4.55), Phe221 (4.41), Tyr529 (5.05)
Verapamil	-2.264	-61.39	-23.43	2.45	4.92	-1.22	-27.11	2.8	-41.13	<b>Conventional Hydrogen Bond:</b> Arg365 (2.39), Glu361 (1.88), Glu361 (2.17), Val449 (1.74), Ser102 (1.77), <b>Carbon Hydrogen Bond:</b> His461 (2.58), Pro451 (2.40)	<b>Electrostatic <math>\pi</math>-Cation:</b> Arg365 (3.23), Arg365 (3.78), <b><math>\pi</math>-<math>\pi</math> Stacked:</b> Trp445 (5.10), Trp445 (5.03), Phe460 (5.21), Trp447 (3.59), Trp447 (4.53), Trp447 (5.33), Trp447 (4.68), Trp447 (4.39), <b>Alkyl:</b> Val336 (4.38), Met339 (5.43), <b><math>\pi</math>-Alkyl:</b> Pro451 (5.18), Val104 (5.38), Ala446 (5.43)

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Name	Docking score	$\Delta G_{\text{Binding}}$	Log $K_i$ ( $\mu\text{Molar}$ )	$\Delta G_{\text{Coulomb}}$	$\Delta G_{\text{Covalent}}$	$\Delta G_{\text{Hydrob}}$	$\Delta G_{\text{Lipophilic}}$	$\Delta G_{\text{Solv}}$	$\Delta G_{\text{vdW}}$	Residue-Ligand Interactions with Distance (Å)	
										Hydrogen Bonds	Electrostatic / Hydrophobic Bonds
Naringenin-7-O-glucoside	-9.102	-46.35	-16.90	-30.41	8.8	-4.75	-18.19	52.35	-46.82	Conventional Hydrogen Bond: Glu361 (2.21), Glu361 (1.96), Ser102 (1.69),	Electrostatic $\pi$ -Cation: Arg365 (2.94), $\pi$ - $\pi$ Stacked: Trp445 (5.09), Trp445 (5.06), Trp447 (4.47), Trp447 (5.40), Trp447 (4.43), $\pi$ -Alkyl: Val104 (5.33), Ala446 (5.48)
Catechin	-8.802	-38.23	-13.37	-25.68	2.1	-3.16	-22.17	47.13	-29.69	Conventional Hydrogen Bond: Ser102 (1.72), Ser102 (1.81)	Electrostatic $\pi$ -Cation: Arg365 (3.15) $\pi$ - $\pi$ Stacked: Trp445 (5.31), Trp445 (5.33), Trp447 (4.45), Trp447 (5.44), Trp447 (4.49), $\pi$ -Alkyl: Trp447 (3.70), Trp447 (4.93), Val104 (5.10)
Vitexin	-8.058	-45	-16.31	-28.66	5.81	-4.34	-11.29	51.28	-47.14	Conventional Hydrogen Bond: Arg365 (2.12), Arg365 (1.99), Arg365 (2.60), Arg372 (2.67), Glu361 (2.01), Glu361 (2.01), Phe460 (2.52), Glu361 (2.77), Carbon Hydrogen Bond: Glu361 (2.77), $\pi$ -Donor Hydrogen Bond: Trp74 (3.22),	Electrostatic $\pi$ -Cation: Arg365 (3.78), Arg365 (4.67), Arg365 (4.30), $\pi$ - $\pi$ Stacked: Phe460 (4.70), Trp447 (4.13), Trp447 (5.52), Trp447 (4.85), Trp447 (4.45), Trp447 (5.44), $\pi$ - $\pi$ T-Shaped: Trp74 (5.47), $\pi$ -Alkyl: Val104 (4.58), Pro451 (4.94)
Gallic acid	-7.788	-1.8	2.45	-35.42	2.04	-3.62	-13.41	78.48	-25.1	Conventional Hydrogen Bond: Arg365 (1.95), Arg365 (2.17), Ser102 (1.76), Ala446 (2.41), Ser102 (2.24),	Electrostatic Attractive Charge: Arg365 (3.35), $\pi$ - $\pi$ Stacked: Trp447 (5.26), Trp447 (4.43), $\pi$ -Alkyl: Val104 (5.13)
Protocatechuic acid	-7.522	-14.56	-3.09	-38.28	3.89	-2.89	-14.1	66.62	-24.06	Conventional Hydrogen Bond: Arg365 (1.81), Ser102 (1.85),	Salt Bridge/Attractive Charge: Arg365 (2.32), $\pi$ - $\pi$ Stacked: Trp447 (4.89), Trp447 (4.08), $\pi$ -Alkyl: Val104 (5.38), Ala446 (5.29)
Chlorogenic acid	-2.971	-44.33	-16.02	-58.86	7.02	-4.78	-22.38	76.23	-39.11	Conventional Hydrogen Bond: Arg365 (1.81), Ser102 (1.85),	Salt Bridge/Attractive Charge: Arg365 (2.32), $\pi$ - $\pi$ Stacked: Trp447 (4.89), Trp447 (4.08), $\pi$ -Alkyl: Val104 (5.38), Ala446 (5.29)
Verapamil	-3.988	-56.84	-21.46	34.01	2.66	-0.88	-32.07	0.19	-55.17	Carbon Hydrogen Bond: Trp447 (2.39), Trp447 (2.58), Trp447 (2.58), Val449 (2.69), Glu361 (2.86), Glu361 (2.67), Ser102 (3.00), Phe460 (2.70),	Electrostatic Attractive Charge: Glu361 (4.20), Electrostatic $\pi$ -Cation: Arg365 (4.74), Electrostatic $\pi$ -Anion: Glu361 (3.52), $\pi$ - $\pi$ Stacked: Phe460 (4.90), Trp447 (4.04), Trp447 (4.33), Alkyl: Val104 (5.02), $\pi$ -Alkyl: Trp74 (4.73), Trp445 (4.32), Trp445 (4.37), Trp447 (5.22), Trp447 (4.02)

$\Delta G_{\text{Binding}}$ : Binding free energy, Log  $K_i$ : Logarithmic of Inhibition Constant (K),  $\Delta G_{\text{Coulomb}}$ : Coulomb binding energy,  $\Delta G_{\text{Covalent}}$ : Covalent binding energy  $\Delta G_{\text{Hydrob}}$ : Hydrogen bonding energy,  $\Delta G_{\text{Lipophilic}}$ : Lipophilic binding energy,  $\Delta G_{\text{Solv}}$ : Generalized born electrostatic solvation energy  $\Delta G_{\text{vdW}}$ : Van der Waals forces energy. These all energy contribute to Binding free energy ( $\Delta G_{\text{Binding}}$ ).

**3.5.11.1. Canal de calciu voltaj-dependent  $\beta 2a$ .** Rutina a obținut primul loc pentru canalele de calciu voltaj-dependente în scorul de andocare, cu energii de legare ( $\Delta G_{\text{Binding}}$ ) de -37,56 kcal/mol. A format interacțiuni de legături de hidrogen cu reziduurile de aminoacizi Asp91 (1,98 Å), Val109 (1,89 Å), Val109 (2,60 Å), Pro336 (2,11 Å), Tyr402 (1,97 Å) și Asp384 (2,63 Å), interacțiuni de legături carbon-hidrogen cu reziduurile de aminoacizi Val109 (2,61 Å), Lys90 (2,47 Å) și Asp91 (2,51 Å) și legătură electrostatică  $\pi$ -Anion cu reziduul AA Asp384 (4,24 Å). Vitexina a avut energii de legare dominante pentru canalele de calciu voltaj-dependente ( $\Delta G_{\text{Binding}}$ : -48,43 kcal/mol) și a obținut al doilea loc în scorul de andocare. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Arg65 (2,17 Å), Arg227 (3,01 Å), Lys90 (1,96 Å), Asp384 (2,01 Å), Gln380 (1,85 Å), Phe383 (2,98 Å) și Val109 (1,69 Å), legături carbon-hidrogen cu reziduurile AA Arg65 (2,38 Å), Asp384 (2,70 Å), Gln380 (2,96 Å), Glu381 (2,46 Å) și Asp384 (2,64 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  în formă de T cu reziduul AA Phe92 (5,15 Å) și legătură  $\pi$ -Alkil cu reziduul AA Lys90 (4,63 Å). Acidul clorogenic a obținut al treilea loc pentru VGCC cu o afinitate de legare de -27,48 kcal/mol. A avut legături de hidrogen cu reziduurile AA Lys254 (2,25 Å), Asp319 (1,88 Å), Asp319 (2,16



Å) și Ile261 (3,06 Å), legătură  $\pi$ -donor hidrogen cu reziduul AA Ile263 (3,31 Å), legătură electrostatică de sarcină atractivă cu reziduul AA Lys254 (3,40 Å) și legătură  $\pi$ -alchil cu reziduul AA Ile263 (4,46 Å). Ordinea de clasificare a liganzilor cu VGCC pe baza scorului de andocare este: rutină, vitexină, acid clorogenic, catechină, naringenin-7-o-glucozidă, acid galic și acid protocatehuic.

Verapamilul are energii de legare dominante pentru VGCC de -44,45 kcal/mol. A format legături de hidrogen cu reziduul AA Arg227 (2,65 Å), legături carbon-hidrogen cu reziduurile AA Tyr402 (2,72 Å), Asp384 (2,54 Å), Tyr402 (2,69 Å), Glu111 (2,61 Å), Ser330 (2,75 Å), Pro336 (2,49 Å), Glu381 (2,67 Å) și Ser382 (2,43 Å), legătură electrostatică de sarcină atractivă cu reziduul AA Asp384 (4,51 Å), legătură electrostatică  $\pi$ -cation cu reziduul AA Arg227 (4,00 Å), legătură electrostatică  $\pi$ -anion cu reziduul AA Asp384 (3,66 Å), legătură alchil cu reziduurile AA Ala335 (4,32 Å), Ala405 (3,99 Å), Lys110 (4,24 Å), Pro326 (5,46 Å) și Ile338 (4,46 Å), legătură  $\pi$ -alchil cu reziduurile AA Phe92 (5,37 Å), Lys110 (5,11 Å) și Ala409 (4,44 Å).

**3.5.11.2. Receptor muscarinic 3.** Catechina a avut energii de legare dominante  $\Delta G_{\text{Binding}}$  - 52,43 kcal/mol pentru receptorul muscarinic 3. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Tyr148 (2,32 Å), Tyr529 (2,38 Å), Leu225 (1,70 Å) și Asn513 (1,62 Å), legături carbon-hidrogen cu reziduurile AA Pro228 (2,71 Å), Pro228 (2,52 Å) și Thr231 (2,84 Å), legătură  $\pi$ -donor hidrogen cu reziduul AA Tyr506 (3,02 Å), legătură  $\pi$ - $\sigma$  cu reziduul AA Thr231 (2,58 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  Stacked cu reziduul AA Tyr529 (4,29 Å) și legătură  $\pi$ - $\pi$  în formă de T cu reziduul AA Tyr506 (5,74 Å). Acidul clorogenic a obținut un scor de -41,34 kcal/mol afinitate de legare pentru receptorul M3 și s-a clasat pe primul loc în scorul de andocare. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Ile222 (2,01 Å), Tyr506 (2,88 Å), Lys522 (2,35 Å), Cys220 (2,55 Å), Cys220 (1,92 Å), Leu225 (1,67 Å) și Asn513 (1,63 Å), legături carbon-hidrogen cu reziduurile AA Phe221 (2,92 Å), Pro228 (2,73 Å), Pro228 (2,59 Å), Thr231 (2,88 Å) și Cys220 (2,98 Å), legătură  $\pi$ - $\sigma$  cu reziduul AA Thr231 (2,66 Å) și legătură  $\pi$ -Alkil cu reziduul AA Tyr529 (4,55 Å). Rutina s-a clasat pe locul al doilea pentru receptorul M3 cu -39,98 kcal/mol. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Leu225 (2,66 Å), Asn513 (1,78 Å), Cys220 (2,71 Å), Ser518 (1,81 Å) și Asp517 (1,86 Å), legături carbon-hidrogen cu reziduurile AA Pro228 (2,35 Å), Trp525 (2,64 Å) și Leu225 (2,41 Å), legătură  $\pi$ -alchil cu reziduurile AA Phe221 (4,37 Å) și Pro228 (4,77 Å). Vitexina s-a clasat pe locul al patrulea pentru receptorul M3 cu o afinitate de legare de -45,42 kcal/mol. A avut legături de hidrogen cu

reziduurile AA Tyr148 (1,88 Å), Lys522 (2,06 Å), Cys220 (2,32 Å) și Asn513 (1,71 Å), legătură  $\pi$ -donor hidrogen cu reziduurile AA Phe221 (2,73 Å) și Trp525 (2,52 Å) și legătură  $\pi$ - $\pi$  în formă de T cu reziduul AA Trp525 (4,90 Å). Ordinea de clasificare a liganzilor cu receptorul muscarinic pe baza scorului de andocare este: acid clorogenic, rutină, catechină, vitexină, naringenin-7-o-glucozidă, acid galic și acid protocatehuic.

Verapamilul a avut energii de legare dominante pentru receptorul M3 de -61,39 kcal/mol. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Ile222 (2,45 Å) și Lys522 (2,03 Å), legături carbon-hidrogen cu reziduurile AA Phe221 (2,73 Å), Lys522 (2,42 Å), Asn513 (3,04 Å), Glu219 (2,69 Å), Glu219 (2,63 Å), Cys220 (3,03 Å), Cys220 (2,66 Å) și Ile222 (2,53 Å), legătură electrostatică  $\pi$ -cation cu reziduurile AA Trp525 (4,66 Å) și Trp525 (4,11 Å), legătură  $\pi$ -donor hidrogen cu reziduul AA Tyr506 (2,95 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  stacked cu reziduurile AA Phe221 (4,95 Å) și Tyr529 (5,24 Å), legătură alchil cu reziduurile AA Ile222 (4,67 Å), Leu225 (4,88 Å) și Leu144 (4,82 Å), legătură  $\pi$ -alchil cu reziduurile AA Tyr127 (4,92 Å), Trp143 (4,55 Å), Phe221 (4,41 Å) și Tyr529 (5,05 Å).

**3.5.11.3. Oxid nitric sintază 3.** Rutina a atins cea mai mare energie de legare ( $\Delta G_{\text{Binding}}$  -49,01 kcal/mol) pentru NOS3. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Arg365 (2,39 Å), Glu361 (1,88 Å), Glu361 (2,17 Å), Val449 (1,74 Å) și Ser102 (1,77 Å), legături carbon-hidrogen cu reziduurile AA His461 (2,58 Å) și Pro451 (2,40 Å), legătură electrostatică  $\pi$ -cation cu reziduurile AA Arg365 (3,23 Å) și Arg365 (3,78 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  stacked cu reziduurile AA Trp445 (5,10 Å), Trp445 (5,03 Å), Phe460 (5,21 Å), Trp447 (3,59 Å), Trp447 (4,53 Å), Trp447 (5,33 Å), Trp447 (4,68 Å) și Trp447 (4,39 Å), legătură alchil cu reziduurile AA Val336 (4,38 Å) și Met339 (5,43 Å), legătură  $\pi$ -alchil cu reziduurile AA Pro451 (5,18 Å), Val104 (5,38 Å) și Ala446 (5,43 Å). Naringenin-7-O-glucozidul a avut o energie de afinitate de legare de -46,35 kcal/mol. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Glu361 (2,21 Å), Glu361 (1,96 Å) și Ser102 (1,69 Å), legătură electrostatică  $\pi$ -cation cu reziduul AA Arg365 (2,94 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  stacked cu reziduurile AA Trp445 (5,09 Å), Trp445 (5,06 Å), Trp447 (4,47 Å), Trp447 (5,40 Å) și Trp447 (4,43 Å), legătură  $\pi$ -alchil cu reziduurile AA Val104 (5,33 Å) și Ala446 (5,48 Å). Vitexina a obținut al treilea loc în energia de afinitate de legare cu -45 kcal/mol, dar s-a clasat pe locul patru în scorurile de andocare. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Arg365 (2,12 Å), Arg365 (1,99 Å), Arg365 (2,60 Å), Arg372 (2,67 Å), Glu361 (2,01 Å), Glu361 (2,01 Å), Phe460 (2,52 Å) și Glu361 (2,77 Å), legătură carbon-hidrogen

cu reziduul AA Glu361 (2,77 Å), legătură  $\pi$ -donor hidrogen cu reziduul AA Trp74 (3,22 Å), legătură electrostatică  $\pi$ -cation cu reziduurile AA Arg365 (3,78 Å), Arg365 (4,67 Å) și Arg365 (4,30 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  stacked cu reziduurile AA Phe460 (4,70 Å), Trp447 (4,13 Å), Trp447 (5,52 Å), Trp447 (4,85 Å), Trp447 (4,45 Å) și Trp447 (5,44 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  în formă de T cu reziduul AA Trp74 (5,47 Å), legătură  $\pi$ -alchil cu reziduurile AA Val104 (4,58 Å) și Pro451 (4,94 Å).

Acidul clorogenic a fost găsit cu o afinitate de legare de -44,33 kcal/mol, dar s-a clasat pe ultimul loc în scorul de andocare. A format legături de hidrogen cu reziduurile AA Arg365 (1,81 Å) și Ser102 (1,85 Å), legături de punte de sare/sarcină atractivă cu reziduul AA Arg365 (2,32 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  stacked cu reziduurile AA Trp447 (4,89 Å) și Trp447 (4,08 Å), legătură  $\pi$ -alchil cu reziduurile AA Val104 (5,38 Å) și Ala446 (5,29 Å). Ordinea de clasificare a liganzilor cu NOS3 pe baza scorului de andocare este: rutină, naringenin-7-o-glucozidă, catechină, vitexină, acid galic, acid protocatehuic, acid clorogenic.

Verapamilul a avut energii de legare dominante de -56,84 kcal/mol pentru NSO3. A format legături carbon-hidrogen cu reziduurile AA Trp447 (2,39 Å), Trp447 (2,58 Å), Trp447 (2,58 Å), Val449 (2,69 Å), Glu361 (2,86 Å), Glu361 (2,67 Å), Ser102 (3,00 Å) și Phe460 (2,70 Å), legătură electrostatică de sarcină atractivă cu reziduul AA Glu361 (4,20 Å), legătură electrostatică  $\pi$ -cation cu reziduul AA Arg365 (4,74 Å), legătură electrostatică  $\pi$ -anion cu reziduul AA Glu361 (3,52 Å), legătură  $\pi$ - $\pi$  stacked cu reziduurile AA Phe460 (4,90 Å), Trp447 (4,04 Å) și Trp447 (4,33 Å), legătură alchil cu reziduurile AA Val104 (5,02 Å), legătură  $\pi$ -alchil cu reziduurile AA Trp74 (4,73 Å), Trp445 (4,32 Å), Trp445 (4,37 Å), Trp447 (5,22 Å) și Trp447 (4,02 Å).

#### 4. Discuție

Din cele mai vechi timpuri, terapia pe bază de plante este recunoscută la nivel global ca o administrare terapeutică sigură și eficientă, ca medicină complementară sau ca parte a dietei, pentru tratarea unei game largi de afecțiuni cronice. Dacă un model alimentar conține un volum mai mare de legume, fructe și cereale, ingestia acestora joacă un rol crucial în prevenirea bolilor cronice datorită metaboliților secundari non-nutrienți (Dixit et al., 2010; Patel et al., 2017). Semințele și fructele de *C. sativus* au fost recunoscute ca remedii tradiționale și utilizate pentru a vindeca multiple afecțiuni

(Mariod et al., 2017) de etiologie diversă. Acest studiu a avut ca scop determinarea potențialelor valori terapeutice a semințelor de *C. sativus* în bolile cardiovasculare.

Screening-ul LC-ESI MS/MS al Cu.EtOH a relevat prezența polifenolilor, taninurilor, antrachinonelor, flavonelor și flavonoidelor. Principalii compuși bioactivi sunt acidul clorogenic, acidul galic, galactinolul, catechina, kaempferitrina, naringenin-7-o-glucozidul sau prunina, kaempferol-7-o-neohesperidozida, vitexina, acidul protocatehuic, acidul 3-p-cumaroilchinic, acidul 3-feruloil chinic, hesperidina, rutina (Gilani 2008).

Cu.EtOH a fost testat pentru posibila activitate vasodilatator atât pe preparate aortice izolate cu endoteliu intact, cât și pe cele cu endoteliu denudat. A prezentat un efect vasodilatator pe ambele preparate, cu o ușoară vasoconstricție pe preparatul denudat, dar ulterior a relaxat țesutul. În plus, a fost testat împotriva contracțiilor cauzate de PE (1 M) și K<sup>+</sup> (80 mM) și a arătat un răspuns relaxant la contracțiile provocate de PE (1 M) și K<sup>+</sup> (80 mM), similar cu verapamilul. PE stimulează receptorul  $\alpha$ 1-adrenergic, care, ca parte a sistemului nervos simpatic, reglează tonusul muscular neted vascular (Eschenhagen et al., 2018). Adrenoceptorii facilitează efectele stimulative în mușchiul neted vascular prin creșterea nivelurilor de Ca<sup>++</sup> citosolic, fie prin influx de calciu din fluidul extracelular, fie prin eliberarea din depozitele citosolice, pentru a evoca depolarizarea potențialului de acțiune în repaus al preparatelor vasculare.

Extractul Cu.EtOH din studiul nostru a suprimat contracțiile spastice induse de K<sup>+</sup> (80 mM) și K<sup>+</sup> (25 mM) la 3 mg/ml și, respectiv, 1 mg/ml pe preparatul aortic cu endoteliu intact, fie că intervine prin blocarea canalelor de calciu, fie prin deschiderea canalelor de potasiu. K<sup>+</sup> (80 mM) a indus depolarizarea cu un influx de curent de calciu în celulă, a crescut ionii de calciu citosolici, iar această acțiune extrem de depolarizată a membranei a cauzat potențial un răspuns contractil persistent de lungă durată în preparatele de jejun (Saqib et al., 2016). Odată ce a avut loc repolarizarea, mușchiul neted s-a putut relaxa. Constatările noastre au fost în concordanță cu literatura raportată anterior, următoarea secvență de evenimente (Sirous et al., 2019; Katzung et al., 2017) fiind inhibată, adică: 1) concentrația ionilor de Ca<sup>++</sup> citosolici a fost scăzută, 2) Complexul calciu-calmodulină nu s-a format din cauza absenței sau a cantității reduse de ioni de calciu citosolici care să se lege cu proteina de reglare protein kinaza C, 3) ca rezultat, activarea kinazei lanțului ușor de miozină (MLCK) nu a avut loc și a scăzut

fosforilarea lanțurilor ușoare de miozină (MLC) și 4) din cauza absenței fosforilării MLC-urilor, interacțiunea dintre actină și MLC nu a avut loc; ca rezultat, răspunsul contractil în țesut nu a fost produs (Fig. 15) (Saqib, Janbaz et al., 2020). Agenții care au relaxat contracțiile induse de  $K^+$  (25 mM) sunt considerați deschizători ai canalelor de  $K^+$ , dar blocantele canalelor de  $Ca^{++}$  au o tendință egală de a inhiba contracțiile induse de  $K^+$  (80 mM) și  $K^+$  (25 mM) (Saqib, Janbaz et al., 2020).

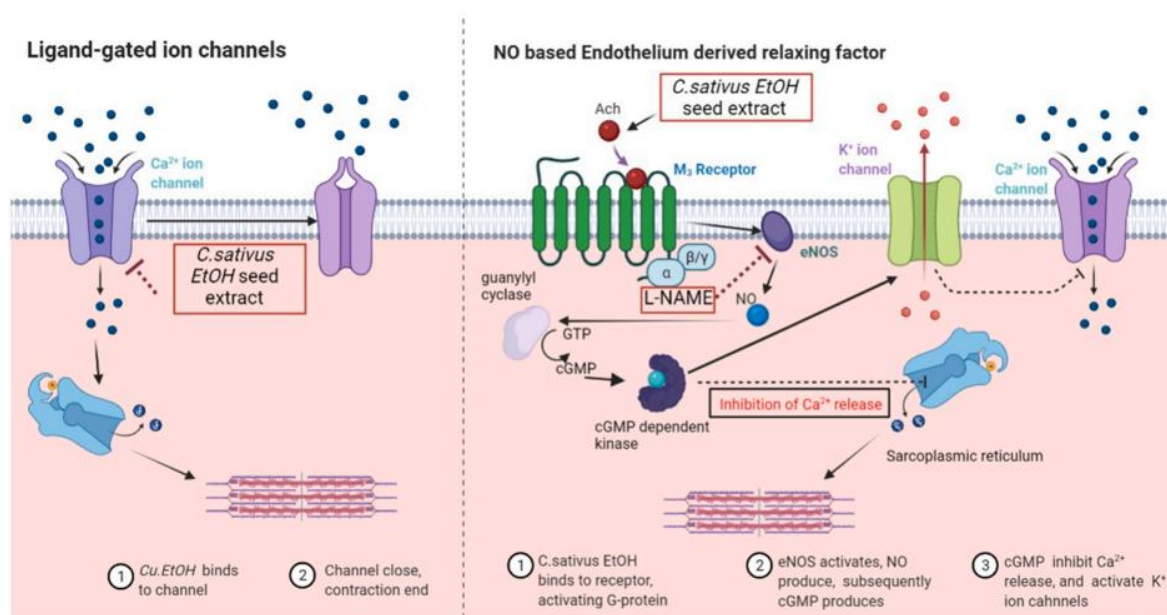


Fig. 15. Mechanistic insight of Cu.EtOH on L type voltage-gated calcium ion channel and NO based endothelium-derived relaxing factor.

În consecință, extractul Cu.EtOH și verapamilul au blocat complet contracțiile induse de  $K^+$  (80 mM) și  $K^+$  (25 mM) (Mehmood et al., 2014). Relaxarea contracțiilor provocate de PE și  $K^+$  (80 mM) demonstrează că canalele de  $Ca^{++}$  au fost blocate prin prevenirea influxului intracelular de  $Ca^{++}$ . Blocantele canalelor de  $Ca^{++}$  sunt medicamente esențiale utilizate clinic pentru a gestiona angina și hipertensiunea (Saqib, Janbaz et al., 2016). Datele din literatură descriu quercetina și rutina ca având activitate antispasmodică (Lanuzza et al., 2017) pe preparate izolate de jejun, trahee și aortă [54,55]. Rutina și quercetina scad tensiunea arterială la șobolani (Olaleye et al., 2014). Acidul galic a fost raportat că tratează hipertensiunea, calcificarea vasculară, stresul oxidativ și disfuncția cardiacă diabetică (Jin et al., 2017).

Așa cum am menționat mai sus, Cu.EtOH a relaxat, de asemenea, contracția spastică indusă de PE atât pe preparatele aortice izolate cu endoteliu intact, cât și pe cele cu endoteliu denudat. Cu toate acestea, în prezența atropinei și L-NAME (inhibitor al sintezei NO; permite cercetarea NO pentru a

induce calea de vasodilatație), nu a reușit să relaxeze contracțiile spastice induse de PE pe porțiunea aortică cu endoteliu intact. Prin urmare, oxidul nitric (NO), un vasodilatator derivat din endoteliu, poate fi eliberat și, ulterior, receptorii muscarinici localizați în endoteliul vascular sunt activați. NO activează guanilat ciclaza și produce cGMP din cGTP. Ulterior, concentrațiile intracelulare de cGMP cresc, ceea ce activează protein kinaza dependentă de cGMP, care intervine cu substratul kinazei asociat receptorului inozitol 1,4,5-trifosfat și cu fosfataza MLC pentru a scădea concentrația intracelulară de calciu și a scădea disponibilitatea MLC pentru actină și puntea transversală actină-MLC pentru vasoconstricție (Fig. 15) (Orme et al., 1942;Katzung et al., 2017).

Când Cu.EtOH a fost studiat pe atriul împerecheat de șobolan; a prezentat un efect inotrop negativ și cronotrop pozitiv, a diminuat forța de contracție și a crescut ritmul cardiac. Activarea electrică a miocitelor cardiace inițiază contracția mușchiului cardiac (cuplarea excitație-contracție, ECC). Explicația plauzibilă a constatărilor experimentale este că Cu.EtOH poate fi prezentat prin activitate colinergică sau blocarea adrenoceptorilor și a canalelor de ioni de calciu de tip L (Eschenhagen et al., 2018). În prezența atropinei, efectele inotrope negative și cronotrope pozitive au fost modificate, indicând implicarea activității receptorului muscarinic colinergic M2 și a activității de blocare a canalelor de calciu asupra miocitelor cardiace în acțiunea inotropă negativă, care au fost demonstrate anterior pe preparatul aortic în comparație cu verapamilul (Saqib, Janbaz et al., 2016).

Constatările experimentale ale Cu.EtOH pe preparatele aortice și preparatul de atriu l-au făcut un candidat viabil pentru potențiale efecte hipotensive asupra tensiunii arteriale normotensive a șobolanilor anesteziați. Cu.EtOH scade tensiunea arterială sistolică (SBP), tensiunea arterială diastolică (DBP) și tensiunea arterială medie (MABP) a șobolanilor anesteziați. Acești parametri au fost diminuați la pretratamentul cu atropină (1 mg/kg), susținând speculația implicării receptorilor M2 în țesuturile miocardice și prin vasodilatație generalizată datorită receptorilor M3 neinverși pe preparatele aortice. Activitatea de blocare a canalelor de calciu a Cu.EtOH, de asemenea, nu poate fi exclusă și poate juca un rol vital în acțiunea antihipertensivă a extractului. La șobolanii cu hipertensiune acută indusă de L-Name, L-NAME inhibă NO sintază și permite creșterea reglării hemodinamicii sistemice (Ajay et al., 2003; Nyadjeu et al., 2013). Administrarea intravenoasă a Cu.EtOH a inversat hipertensiunea indusă de L-NAME cu scăderea reglării hemodinamicii sistemice.

În acest studiu, efectul cardioprotector al Cu.EtOH a fost studiat în cazul infarctului miocardic cronic indus de ISO. Cu.EtOH a restabilit anomaliile induse de ISO și a protejat țesutul miocardic. Administrarea de ISO la șobolani a cauzat modificări semnificative de remodelare în indicii biometrici; greutatea inimii, greutatea LHV și alți parametri ai infarctului miocardic, de asemenea, s-a observat o creștere a nivelurilor parametrilor biochimici serici, cum ar fi CK, CK-MB, LDH, cTnT, cTnI, BNP, ANP, ALT, AST, ACE și profilul lipidic. Pretratamentul și co-administrarea Cu.EtOH au îmbunătățit tendințele acestor indici și le-au readus semnificativ ( $p$ -value $<0,05$ ) la normal, similar cu verapamilul și carvedilolul. Expresia genelor din țesuturile miocardice a arătat că Cu.EtOH ar putea atenua efectul de toxicitate indus de ISO. S-a observat că extractul EtOH crește rolul protector prin creșterea expresiei mRNA a eNOS3, care stimulează vasodilatația prin mecanismul EDRF (Fig. 15). În plus, proteinele inflamatorii IL-6 și MMP-9 și proteinele cardiace cTnT și ANP crescute în grupul ISO au fost semnificativ ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul ISO) inversate de extractul EtOH, verapamil și carvedilol. Matrix Metalloproteinaza 9 sau MMP-9 este o proteină care inițiază fibroza și indică degradarea matricei extracelulare. Expresia sa a fost crescută în grupul ISO din cauza autofagiei și necrozei în țesuturile miocardice, în timp ce extractul EtOH, verapamilul și carvedilolul au avut expresii mai scăzute ale MMP-9, ceea ce poate indica prezența protecției.

Analiza metabolomică a probelor de ser a fost efectuată pentru a determina modificările metaboliților endogeni între grupuri, în special cele tratate cu *C. sativus*. S-a constatat că extractul Cu.EtOH a inversat anomaliile induse de ISO în potențialii biomarkeri metabolici, iar modificările acestora sunt asociate cu efectul hipotensiv. Biomarkerii potențiali sunt legați de căi biologice precum metabolismul lipidelor, stresul oxidativ, metabolismul nicotinic și nicotinamidic, metabolismul energetic și metabolismul piruvatului (Fig. 16). Căile biologice menționate mai sus sunt asociate cu disfuncția endotelială vasculară sau cu diferite etiologii ale hipertensiunii.

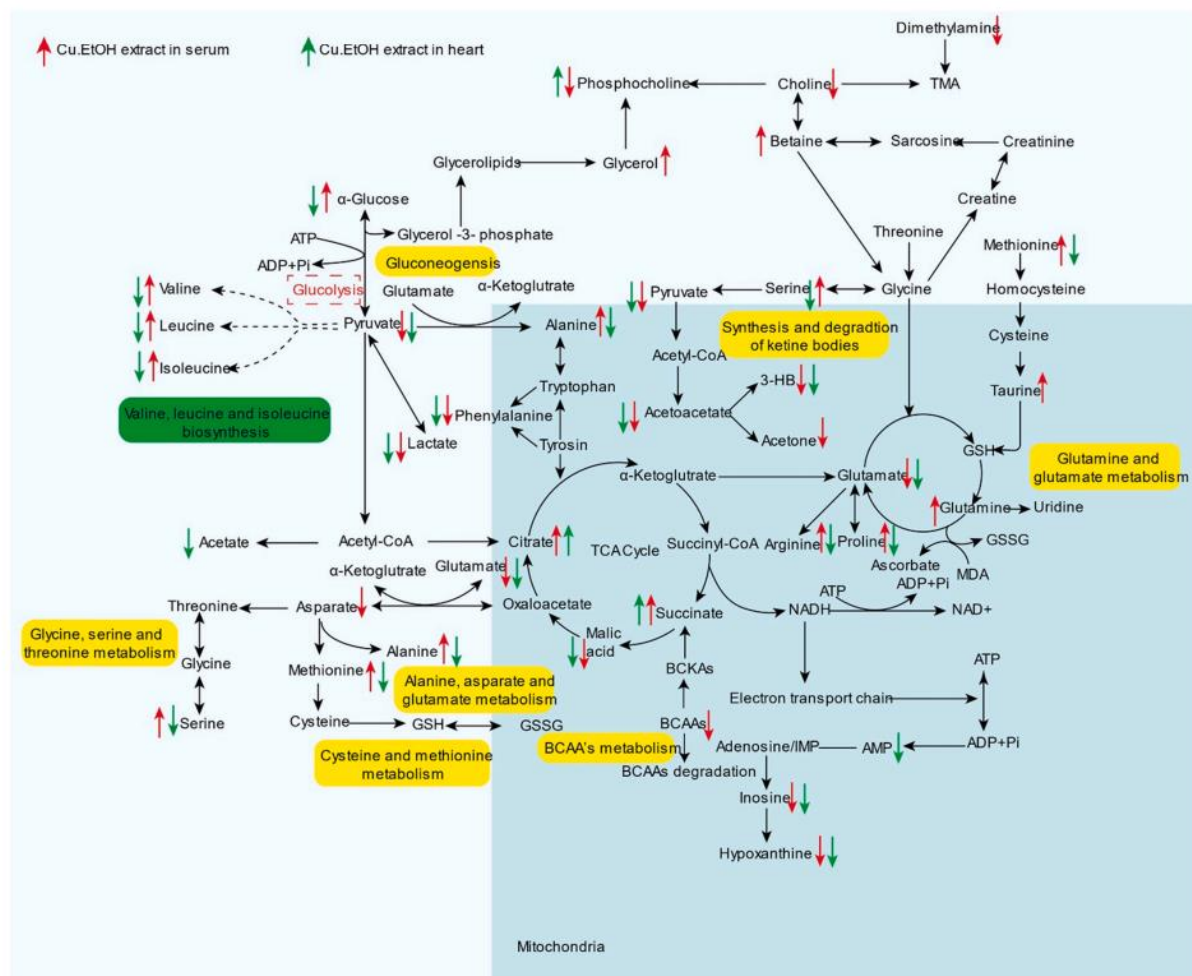


Fig. 16. Effect of *Cu.EtOH* on trends of metabolites in heart and serum samples after ISO induces MI.

De obicei, există o mare nevoie de energie în țesutul cardiac, dar cerințele sale energetice cresc considerabil în timpul infarctului miocardic din cauza utilizării ridicate a oxigenului și a adozin trifosfatului (ATP) (Li et al., 2014) și a perturbării raportului ATP/ADP miocardic. Mitocondriile cardiace utilizează o varietate de substraturi pentru a produce ATP, dintre care aproximativ 70–80% din ATP sunt derivate din oxidarea acizilor grași liberi, iar restul sunt derivate din carbohidrați, aminoacizi și corpi cetonici. Raportat anterior, ISO induce infarct miocardic caracterizat ca o biosinteză energetică cardiacă mai proastă, cu o acumulare de aminoacizi și acizi grași liberi (Luan et al., 2015). 3-hidroxiubutiratul, acetoacetatul și acetona sunt membri ai corpurilor cetonici derivați din oxidarea acizilor grași liberi și niveluri ridicate de acizi grași liberi în inimile cu infarct miocardic indus de ISO (Du et al., 2014). Biosinteza mitocondrială a corpurilor cetonici a crescut atunci când nivelurile de glucoză au scăzut în ser și în țesuturile miocardice în timpul ischemiei miocardice. În plus, ISO a crescut, de asemenea, semnificativ ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul de control) nivelurile de acid fumaric, cu scăderea nivelurilor



de acid succinic și acid citric în comparație cu grupul de control. Aceste rezultate indică anomalii în intermediarii ciclului Krebs în timpul ischemiei miocardice. Tendința descendentă a glucozei serice în timpul infarctului miocardic a arătat tendința crescătoare a glicolizei pentru a produce ATP în țesutul miocardic (Hunter et al., 2016; Wende et al., 2016). Piruvatul este un metabolit terminal al glicolizei utilizat în ciclul Krebs pentru producerea de energie. Piruvatul este transformat în lactat, iar acumularea de lactat duce la creșterea nivelurilor de alanină în țesutul miocardic (Wang et al., 2013). Nivelurile modificate de glucoză, piruvat, lactat și alanină indică afectarea oxidării glucozei și creșterea glicolizei. Luate împreună, toți acești metaboliți modificați reflectă un metabolism energetic modificat în țesutul miocardic ISO. Cu.EtOH a inversat semnificativ ( $p$ -value $<0,05$  față de grupul ISO) oxidarea acizilor grași liberi, a corpurilor cetonici (3-hidroxiubutirat, acetoacetat și acetonă), glucoză, fumarat, piruvat, lactat, citrat, succinat și alanină pentru a îmbunătăți metabolismul energetic, ciclul Krebs și glicoliza. Mai mult, tratamentul cu Cu.EtOH a inversat raportul ATP/ADP și a crescut disponibilitatea ATP în miocard. Toate aceste descoperiri au indicat că extractul Cu.EtOH îmbunătățește metabolismul energetic cardiac.

Anumiți aminoacizi se degradează în metaboliți intermediari pentru a acționa ca substraturi cardioprotectoare în ischemie pentru a crește și a furniza ATP. În studiul metabolomic, administrarea de ISO a modificat nivelurile de aminoacizi serici (aspartat, izoleucină, leucină, glutamat, valină, metionină, glicină, lizină și alanină) în probe. Acest lucru s-ar putea datora creșterii biosintezei și degradării aminoacizilor în țesutul cardiac pentru a satisface cerințele energetice. Glutamatul, aspartatul, glutamina și aminoacizii cu lanț ramificat (BCAA) sunt utilizați ca substrat metabolic în ciclul acidului tricarboxilic (TCA) (Drake et al., 2012). Jiang et al., (Jiang et al., 2017) au descoperit că conținutul de glutamat a fost redus în ser în infarctul miocardic indus de deficit de piruvat și a contribuit ca substrat intermediar pentru glicoliză și TCA. Glutamatul este un indicator potențial al disfuncției mitocondriale și se corelează negativ cu infarctul miocardic. Nivelurile crescute de glutamat seric facilitează modificările în ciclul Krebs, aminoacizi, degradarea nucleotidelor și detoxifierea amoniacului (nemutlu et al., 2015). Aquilani et al., (Aquilani et al., 2017) au descoperit că la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică (ICC), concentrațiile de aspartat, glutamat, metionină și cisteină au scăzut pe măsură ce severitatea bolii crește pentru a satisface cerințele metabolice.

Cu toate acestea, Cu.EtOH reglează acești aminoacizi și este implicat în metabolismul aminoacizilor pentru a exercita un efect cardioprotector. BCAA (valină, leucină și izoleucină) sunt utilizați ca substraturi alternative pentru a juca un rol semnificativ în producerea de energie. Țesuturile miocardice au o capacitate insuficientă în comparație cu alte organe pentru a utiliza BCAA și a produce energie pentru menținerea funcției cardiace (Fu et al., 2018). Alterarea BCAA în ser a cauzat, de asemenea, stres oxidativ, care poate provoca leziuni ale organelor (Tso et al., 2014).

S-a raportat anterior că scăderea nivelurilor de BCAA în ser se poate datora acumulării de BCAA în organele deteriorate, în special în inimă, în timpul infarctului miocardic indus de ISO (Guo et al., 2016). Acumularea de BCAA în organele deteriorate duce la perturbarea metabolismului energetic, disfuncție mitocondrială și activarea căii de semnalizare a țintei de rapamicină la mamifere (mTOR), ceea ce duce la intensificarea disfuncției cardiace. În plus, metabolismul glutaminei, histidinei, metioninei și cisteinei este legat de stresul oxidativ, deoarece este sensibil la toate tipurile de specii reactive de oxigen (ROS) (Bin et al., 2017). Metionina produce glutation și activează enzimele antioxidante pentru a răspunde la stresul oxidativ (Martinez et al., 2017). Bin et al., (Bin et al., 2017) au raportat că metionina protejează țesutul miocardic și vasculatura de leziuni prin reducerea stresului oxidativ indus de diverși oxidanți. Administrarea de ISO a crescut hipoxantina care crește colesterolul și ROS, provocând disfuncție endotelială prin stres oxidativ și apoptoză (Kim et al., 2017). Riboza nicotinamidă, un precursor al nicotinamidei (niacinamida), care este o componentă a NADH și NADPH. Reglează stresul oxidativ prin creșterea nivelurilor de NADPH și a enzimelor antioxidante. În studiul de față, administrarea de ISO crește nivelurile de prolină. Prolina este o componentă vitală a colagenului, iar nivelurile sale ridicate indică dezvoltarea remodelării cardiace (Zimmerli et al., 2008). Rezultatele sugerează că Cu.EtOH îmbunătățește nivelurile modificate de BCAA, glutamină, hipoxantină, histidină, metionină, cisteină și nicotinamidă și a redus stresul oxidativ. Aceste descoperiri susțin că Cu.EtOH îmbunătățește modificările metabolismului aminoacizilor, reglând în sus fixarea și detoxifierea amoniacului pentru a proteja inima împotriva ischemiei miocardice.

5-Hidroxitriptofanul (5-HTP) este produs în metabolismul triptofanului, iar decarboxilarea sa duce la producerea de 5-hidroxitriptamină (5-HT, serotonină). Serotonina este un potențial marker inflamator, vasoconstrictor și neuromodulator. Variația nivelurilor serice de 5-HTP modulează secreția

de neurotransmițători, cum ar fi epinefrina, care are proprietăți de vasoconstricție. Prin diferite căi, acidul nicotinic, nicotinamida și 5-HTP joacă un rol crucial în hipertensiune și ischemia miocardică. Studiile anterioare raportează că sfinbolipidele au fost implicate în etiologia hipertensiunii [75]. Nivelurile modificate de ceramidă activează protein kinaza, apoi inițiază semnalizarea în cascadă pentru a induce apoptoza. Prin urmare, activarea eNOS a fost inhibată, stresul oxidativ a fost indus în celulele endoteliale vasculare, iar producția de NO a fost scăzută. Ambele cauzează cumulativ disfuncție vasculară cu suprimarea relaxării dependente de endoteliu a vaselor de sânge. Ceramida induce, de asemenea, creșterea reglării acidului arahidonic și a tromboxanului A2 în calea ciclooxigenazei, iar creșterea ambilor intermediari promovează agregarea plachetară și vasoconstricția [76]. Aceste rezultate susțin studiile de expresie genică și *in vitro* care arată că Cu.EtOH a îmbunătățit funcția cardiacă prin activarea eNOS și creșterea reglării relaxării dependente de endoteliu (Fig. 15).

Constatările noastre au demonstrat că Cu.EtOH are efecte anti-IM, reglând modificările histopatologice, biochimice și metabolomice cauzate de ISO. Acest studiu a utilizat LC-MS pentru a profila plasma și inima șobolanilor ca răspuns la ischemia miocardică acută. Au fost găsite variații semnificative în profilurile metabolomice între ambele moduri, rezultând 151 de metaboliți divergenți. În plus, tratamentul cu Cu.EtOH a reparat multe căi metabolice perturbate de IM indus de ISO. Pretratamentele cu Cu.EtOH au arătat ținte metabolice distincte în producerea de energie, metabolismul aminoacizilor, răspunsurile proinflamatorii, degradarea BCAA, degradarea corpurilor cetonice și stresul oxidativ, indicând capacitatea Cu.EtOH de a regla căile metabolice pentru a exercita efectul cardioprotector. Aceste descoperiri au prezentat o perspectivă cuprinzătoare și integrată asupra etiologiei IM și a efectelor preventive ale Cu.EtOH.

## 5. Concluzii și perspective de viitor

În acest studiu, o combinație de experimente *in vitro* și *in vivo*, bazate pe mecanisme, a fost utilizată pentru a investiga potențialul efect cardioprotector al Cu.EtOH. Cu.EtOH a arătat un efect vasodilatator în modelele *in vitro*. În contrast, a prezentat un efect hipotensiv puternic la șobolani normotensivi și a protejat animalele de infarctul miocardic indus de ISO, cu efecte de intervenție asupra expresiei genelor mRNA, testelor biochimice și profilării metabolomice a serului și țesuturilor cardiace. Rezultatele sugerează că mecanismul antihipertensiv al Cu.EtOH poate implica reglarea factorului de

relaxare derivat din endoteliu (EDRF) bazat pe oxid nitric (NO) și este asociat cu funcția endotelială vasculară.

Mai mult, profilarea metaboliților din ser și țesuturile cardiace sugerează că Cu.EtOH a avut un efect cardioprotector potențial în infarctul miocardic indus de ISO. A inversat metabolismul aminoacizilor, metabolismul energetic și stresul oxidativ asociat cu infarctul miocardic. În rezumat, profilarea metabolomică a demonstrat o perspectivă mecanicistă a Cu.EtOH în activitățile antihipertensive și cardioprotectoare. Această bioinvestigație a relevat că semințele de *C. sativus* prezintă activități antihipertensive și cardioprotectoare semnificative în modele *in vitro*, *in vivo* și *in silico*, ceea ce justifică utilizarea acestei plante în medicina tradițională din Pakistan și India. În plus, prezența quercetinei, kaempferolului, acidului galic, acidului protocatechuic, epigallocatechinei și vitexinei poate fi considerată ca fiind compuși bioactivi promițători ai extractului Cu.EtOH.

Sunt necesare mai multe cercetări pentru a identifica și valida diferitele mecanisme de acțiune și căi responsabile pentru proprietățile cardioprotectoare și vasodilatatoare ale extractului. În ciuda potențialului farmacologic semnificativ al semințelor de *C. sativus*, sunt necesare mai multe dovezi pentru a aborda unele întrebări din perspectiva descoperirii de medicamente. În acest sens, o privire mai largă este de dorit în viitorul apropiat pentru a descoperi noi compuși bioactivi și aspecte farmacologice pentru semințele de *C. sativus*. De asemenea, este necesară dezvoltarea unor protocoale pentru calitatea semințelor utilizate pentru BCV.

---

Gîrdan L, Gavriș CM, Nedelcu L. Strategii terapeutice in boala renala diabetica. Jurnal Medical Brasovean 2023;vol 1: 16-24.

---

Boala cronică de rinichi (BCR) apărută la pacienții diabetici cuprinde atât leziuni renale atribuite diabetului - boală renală diabetică (BRD), cât și din cadrul altor substraturi patogenice - leziuni ale altor nefropatii, asociate sau nu celor de nefropatie diabetică. Aproximativ 20-40% dintre pacienții cu diabet zaharat (DZ) dezvoltă BCR, iar BRD reprezintă principala cauză a BCR terminale (Gheith O et al., 2016).

Îngrijirea pacienților cu DZ și BCR este complexă și multidisciplinară, iar educația structurată a pacienților reprezintă un pilon terapeutic principal. Pacienții cu DZ și BCR prezintă risc crescut de complicații acute, precum episoadele hipoglicemice sau cetoacidoza și cronice – retinopatia, neuropatia, piciorul diabetic, BRD cu evoluție către necesitatea de suplere a funcției renale prin dializă sau transplant renal și multiplele complicații cardiovasculare – boala cardio-vasculară aterosclerotică, infarctul miocardic, aritmiile, insuficiența cardiacă. În îngrijirea multimodală a pacientului cu DZ trebuie incluse screeningul periodic al acestor complicații și controlul factorilor de risc cardiovascular, precum hipertensiunea, dislipidemia, obezitatea și stilul de viață – dietă, fumat, activitate fizică (KDIGO 2022).

Mecanismele injuriei renale în BRD sunt complexe și incomplet elucidate. Acestea cu-prind factori metabolici, hemodinamici, proinflamatori și profibrotici, cărora li se adaugă stresul oxidativ și mecanisme genetice și epigenetice (Figura 1).

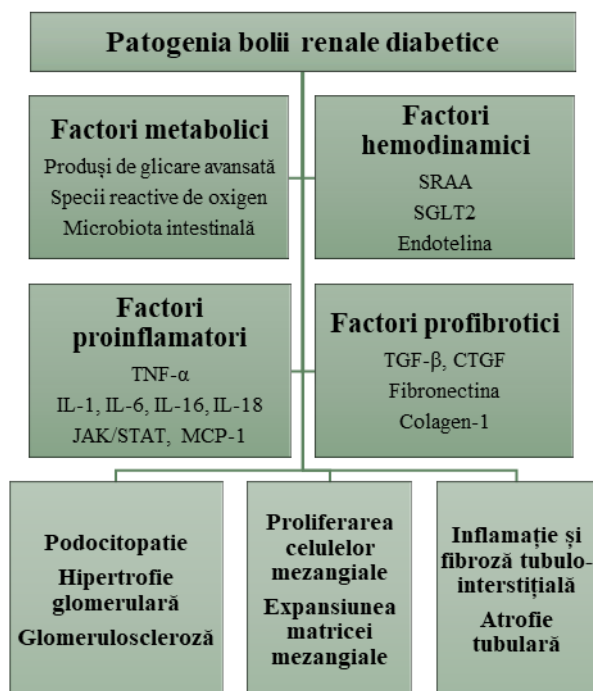


Fig. 1. Mecanisme patogenice în boala renală diabetică

Tulburările metabolismului glucidic duc la formare de produși de glicozilare avansată, cu modificarea arhitecturii matricei extracelulare și a fenotipului celular, activarea căii polioliol, creșterea speciilor reactive de oxigen, rezultând disfuncție endotelială, creșterea activității protein-kinazei C, cu efect proinflamator (Bhattacharjee N et al., 2016). Produșii de glicozilare avansată din alimentație, în

special din alimentele înalt procesate, inter-acționează cu microbiota intestinală, cresc permeabilitatea intestinală și determină eliberarea de mediatori proinflamatori, cu translocarea acestora în circulația sistemică și inflamație intrarenală. Lipopolizaharidele din peretele bacteriilor Gram-negative intestinale se leagă de receptorul TLR-4 (Toll-like receptor-4), contribuind la eliberarea citokinelor și recrutarea celulelor proinflamatorii (Watanabe K et al., 2023).

Hiperfiltrarea glomerulară apare din pri-mele stadii ale nefropatiei diabetice, rezultând din tulburări hemodinamice care cuprind activarea sistemului renină-angiotensină-aldosteron (SRAA), care determină creșterea presiunii de filtrare prin vasoconstricție predominant pe arteriola eferentă și infiltrat macrofagic prin activarea aldosteronului, precum și activarea cotransportorului-2 de sodiu-glucoză, cu inhibarea mecanismului de feedback tubulo-glomerular și generează inflamație și stres oxidativ. Are loc și activarea receptorilor de endotelină (activitatea biologică principală o are izoforma ET-1), care determină vasoconstricție intrarenală, inflamație și fibroză, stimulând expansiunea mezangială și injuria podocitară (Tuttle KR et al., 2022).

Mecanismele proinflamatorii includ activarea unor citokine proinflamatorii – TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-16, IL-18, factori de creștere – VEGF (vascular endothelial growth factor), chemokine – MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), precum și a unor căi de semnalizare intracelulară – calea NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B) sau a căii JAK/ STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription), cărora li se adaugă factorii profibrotici – TGF- $\beta$  (transforming growth factor-  $\beta$ ), CTGF (connective tissue growth factor) – rezultând inflamație și fibroză renale (Donate-Correa J et al., 2020).

Toate aceste mecanisme sunt interrelaționate și li se adaugă factori genetici și epigenetici, disfuncția mitocondrială și autofagia podocitară și conduc în final la glomeruloscleroză, proliferare și expansiune mezangială, inflamație și fibroză tubulo-interstițială (Wang J et al., 2021).

#### Obiectiv

În completarea datelor rezultate din studii clinice și a ghidurilor actuale de management al BRD, noi strategii terapeutice au fost identificate, cu trialuri clinice în desfășurare.

Vom face referire la măsurile farma-cologice de reducere a riscului cardiovascular și de progresie a BCR, cuprinzând medicația de linia întâi conform ghidurilor actuale, terapiile adiționale cu efect protector cardiorenal dovedit, precum și mecanismele moleculare implicate în patogenia BRD și potențialele ținte terapeutice corespunzătoare.

#### Material și metodă

Am utilizat bazele de date PubMed/ MEDLINE, Google Scholar, ScienceDirect și ClinicalTrials.gov pentru identificarea strategiilor terapeutice actuale cu impact cardiorenal în BRD, respectiv a trialurilor clinice în desfășurare.

#### Rezultate

Medicația de primă linie la pacienții cu BCR asociată DZ de tip 2

Inhibitorii sistemului renină-angiotensină - inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei (IECA), antagoniștii receptorilor de angioten-sină-II (sartani).

Se recomandă tratamentul cu IECA sau sartan pacienților diabetici (DZ de tip 1 și de tip 2), hipertensivi, cu albuminurie >30 mg/zi sau raport albumină/creatinină urinară (RAC) >30 mg/g, cu titrarea dozei până la doza maximă admisă sau tolerată (ADA 2022, KDIGO 2022). De asemenea, tratamentul cu IECA/sartan poate fi luat în considerare și la pacienții normotensivi diabetici (DZ de tip 1 și de tip 2) cu albuminurie, pentru întârzierea progresiei BCR.

Albuminuria moderată sau severă asociază risc renal și cardiovascular. Inhibarea SRA scade hiperfiltrarea glomerulară, reducând proteinuria. De asemenea, inhibarea SRA reduce procesele proinflamatorii și profibrotice. Angiotensina II promovează generarea de specii reactive de oxigen și mediază influxul de calciu la nivel podocitar, contribuind la injuria renală din BRD (Ilatovskaya DV et al., 2018). Aldosteronul joacă, de asemenea, un rol principal în patogenia BRD, prin stimularea unor factori de creștere precum inhibitorul activatorului plasminogenului tip 1 (PAI-1) și factorul de creștere și transformare  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), care promovează infiltratul macrofagic și fibroza renală (Ritz E et al., 2009). În cadrul studiului IRMA-2 a fost investigat rolul inhibiției SRA asupra dezvoltării sau progresiei BRD. Studiul a arătat o reducere a riscului de progresie a BCR ca urmare a tratamentului cu irbesartan la 2 ani, efectul fiind direct proporțional cu doza, însă independent de efectul hipotensor al acestuia (Parving

HH et al., 2001). În trialul RENAAL, care a inclus pacienți cu DZ de tip 2 și BCR, cu albuminurie >1g/zi, tratamentul cu losartan a redus cu 16% incidența dublării creatininemiei, a insuficienței renale și a mortalității (Keane WF et al., 2003). Astfel, efectul nefroprotector se păstrează și în cazul pacienților cu albuminurie sever crescută, iar o scădere mai mare a albuminuriei la inițierea tratamentului se asociază cu rezultate mai bune pe termen lung (Heerspink HJL et al., 2019).

Efectul de reducere a albuminuriei este dependent de doză și se recomandă prescrierea IECA/sartanilor la dozele maxime tolerate (Epstein M et al., 2015), fără întreruperea terapiei odată cu scăderea ratei de filtrare glomerulară estimate (RFGe) – oprirea terapiei se corelează cu creșterea riscului de evenimente cardiovasculare majore sau de deces, fără diferență semnificativă statistic pentru riscul de BCR terminală (Qiao Y et al., 2020). La debutul terapiei este permisă o creștere <30% a creatininemiei la patru săptămâni. Nu există diferențe semnificative în ceea ce privește beneficiul diferitelor molecule, iar asocierea unui IECA cu un sartan nu este recomandată (KDIGO, 2022).

Inhibitorii cotransportorului-2 de sodiu-glucoză (iSGLT2) - flozinele.

Se recomandă tratamentul cu iSGLT2 pacienților cu BCR cu sau fără DZ de tip 2, cu RFGe  $\geq 20 \text{ mL/min/1,73m}^2$ . Tratamentul poate fi continuat și sub această valoare a RFGe, până la inițierea terapiei de substituție renală prin dializă sau transplant renal. Utilizarea acestor molecule la pacienții cu DZ de tip 1 nu este aprobată. iSGLT2 cu beneficii cardiorenale dovedite sunt canagliflozin, dapagliflozin și empagliflozin, rezultatele principalelor trialuri clinice randomizat controlate cu outcome primar renal – CREDENCE, DAPA-CKD, EMPA-KIDNEY fiind reprezentate în Tabelul I (Perkovic V et al., 2019, Heerspink HJL et al., 2020, Herrington WG et al., 2022).

Efectul nefroprotector al iSGLT2 a fost studiat ca outcome secundar și în alte trialuri clinice randomizat controlate (cu outcome primar cardiovascular). În studiul EMPA-REG OUTCOME, comparativ cu placebo, empa-gliflozin a redus riscul de progresie a BCR – definit ca progresia RAC >300 mg/g, dublarea creatininei serice, BCR terminală sau deces de cauză renală (HR: 0,61; 95% CI: 0,53-0,70) (Wanner C et al., 2018). În studiul CANVAS, canagliflozin a redus riscul de progresie al albuminuriei cu 27% (HR: 0,73; 95% CI: 0,67-0,79) și a redus riscul de progresie a BCR – definit ca scăderea RFGe cu  $\geq 40\%$ , BCR terminală sau deces de cauză renală (HR: 0,60; 95% CI: 0,47-0,77) (Neal B et al., 2017).



	CREDESCENCE	DAPA-CKD	EMPA-KIDNEY
Medicament	Canagliflozin 100 mg/zi	Dapagliflo-zin 10 mg/zi	Empagliflo-zin 10 mg/zi
N	4401	4304	6609
RFGe la includere (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	30-90	25-75	≥20-<45 sau ≥45-<90
RAC la includere (mg/g)	>300-5000	200-5000	≥200
Follow-up (ani)	2,6	2,4	2
Outcome primar	BCR terminală, dublarea creatininei serice sau deces de cauză renală sau CV: HR: 0,70; 95% CI: 0,59-0,82	Scădere persistentă cu ≥50% a RFGe, BCR terminală, deces de cauză renală sau CV: HR: 0,61; 95% CI: 0,51-0,72	BCR terminală, RFGe persistent <10 mL/min/1,73 m <sup>2</sup> , scăderea persistentă a RFGe >40%, deces de cauză renală sau CV: HR: 0,72; 95% CI: 0,64-0,82
Outcome renal	BCR terminală, dublarea creatininei serice sau deces de cauză renală: HR: 0,66; 95% CI: 0,53-0,81	Scădere cu ≥50% a RFGe, BCR terminală, deces de cauză renală: HR: 0,56; 95% CI 0,45-0,68	BCR terminală, RFGe scăzută persistent <10 mL/min/1,73 m <sup>2</sup> , scăderea persistentă a RFGe >40%, deces de cauză renală: HR: 0,71; 95% CI: 0,62-0,81
Outcome secundar	Deces de cauză CV, IM, AVC: HR:0,80; 95%; CI 0,67-0,95; spitalizare pentru IC: HR: 0,61; 95% CI: 0,47-0,80	Deces de cauză CV, spitalizare pentru IC: HR: 0,71; 95% CI: 0,55-0,92	Spitalizare pentru IC, deces de cauză CV: nesemnificativ față de placebo: HR 0,84; 95% CI 0,67-1,07; P=0,15

Tabelul I. Trialuri clinice cu outcome primar renal al iSGLT2

CV – cardiovascular; IM – infarct miocardic; AVC – accident vascular cerebral; IC – insuficiență cardiacă.

iSGLT2 își exercită efectele protectoare cardiovasculare și renale prin multiple meca-nisme: natriureză - reducerea volemiei, a presiunii arteriale, scăderea presiunii intraglomerulare prin creșterea livrării de sodiu la nivelul maculei densa, cu activarea mecanismului de feedback tubulo-glomerular și vasoconstricție la nivelul arteriolei aferente, rezultând scăderea protei-nuriei; reducerea inflamației și a stresului oxidativ; ameliorarea oxigenării tisulare; scăderea stimulării sistemului nervos simpatic; efecte cardiovasculare directe – ameliorarea funcției cardiace, a disfuncției endoteliale și a rigidității arteriale; îmbunătățirea controlului glicemic; efect uricozuric; reducerea greutatei corporale și stimularea lipolizei, ameliorarea utilizării substratului energetic – creșterea cetogenezei și scăderea activării căii mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) (Cherney DZI et al., 2021). Precauții sunt necesare în cazul pacienților cu risc de hipoglicemie, în special în cazul insulinoterapiei sau a tratamentului cu sulfonilureice, fiind necesară ajustarea dozelor. De asemenea, în cazul riscului de depleție volemică se vor ajusta dozele de diuretic sau ale medicației hipotensoare. În caz de deshidratare sau de post prelungit se întrerupe temporar medicația cu iSGLT2. La inițierea terapiei este

acceptată o scădere a RFGe <30% (doar 4% dintre pacienții din lotul tratat cu canagliflozin în cadrul trialului CREDESCENCE au prezentat scăderea RFGe  $\geq$ 30%), iar scăderile persistente peste această valoare impun evaluarea statusului volemic (ajustarea dozelor terapiei diuretice concomitente) și excluderea nefrotoxicelor și a altei etiologii a injuriei renale acute. Potențialele contraindicații sunt reprezentate de: riscul de infecții genito-urinare, cetoacidoza diabetică, ulcerele plantare, imunosupresia (KDIGO 2022).

Metforminul.

În alegerea medicației hipoglicemizante în DZ de tip 2 asociat cu BCR trebuie ținut cont de RFGe (la RFGe <60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> sunt necesare ajustări ale dozelor) și se va lua în considerare reducerea riscului cardiovascular, de progresie a BCR, de hipoglicemie. Prima linie terapeutică în DZ de tip 2, în special asociat cu BCR este reprezentată de metformin și de iSGLT2, cărora li se pot adăuga alte terapii hipoglicemizante pentru obținerea controlului glicemic optim – agoniștii receptorului GLP-1, insulinoterapia, eventual inhibitorii de dipeptidil-peptidază-4, sulfonilureicele, tiazolidindionele, inhibitorii de alfa-glucozidază (KDIGO 2022, ADA 2023). Tratamentul cu metformin este recomandat pacienților cu RFGe >30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (sub

această valoare se întrerupe terapia), cu evaluarea raportului risc-beneficiu și reducerea dozelor la RFGe redusă; este necesară monitorizarea constantă a RFGe pe parcursul terapiei (FDA Drug Safety Communication, 2017). Metforminul are un rol modest în prevenția complicațiilor diabetului pe termen lung – spre deosebire de iSGLT2, care, deși sunt mai puțin eficiente în scăderea HbA1c, reduc evenimentele cardiovasculare majore și întârzie progresia BCR (McGuire DK et al., 2021).

Terapii adiționale cu beneficiu cardiorenal

Antagoniștii nonsteroidieni ai receptorilor mineralocorticoizi.

Se recomandă tratamentul cu un antagonist nonsteroidian al receptorilor mineralocorticoizi pentru tratamentul pacienților cu DZ de tip 2 și BCR, cu RFGe  $\geq$ 25 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, cu albuminurie persistentă (>30 mg/g) și fără hiperpotasemie, în ciuda tratamentului cu doză maximă tolerată cu IECA/sartan. Inhibarea SRA a dovedit efecte benefice cardiovasculare și renale în trialurile clinice, însă există o supresie incompletă a nivelului seric de aldosteron (fenomen de "scăpare" al aldosteronului),

astfel încât sunt necesare terapii adiționale pentru reducerea albuminuriei reziduale și ameliorarea fibrozei renale (KDIGO 2022).

Antagoniștii steroidienei ai receptorului mineralocorticoid – spironolactona, eplerenona – sunt utilizați în tratamentul insuficienței cardiace, hiperaldosteronismului sau hipertensiunii refractare, însă cresc riscul de hiperpotasemie (de 2-3 ori) și de injurie acută de rinichi (de 2 ori), iar studiile privind efectul nefroprotector au fost limitate (Chung EY et al., 2020). Inhibitorii nonsteroidieni ai receptorilor mineralocorticoizi – finerenona, esaxerenona – prezintă selectivitate mai crescută și reduc albuminuria, având un risc mai redus de hiperpotasemie (Agarwal R et al., 2021). Efectele cardio- și nefroprotectoare ale finerenonei au fost evaluate în două trialuri clinice randomizat controlate, rezultatele acestora fiind reprezentate în Tabelul II (Bakris GL et al., 2020, Pitt B et al., 2021).

Analiza combinată a celor două studii – FIDELITY – a demonstrat reducerea outcome-ului cardiovascular cu 14% în brațul celor tratați cu finerenonă (HR: 0,86; 95% CI: 0,78-0,95), indiferent de utilizarea concomitentă a iSGLT2 sau a AR GLP-1. De asemenea, această analiză a demonstrat nefroprotecție, prin analiza outcome-ului renal, definit ca – BCR terminală, scăderea RFGe susținută cu >57% sau deces de cauză renală (HR: 0,77; 95% CI: 0,67-0,88), iar asocierea tratamentului cu un iSGLT2 reduce riscul de hiperpotasemie (Agarwal R et al., 2021).

	FIDELIO-DKD	FIGARO-DKD
Medicament	Finerenona	Finerenona
N	5734	7437
RFGe (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> ) sau RAC (mg/g) la înrolare	RFGe 25-<60 și RAC 30-<300 SAU RFGe 25-<75 și RAC 300-5000	RFGe 25-90 și RAC 30-<300 SAU RFGe ≥60 și RAC 300-5000
Follow-up (ani)	2,6	3,4
Outcome primar	Renal	CV
Outcome secundar	CV	Renal
Outcome renal	BCR terminală, scădere susținută a eRFG ≥40%, deces de cauză renală: HR: 0,82; 95% CI: 0,73-0,93	BCR terminală, scădere susținută a eRFG ≥40%, deces de cauză renală: HR: 0,87; 95% CI: 0,76-1,01
Outcome CV	Deces de cauză CV, IM non-fatal, AVC non-fatal sau spitalizare pentru IC: HR: 0,86; 95% CI: 0,75-0,99	Deces de cauză CV, IM non-fatal, AVC non-fatal sau spitalizare pentru IC: HR: 0,87; 95% CI: 0,76-0,98

Tabelul II. Trialuri clinice de studiu al finerenonei

CV – cardiovascular; IM – infarct miocardic; AVC – accident vascular cerebral; IC – insuficiență cardiacă

Și esaxerenona și-a demonstrat efectul nefroprotector, cu o incidență a hiperpotasemiei de 9% (Ito S et al., 2020).

Asocierea finerenonei cu un iSGLT2 a fost investigată doar în analize post-hoc și este anticipată scăderea incidenței hiperpotasemiei cu aju-torul acestei combinații, prin selectivitatea crescută pentru receptorii mineralocorticoizi și prin efectul kaliuretic al iSGLT2. Un trial clinic randomizat controlat – CONFIDENCE (NCT05254002) studiază asocierea finerenonei cu empagliflozin la pacienții cu BCR și DZ tip 2 (Green JB et al., 2023).

Agoniștii receptorului peptidului-1 asemănător glucagonului (AR GLP-1).

Tratamentul cu AR GLP-1 este recomandat pacienților cu DZ tip 2 și BCR care nu au atins țintele terapeutice cu metformin și iSGLT2 sau care au contraindicații de utilizare a acestor terapii, precum și pacienților la care se dorește scăderea ponderală (ADA 2023).

GLP-1 este un hormon incretinic secretat de intestin după ingestia de glucoză sau a altor nutrienți, care stimulează secreția beta-insulară de insulină dependentă de glucoză și inhibă secreția de glucagon de la nivelul celulelor alfa pancreatice. De asemenea, întârzie golirea gastrică și scade apetitul. AR GLP-1 au așadar efect hipoglicemiant și determină scădere ponderală.

Trialurile clinice au demonstrat scăderea riscului de evenimente cardiovasculare majore, precum și scăderea albuminuriei și progresia BCR. Aceste studii au avut outcome primar cardiovascular, iar beneficiile renale au fost studiate ca outcome secundar. Rezultatele princi-palelor trialuri clinice randomizat controlate sunt reprezentate în Tabelul III (Mann JFE et al., 2019, Marso SP et al., 2016, Gerstein HC et al., 2019).

Tabelul III. Principalele trialuri clinice pentru agoniștii receptorului GLP-1

CrS – creatinina serică; CV – cardiovascular; IM – infarct miocardic; AVC – accident vascular cerebral.

Studiul FLOW (NCT03819153) este un trial clinic randomizat controlat de fază 3b cu outcome primar renal al semaglutidei administrate săptămânal la pacienții cu DZ de tip 2 și RFGe 25-50 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> sau cu albuminurie severă (Rossing P et al., 2023). Studiul de fază 3 REMODEL (NCT04865770) studiază efectele semaglutidei la pacienții cu DZ de tip 2 și BCR asupra inflamației, perfuziei și oxigenării intrarenale cu ajutorul imagisticii prin rezonanță magnetică și al biopsiei renale (Bjornstad P et al., 2022). Studiul SOUL (NCT03914326) este un studiu de fază 3 care evaluează beneficiul cardio-vascular al semaglutidei orale la pacienții cu DZ de tip 2 (McGuire et al., 2023).

Un alt studiu important care confirmă efectul nefroprotector al AR GLP-1 este trialul AWARD-7, în care dulaglutida administrată săptămânal a fost comparată cu terapia cu insulină bazală glargin la pacienți cu BCR stadiile G3a-G4 (RFGe medie 38mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) și a demonstrat reducerea declinului RFGe pe o durată de 52 de săptămâni, în special în subgrupul cu albuminurie severă. Beneficiile au fost obținute cu scăderea similară a HbA1c și valori presionale similare în brațele cu tratament cu dulaglutidă vs. insulină glargin, însă cu înjumătățirea frecvenței hipoglicemiilor simptomatice în brațul cu dulaglutidă. În urma rezultatelor acestui studiu, dulaglutida a obținut aprobare de utilizare la valori RFGe de până la 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (Tuttle et al., 2018).

Noi terapii cu efect nefroprotector

Tirzepatid.

Principalii hormoni incretinici sunt GLP-1 și polipeptidul insulinotrop dependent de glucoză – GIP (inițial denumit peptid inhibitor gastric). GIP este secretat de către celulele enteroendocrine K din intestinul subțire și stimulează secreția de insulină la nivelul celulelor beta și transcripția genei insulinei în funcție de glicemie. Recent, tirzepatid, un agonist dual al receptorilor GLP-1 și GIP, a fost aprobat pentru tratamentul pacienților cu DZ de tip 2 și a demonstrat eficacitate superioară în reducerea greutateii corporale și non-inferioritate în reducerea HbA1c comparativ cu agoniștii receptorilor GLP-1 (Bulum et al., 2022). Comparativ cu insulina glargine, tirzepatid a demonstrat scăderea cu 41% a riscului renal, definit ca – dezvoltarea albuminuriei severe, scăderii RFGe cu >40%, BCR terminală, deces de cauză renală (HR: 0.59; 95% CI: 0.43–0.80) (Heerspink HJL et al., 2022).

Antagoniștii receptorului de endotelină.

Endotelina este un polipeptid vasoactiv care se găsește în 3 izoforme – ET-1, cu potențialul vasoconstrictor cel mai crescut, ET-2 și ET-3, care își exercită funcția biologică cu ajutorul receptorilor de endotelină A și B (ETA și ETB). Endotelina-1 poate activa ETA și ETB. Activarea ETA promovează vasoconstricția arte-riolei aferente, disfuncția endotelială, inflamația, fibroza, cu hiperfiltrare glomerulară, injurie podocitară, proteinurie și degradarea funcției

renale. Activarea ETB are efect vasodilatator, natriuretic, antiproliferativ, antifibrotic.

Antagoniștii selectivi ai ETA ce au demonstrat beneficiu renal în studii sunt reprezentați de atrasentan, sitaxentan, avosentan, zibotentan. Efectul advers major al acestei clase terapeutice este reprezentat de hipervolemie. Sparsentan este un antagonist dual de receptor al endotelinei/angiotensinei-II tip 1 cu afinitate înaltă pentru ETA, blocând atât SRA, cât și endotelina și este studiat pentru efectul nefroprotector în glomeruloscleroza focală și segmentară și în nefropatia cu IgA (Martínez-Díaz I et al., 2023). Zibotentan este cel mai selectiv antagonist ETA (selectivitate ETA: ETB de 100000) și este studiat în combinație cu dapagliflozin (NCT06087835) la pacienții cu BCR (Provenzano M et al., 2021).

Inhibitorii protein kinazei C.

Activarea protein-kinazei C joacă un rol important în dezvoltarea complicațiilor micro-vasculare ale diabetului, prin stimularea stresului oxidativ, ceea ce alterează fluxul și permeabilitatea vasculară, stimulează acumularea de matrice extracelulară și angiogeneza. Au fost derulate multiple studii experimentale și clinice, în special cu inhibitori PKC-β – ruboxistaurina, însă rezultatele nu au fost concludente (Pan D et al., 2022).

Alți agenți terapeutici.

Baricitinib reprezintă un inhibitor al JAK1/JAK2 care a scăzut markerii inflamatori și albuminuria la pacienții cu DZ tip 2. Sunt necesare studii suplimentare pentru stabilirea rolului acestei terapii în întârzierea progresiei BCR (Tuttle KR et al., 2018).

Bardoxolone metil prezintă proprietăți antioxidative și antiinflamatorii prin activarea căii Keap1-Nrf2 și este investigat într-un trial clinic randomizat controlat (NCT03550443) la pacienții cu boală renală diabetică (Nangaku M et al., 2022).

Selonsertib, un inhibitor al ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), este de asemenea investigat pentru întârzierea progresiei BRD (Watanabe K et al., 2023).

### Discuții

Pentru tratamentul pacienților cu BCR și DZ de tip 2 este necesară o abordare complexă de reducere a riscului cardiovascular și renal, cu implementarea strategiilor de evaluare a factorilor de risc modificabili, incluzând dieta, activitatea fizică, oprirea fumatului, controlul greutății, cărora li se adaugă terapii medicamentoase specifice de primă linie sau de control adițional al factorilor de risc. Sunt necesare însă trialuri clinice adiționale de control al riscului cardio-renal și al modalităților optime de inițiere, titrare, combinare a tuturor acestor opțiuni terapeutice, cu includerea pacienților cu DZ de tip 1, a pacienților aflați în program de dializă sau a celor cu transplant renal.

Sunt de asemenea necesare studii de lungă durată privind profilul de siguranță și eficacitatea tratamentului cu iSGLT2 și cu antagoniști ai receptorilor de mineralocorticoizi nonsteroidieni la pacienții cu DZ de tip 2 și BCR avansată, precum și studii privind barierele de implementare clinică a acestor noi terapii. Este necesară cercetarea profilului de siguranță al terapiei cu iSGLT2 sau AR GLP-1 pentru pacienții cu DZ tip 1. De asemenea, tratamentul cu iSGLT2 a fost cercetat doar în studii reduse în cazul pacienților cu transplant renal.

### Concluzii

Mai mult ca oricând, noi date reies din studiile clinice și experimentale pentru pacienții cu DZ și BCR, iar strategiile terapeutice sunt într-o dinamică accelerată de progresul descoperirii de potențiale terapii cu rol nefroprotector pentru această populație. Am prezentat modalitățile actuale de tratament în BRD, cu accent pe noile molecule, precum și pe modalitățile de asociere ale acestor noi terapii.

---

Saqib F, Al-Huqail AA, Asma M, Chicea L, Hoge M, Irimie M, Gavris C. Dose-dependent Spasmolytic, Bronchodilator, and Hypotensive Activities of *Panicum miliaceum* L. Dose Response. 2022 Mar 27;20(1):15593258221079592.

*Panicum miliaceum* L., cunoscut în mod obișnuit sub numele de mei proso, mei de porc sau mei comun, aparține familiei Poaceae. Meiul proso se găsește în aproape toate zonele din Asia (în special India, Pakistan și Bhutan), Africa, Rusia Centrală, America de Nord, Turcia, Australia, Grecia, Japonia, Mongolia și Europa. În Pakistan, este cunoscut sub numele de Cheena sau Cheeni și este distribuit în Sind, Punjab, Khyber Pakhtunkhwa, Gilgit și Kashmir.

Plantele de *Panicum* sunt utilizate în mod tradițional pentru a trata diareea, dizenteria, dispepsia, ulcerele și constipația. Decoctul de *Panicum* antidotale este utilizat în tuse, infecții ale gâtului, infecții ale tractului respirator și boli cardiovasculare (hipertensiune arterială).

*Panicum miliaceum* L. este utilizat în mod tradițional pentru tratamentul bolilor celiace (disconfort abdominal și diaree severă). Din punct de vedere medicinal, boabele transformate într-un terci sunt administrate pentru aciditate, rău de mișcare și probleme biliare. De asemenea, este utilizat pentru tratamentul otrăvirii prin mușcătură de șarpe. Semințele fierte sunt aplicate ca cataplasma pentru abcese/blistere și răni/ulcerații. Meiul proso este, de asemenea, util împotriva bolilor de inimă, hipercolesterolemiei, cancerului de sân, diabetului, pietrelor la fiere, hematuriei, inflamației, ridurilor și diferitelor boli virale și bacteriene.

Meiul proso este bogat în fitochimicale precum acidul fitic, despre care se crede că scade colesterolul, și fitatul, care este asociat cu reducerea riscurilor de cancer, împreună cu acizii fenolici și acizii benzoici. De asemenea, conține acid clorogenic, acid siringic, acid cafeic, acid R-cumaric, acid ferulic, acid galic, acizi hidroxicinamici, carotenoizi, luteină, acizi grași (oleic și linolenic), amidon, proteine și acid mio-inozitol hexa-fosforic. Mai mult, s-a raportat că sunt prezente fibre fără gluten și alți constituenți importanți, cum ar fi carbohidrați și vitamine, zinc, calciu, fenol, magneziu, fier, potasiu, fosfor și mangan.

Studiile anterioare au arătat că *Panicum miliaceum* L. posedă activități anti-diabetice, pro-apoptotice, anti-adipogenice și anti-cancer. Cu toate acestea, există puține dovezi disponibile cu privire la utilizarea sa medicinală în afecțiunile tractului gastrointestinal (GIT) și ale sistemului cardiovascular



(CVS). Acest studiu a fost conceput pentru a explora baza farmacologică a utilizării medicinale a *Panicum miliaceum* L. în diaree, astm și hipertensiune.

#### Metodologie

##### Colectarea, extracția și fracționarea plantelor

Centrul Național de Cercetare Agricolă (NARC), Institutul de Conservare a Bioresurselor, Islamabad, a furnizat o mostră de semințe de *Panicum miliaceum* L. în scop de cercetare pe 13-8-2018. Semințele au fost cultivate în zona fermei experimentale a Facultății de Științe și Tehnologie Agricolă a Universității Baha-Uddin Zakariya Multan de către doctorandul Muhammad Maqsood. Semințele au fost colectate și identificate taxonomic de către Dr. Zafar-Ullah Zafar, un taxonomist competent de la Institutul de Botanică Pură și Aplicată al aceleiași Universități, iar un specimen de voucher (FI.P 165) a fost depus în ierbarul Institutului de Biologie Pură și Aplicată.

Semințele colectate au fost curățate, măcinate într-o pulbere grosieră și macerate cu o soluție (70% metanol + 30% apă distilată) într-o sticlă de culoare chihlimbar, cu agitare regulată timp de 4 zile. Apoi, filtrarea a fost efectuată mai întâi printr-o cârpă, apoi cu hârtie de filtru Whatman. Aceeași metodă a fost repetată pentru a doua și a treia macerare. Toate filtratele colectate au fost combinate; solventul a fost evaporat sub presiune redusă pe un evaporator rotativ (Rotavapor, BUCHI Labortechnik AG, Model 9230, Elveția) până când s-a obținut o pastă maro-roșcat închis (Pm.Cr) cu un randament de aproximativ 16%. Extractul obținut a fost depozitat într-o sticlă de culoare închisă. În momentul experimentului, extractul Pm.Cr a fost dizolvat în DMSO și apă distilată.

Fracționarea a fost realizată prin dizolvarea a 10 g de Pm.Cr în 100 mL de apă distilată și 100 mL de diclormetan (DCM). Două straturi, DCM (Pm.Dcm) și apos (Pm.Aq), au fost separate și uscate.

##### Substanțe chimice și animale

Au fost utilizate substanțe chimice aproape 99,9% pure pentru studiile experimentale in vivo și in vitro. Paracetamolul, aspirina și uleiul de ricin au fost obținute de la GSK. Glibenclamida, fenilefrina, doxazocina, losartanul, cromakalimul, carbacholul și loperamida au fost obținute de la Sigma Chemical Co. (SUA). Substanțele chimice pentru prepararea soluțiilor Krebs și Tyrode au fost achiziționate de la Merck (Germania). Pentru experimente, au fost luați iepuri albi albinoși (1,0-2,0 kg) și șobolani Sprague

Dawley (150-250 g) de ambele sexe din Casa Animalelor a Facultății de Farmacie. Animalele au fost adăpostite la  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Toate regulile etice permise au fost respectate pe parcursul întregii cercetări.

#### Screening fitochimic

Examinare fitochimică preliminară. Pm.Cr și Pm.Aq au fost analizate calitativ pentru a detecta compuși bioactivi.

Analiza HPLC. O metodă simplă, rapidă și competentă de solvent binar în pantă, dezvoltată de grupul nostru, a fost utilizată pentru identificarea compușilor fenolici și flavonoizi în Pm.Cr. A fost utilizat HPLC care conține o coloană C18 cu un diametru intern de  $250 \times 4,7$  mm, un debit de 0,9 mL/minut și o capacitate de a separa componenții fenolici de 8-9 și pentru flavonoide de 1-4 într-o perioadă de 35-36 de minute. Fazele mobile utilizate au fost; A: acetonitril 70% și metanol 30% și B: H<sub>2</sub>O și 0,5% acid acetic. Concentrația, timpul de retenție și ariile picurilor au fost comparate cu standardele.

#### Teste In Vitro

Prepararea Jejunului Izolat. Experimentele au fost efectuate cu Pm.Cr și fracțiunile sale (Pm.Aq și Pm.Dcm) pe țesut izolat pentru a observa dacă are consecințe spasmodice sau antispasmodice asupra tractului gastrointestinal (GIT).

Iepurii au fost ținuți în post peste noapte înainte de experimentare, dar au avut acces la apă. După disecție, a fost preparat țesut jejunal (aproximativ 2 cm) și păstrat imediat în soluție Tyrode cu o alimentare adecvată cu oxigen. Țesutul a fost suspendat într-o baie de organe (soluție Tyrode oxigenată la o temperatură de  $37^\circ\text{C}$ ), a fost setată o tensiune de 1 g și experimentul a fost efectuat timp de 45 de minute pentru a-l echilibra. Soluția Tyrode proaspătă a fost înlocuită la intervale de 15 minute înainte de expunerea la extract.

Pentru a observa răspunsul spasmodic/antispasmodic, dozele de extract au fost adăugate în mod cumulativ. Experimente suplimentare cu contracții provocate ( $\text{K}^+$  ridicat,  $\text{K}^+$  scăzut), urmate de substanța de test, au fost efectuate pentru a descoperi posibilele sale mecanisme. Efectul spasmolitic al extractului de plantă poate fi datorat blocării canalelor de  $\text{Ca}^{++}$  sau deschiderii canalelor de  $\text{K}^+$ .

Efectul de relaxare al extractului de plantă asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut este de obicei considerat a fi datorat posibilei implicări a mecanismului de deschidere a canalelor de  $K^+$ .

Pentru a determina activarea canalului de  $K^+$ , contracția declanșată de  $K^+$  scăzut, pretratată cu glibenclamidă, a fost evaluată cu doze de extract care i-au inhibat efectul de relaxare, având un model similar cu cromakalim, confirmând mecanismul său de deschidere a canalului de potasiu  $K^+$ -ATP.

Prepararea Traheei Izolate. Experimentele au fost efectuate pe țesut traheal izolat pentru a observa răspunsul asupra sistemului respirator. Pentru pregătirea țesuturilor, iepurii au fost ținuți în post peste noapte înainte de experimentare, dar au avut acces la apă. După disecție, traheea a fost pregătită și păstrată imediat în soluție Krebs cu o alimentare adecvată cu oxigen. Țesutul a fost suspendat într-o baie de organe (soluție Krebs oxigenată la o temperatură de  $37^\circ\text{C}$ ), a fost setată o tensiune de 1 g și experimentul a fost efectuat timp de 45 de minute pentru a-l echilibra. Soluția Krebs proaspătă a fost înlocuită la intervale de 15 minute înainte de expunerea la extract.[20] Dozele de extract Pm.Cr au fost aplicate împotriva liniei de bază și a contracțiilor stabilizate declanșate de CCh și  $K^+$  scăzut pentru a descoperi mecanismele sale colinergice și de deschidere a canalelor de potasiu.

Prepararea Aortei Izolate. Efectul vasoconstrictor și/sau vasodilatator asupra preparatului de aortă izolată a fost testat. Țesuturile de aortă au fost pregătite de la iepuri, pentru care iepurii au fost ținuți în post peste noapte înainte de experimentare, dar au avut acces la apă. După disecție, aorta a fost îndepărtată și păstrată imediat în soluție Krebs cu o alimentare adecvată cu oxigen. Țesutul a fost suspendat într-o baie de organe (soluție Krebs oxigenată la o temperatură de  $37^\circ\text{C}$ ), a fost setată o tensiune de 2 g și experimentul a fost efectuat timp de 45 de minute pentru a-l echilibra. Soluția Krebs proaspătă a fost înlocuită la intervale de 15 minute înainte de expunerea la extract.[20] Răspunsurile au fost înregistrate împotriva liniei de bază stabilizate și a contracțiilor declanșate de PE și  $K^+$  scăzut.

#### Experimentare In Vivo

Activitate Antidiareică. Efectul antidiareic al Pm.Cr a fost evaluat printr-o metodă raportată anterior.[24] Au fost luați treizeci și cinci de șobolani și împărțiți în 7 grupuri, câte 5 șobolani per grup (100-200 g). Grupului de control i s-a administrat soluție salină normală (10 mL/kg), iar grupurilor 2 și 3 li s-au administrat cromakalim și loperamidă (controale pozitive). Grupurile 4 și 5 au primit doze

diferite (100 și 200 mg/kg, p.o.) de Pm.Cr, iar grupurile 6 și 7 au fost pretratate cu glibenclamidă (GB). După 1 oră, fiecărui șobolan i s-a administrat oral (10 mL/kg) ulei de ricin și a fost plasat într-o cutie separată căptușită cu hârtie de filtru pentru a observa picăturile fecale apoase timp de următoarele 1, 2, 3 și 4 ore.

$$\% \text{ protecție} = [(F_c - F_t) / F_c] \times 100$$

unde,

$F_c$  = numărul de fecale umede (control)

$F_t$  = numărul de fecale umede (test)

Analiză Statistică. Rezultatele sunt exprimate ca medie  $\pm$  SEM. Concentrațiile eficiente mediane (valoarea EC50) cu 95% (CI) au fost calculate cu Graph Pad Prism (GraphPad, San Diego, California, SUA: <http://www.graphpad.com>). Analiza statistică a fost efectuată folosind ANOVA unidirecțională, urmată de testul Dunnett în cazul experimentelor in vivo; o probabilitate ( $P < .05$ ) a fost considerată semnificativă statistic.[25]

## Rezultate

### Screening Fitochimic Preliminar

Analiza fitochimică a Pm.Dcm a indicat prezența alcaloizilor, fenolilor și terpenoizilor, în timp ce Pm.Aq a conținut flavonoide, glicozide și taninuri.

### Examinare HPLC

Timpul de retenție al Pm.Cr a fost comparat cu cel al standardului. Au fost detectați acid galic, hidroxitoluen butilat, catechină și quercetină (Figura 1, Tabelul 1).

Răspuns pe Jejun. Pm.Cr și fracțiunile sale au fost utilizate pentru a evalua răspunsul său pe țesutul izolat de jejun. Pm.Cr a prezentat un efect relaxant asupra țesutului contractat în mod natural la o concentrație de 3 mg/mL, contracții stabilizate declanșate de  $K^+$  scăzut, la un interval de

concentrație de 0,01-3 mg/ml de Pm.Cr cu  $EC_{50} = 0,358 \pm 0,052$ , 95% (I.C.): 0,276-0,464) (Figurile 2 și 5A și 5B), care a fost inhibat în țesuturile pretratate cu 3  $\mu$ M glibenclamidă (Figura 5C și 5D).

Pm.Aq a prezentat un efect relaxant asupra țesutului contractat în mod natural la o concentrație de 0,01-5 mg/ml, în timp ce contracțiile declanșate de  $K^+$  scăzut s-au relaxat cu  $EC_{50} = 0,082 \pm 0,111$ , 95% (I.C.): 0,040-0,167 mg/mL (Figurile 3 și 5B).

Pm.Dcm a relevat, de asemenea, un răspuns spasmodic la o concentrație de doză de 0,01-3 cu  $EC_{50} = 0,334 \pm 0,147$ , 95% (I.C.): 0,120-1,063 (Figurile 4 și 5C) împotriva  $K^+$  scăzut, precum și pe țesutul contractat în mod natural la concentrații de 0,01-1 mg/ml.

Răspunsurile înregistrate au fost comparate cu cromakalim (mecanism standard de deschidere a canalului  $K^+$  sensibil la ATP), având efectul său relaxant asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut cu  $EC_{50} = 0,184 \pm 0,165$ , 95% (I.C.): 0,021-0,214 mg/mL (Figura 2E). În plus, 3  $\mu$ M glibenclamidă a blocat efectul relaxant al Pm.Cr asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut cu  $EC_{50} = 0,17 \pm 0,021$ , 95% (I.C.): 0,041-0,511, similar cu cromakalim  $EC_{50} = 0,018 \pm 0,100$  95% (I.C.): 0,02-0,248 mg/mL (Figura 5E).

Răspuns pe Trahee. Extractul brut și fracțiunile sale au fost evaluate pentru a înregistra răspunsul lor pe traheea izolată. Pm.Cr a prezentat un efect relaxant asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut și CCh (1  $\mu$ M) la concentrații de 1 și 3 cu  $EC_{50} = 2,483 \pm 0,05793$ , 95% (I.C.): 1,901-3,364 și  $EC_{50} = 0,611 \pm 0,1045$ , 95% (I.C.): 0,334-1,154, respectiv (Figurile 6 și 9A). 3  $\mu$ M glibenclamidă a blocat efectul relaxant al Pm.Cr asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut (Figura 9D).

Pm.Aq a prezentat un efect relaxant asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut la 0,3 mg/mL cu  $EC_{50} = 0,053 \pm 0,1761$ , 95% (I.C.): 0,012-0,335. Pm.Aq a prezentat un efect relaxant asupra contracțiilor declanșate de CCh la o concentrație de 0,03 mg/mL. (Figurile 7 și 9B)

Pm.Dcm a prezentat un efect relaxant asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut și CCh (1  $\mu$ M) la o concentrație de 0,3 cu  $EC_{50} = 0,352 \pm 0,3276$ , 95% (I.C.): 0,050-0,976 și, respectiv, 95% (I.C.): 0,010-0,786 (Figurile 8 și 9C).

Răspunsurile înregistrate au fost comparate cu cromakalim, având efectul său relaxant asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut cu  $EC_{50} = 0,013 \pm 0,001$ , 95% (I.C.): 0,01-0. În plus, 3  $\mu$ M

glibenclamidă a blocat efectul relaxant al cromakalimului, având  $EC_{50} = 0,14$ , 95% (I.C.): 0,031-0,401 mg/mL (Figura 9E).

Răspuns pe Aortă. Pm.Cr testat pe aortă nu a produs niciun efect asupra liniei de bază. Conracțiunile declanșate de  $K^+$  scăzut și PE (1  $\mu$ M) s-au relaxat cu Pm.Cr la o concentrație de 0,01-3 și, respectiv, 0,01-5, cu  $EC_{50} = 0,383 \pm 0,063$ , (95% (I.C.): 0,271-0,548 mg/mL și  $EC_{50} = 5,29 \pm 0,315$ , (95% (I.C.): 3,993-11,56 (Figurile 10 și 12A). Glibenclamida la 3  $\mu$ M a blocat efectul relaxant al Pm.Cr asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut (Figura 12B).

Pm.Aq a relaxat complet contracțiile declanșate de PE (1  $\mu$ M) la concentrația de 0,01-3 cu  $EC_{50} = 0,092 \pm 0,010$ , (95% (I.C.): 0,044-0,1915 mg/mL, dar nu a avut efect împotriva  $K^+$  scăzut.

Fracțiunea Pm.Dcm a relevat efectul său vasorelaxant asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut la o concentrație de 0,01-3 cu  $EC_{50} = 0,864 \pm 0,0011$ , 95% (I.C.): 0,658-2,433 mg/mL. De asemenea, a relaxat contracția stabilizată de PE (1  $\mu$ M) la 0,01-5 cu  $EC_{50} = 0,02931 \pm 0,213$ , 95% (I.C.): 0,004-0,280 mg/mL (Figura 11).

Răspunsurile înregistrate au fost comparate cu cromakalim, care a arătat un efect relaxant asupra contracțiilor declanșate de  $K^+$  scăzut cu  $EC_{50} = 0,01$ , 95% (I.C.): 0,02-0,277 mg/mL. În plus, 3  $\mu$ M glibenclamidă a blocat efectul relaxant al cromakalimului cu  $EC_{50} = 0,15$  (95% (I.C.): 0,032-0,437 mg/mL (Figura 12).

#### Experimentare In Vivo

Efectul antidiareic al Pm.Cr. Pm.Cr a prezentat un efect antidiareic puternic; în comparație cu grupul de control, grupurile de test au avut o protecție procentuală de 64,65% ( $P < 0,01$ ) și, respectiv, 88,89% ( $P < 0,005$ ). Grupurile cu cromakalim, loperamidă și soluție salină au arătat o protecție de 65,81%, 77,9% și, respectiv, 20,4%. Când efectul Pm.Cr pretratată cu GB a scăzut la 34,1% și 22,5%, cu cromakalim, acesta a fost redus la 25,6% (Figura 13).

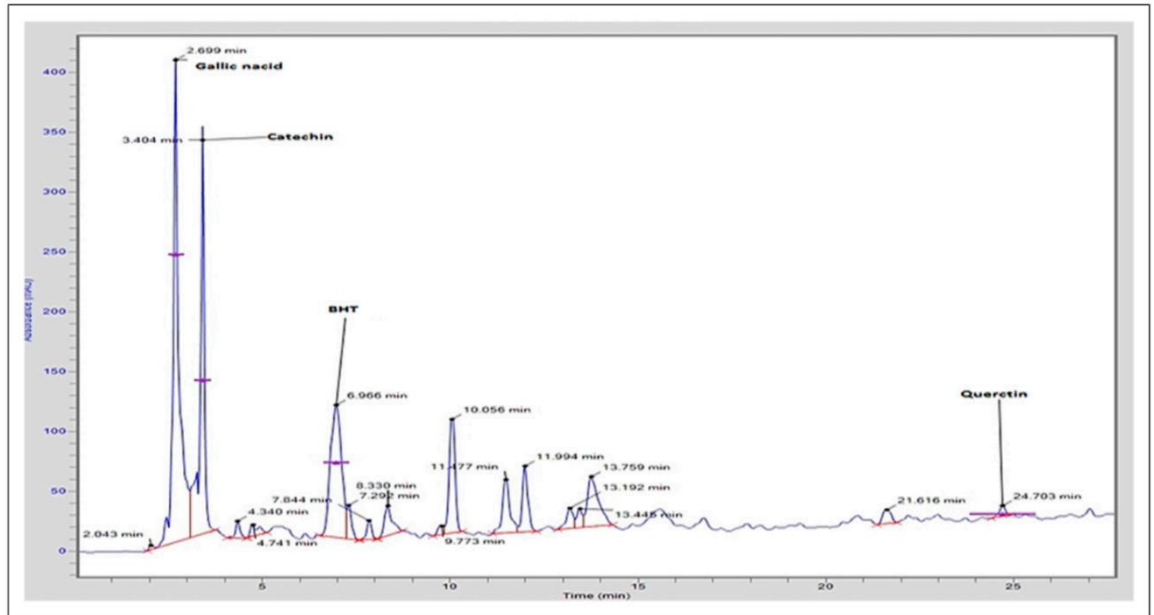


Figure 1. HPLC- chromatogram of *Panicum miliaceum* L.

Table 1. Comparison of standards and *panicum miliaceum* L.

Standards	Retention Time (minutes)	Compounds detected	Retention Time (minutes)
Gallic acid	2.806	Gallic acid	2.700
Catechin	3.387	Catechin	3.405
Butylated hydroxytoluene	7.041	Butylated hydroxytoluene	6.967
Quercetin	24.894	Quercetin	24.704

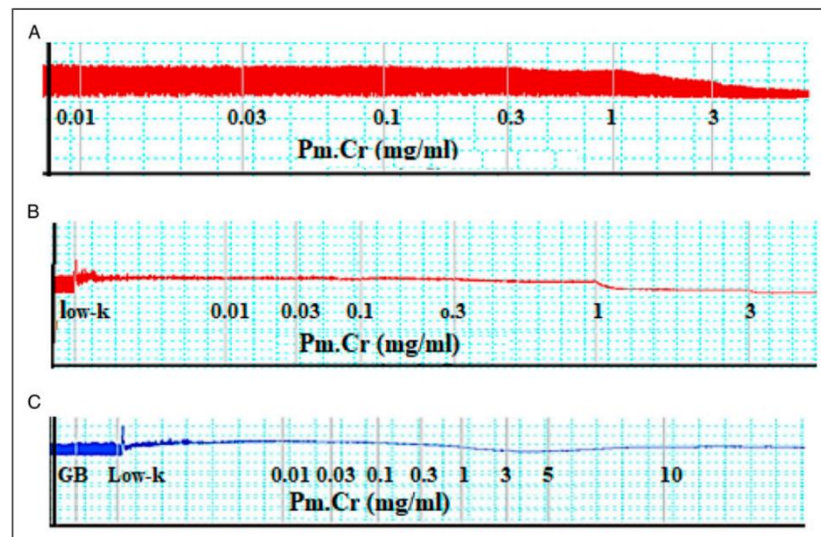
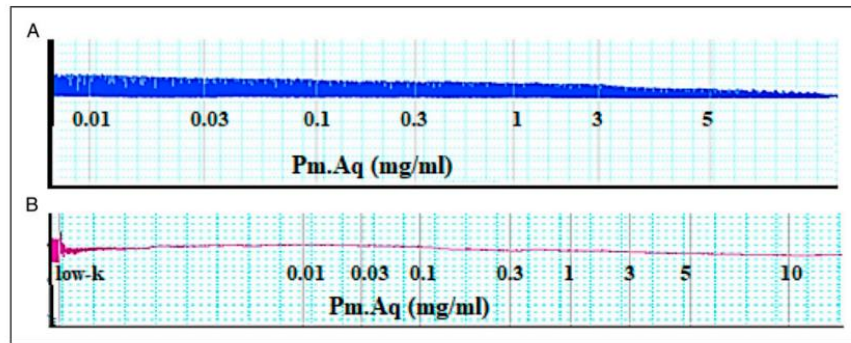
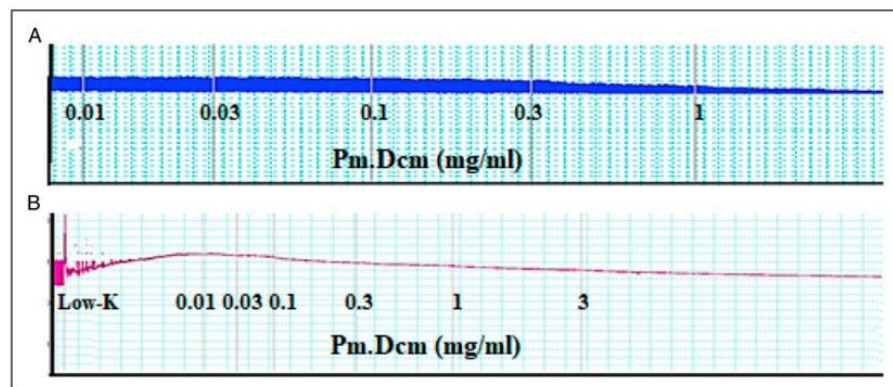


Figure 2. *Pm.Cr* extract effect on (A) natural (spontaneous) contractions (B) Low-K induced contractions (C) Low-K induced contractions pre-treated with  $3 \mu\text{M}$  glibenclamide.

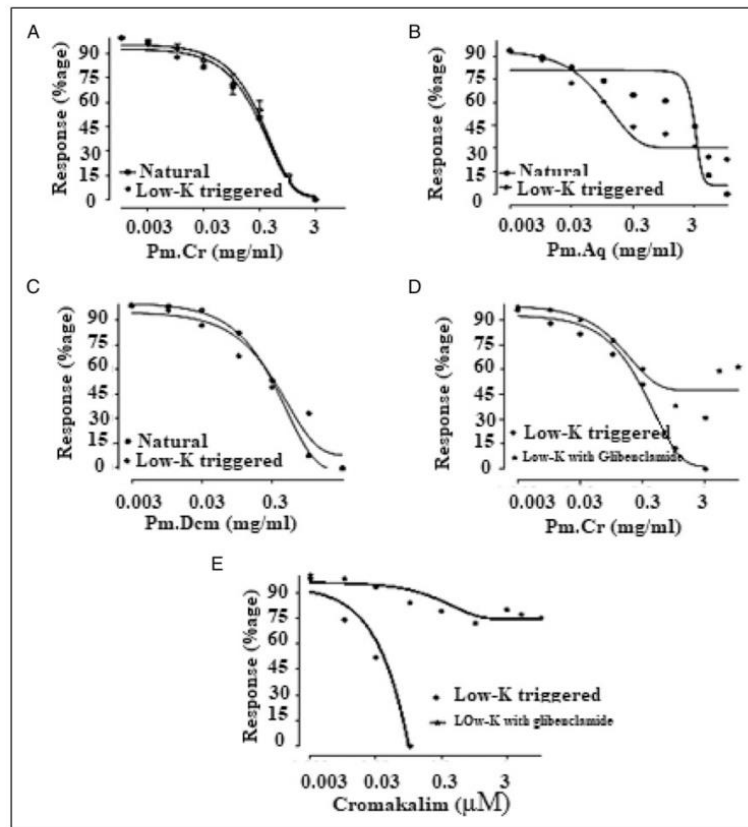


**Figure 3.** *Pm.Aq* extract effect on (A) natural (spontaneous) contractions (B) Low-K<sup>+</sup> induced contractions.

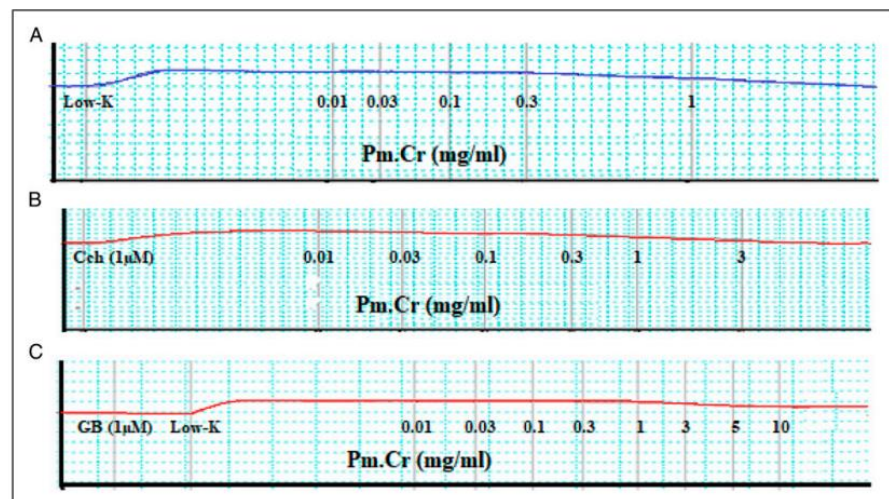


**Figure 4.** Impact of *Pm.Dcm* on (A) natural contractions in jejunum (B) on contractions triggered by Low-K<sup>+</sup>.

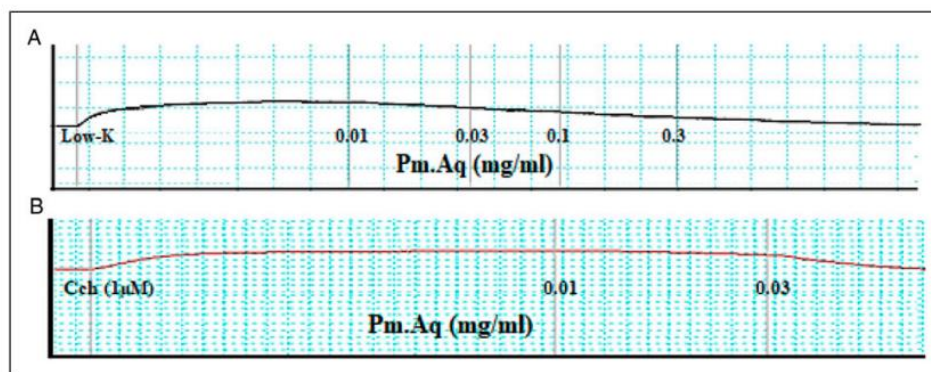




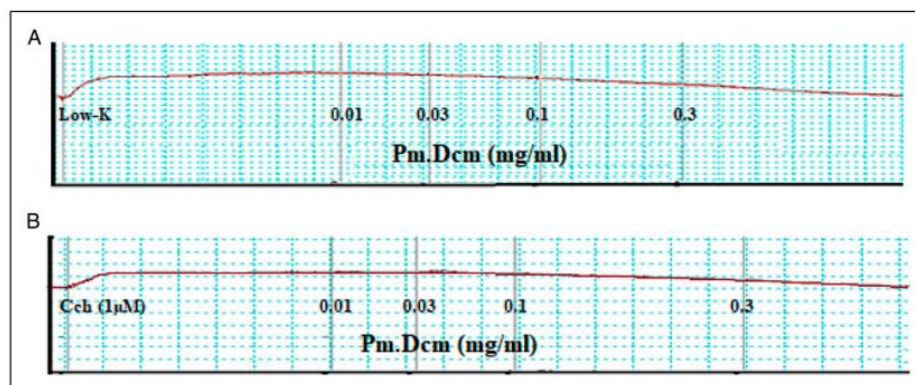
**Figure 5.** Graphical representation of sigmoidal dose response curves. (A) Pm.Cr (B) Pm.Aq (C) Pm.Dcm on natural (spontaneous) and Low-K<sup>+</sup> induced contractions (D) Pm.Cr in presence of 3 μM<sup>-1</sup> glibenclamide and (E) cromakalim effect low-K<sup>+</sup> triggered contractions in presence and absence of glibenclamide in isolated rabbit jejunum.



**Figure 6.** Effect of Pm.Cr on contractions triggered by (A) Low-K (B) CCh(1 μM) (C) Low-K with Glibenclamide in trachea.



**Figure 7.** Effect of Pm.Aq on contractions triggered by (A) Low-K (B) CCh(1  $\mu$ M) in trachea.



**Figure 8.** Effect of Pm.Dcm on contractions triggered by (A) Low-K (B) CCh(1  $\mu$ M) in trachea.

## Discuții

Plantele medicinale câștigă importanță la nivel mondial datorită potențialului lor terapeutic și lipsei de efecte secundare. Pe baza utilizării tradiționale a *Panicum miliaceum* în tulburările hiperactive ale tractului gastrointestinal, respirator și cardiovascular, acest studiu a fost conceput pentru a evalua activitatea antidiareică, antispastică, antiastmatică și vasodilatatoare a extractului de plantă prin metode *in vitro*. Pentru a obține o înțelegere a mecanismelor, au fost utilizate jejunul, traheea și aorta de iepure izolate.

S-a observat că plantele prezintă efecte inhibitorii prin activarea canalului de  $K^+$ . Utilizarea depolarizării induse de  $K^+$  scăzut determină deschiderea canalelor de  $K^+$ . Datorită prezenței canalelor

de K<sup>+</sup> în celulele intestinale și epiteliale, deschizătorii de canale de K<sup>+</sup> produc relaxarea mușchilor netezi prin scăderea calciului intracelular prin hiperpolarizarea membranei.

Pentru a evalua dacă efectul inhibitor al Pm.Cr se datorează implicării canalelor de K<sup>+</sup>, acesta a fost testat pe contracții stabilizate ale jejunului declanșate de K<sup>+</sup> scăzut, unde a cauzat relaxare completă. Răspunsul spasmodic observat poate fi datorat deschiderii canalelor de potasiu. Mai mult, această activitate antispasmodică poate fi atribuită prezenței flavonoidelor (catechină, quercetină), alcaloizilor, taninurilor și quercetinei, care sunt detectate prin screening fitochimic preliminar și studii HPLC. Această activitate de deschidere a canalului de K<sup>+</sup> s-a dovedit a fi mai dominantă în fracția organică în comparație cu fracția apoasă. Medicamentele care deschid canalele de potasiu au o utilizare terapeutică larg răspândită în tulburările gastrointestinale, cum ar fi diareea, în sistemul cardiovascular ca antihipertensive și ca bronhodilatatoare în bolile căilor respiratorii hiperactive, cum ar fi astmul și tusea.

Cromakalimul (deschizător de canal K<sup>+</sup> dependent de ATP) a inhibat contracțiile induse de K<sup>+</sup> scăzut. Pentru a confirma mecanismul de activare a canalului de K<sup>+</sup>, contracțiile declanșate de K<sup>+</sup> scăzut, pretratate cu glibenclamidă, au fost testate cu doze de extract care i-au inhibat efectul relaxant, având un model similar cu cromakalim, confirmând deschiderea canalului K<sup>+</sup>-ATP.

Pentru a verifica efectul său bronhodilatator, Pm.Cr a fost aplicat pe contracții declanșate de K<sup>+</sup> scăzut și CCh. Pm.Cr a început o reducere a contracțiilor declanșate de K<sup>+</sup> scăzut și CCh, fiind mai puternic împotriva K<sup>+</sup> scăzut. Rezultatele au sugerat că activitatea bronhodilatatoare se datorează mecanismului de deschidere a canalului de K<sup>+</sup>. În plus, flavonoidele au efecte bronhodilatatoare puternice, iar prezența flavonoidelor este confirmată prin screening fitochimic preliminar și HPLC.

Medicamentele care deschid canalele de potasiu au o utilizare terapeutică larg răspândită în hipertensiune arterială. Pm.Cr a fost investigat în continuare pentru posibile efecte asupra sistemelor cardiovasculare. Pm.Cr a fost aplicat pe contracții declanșate de K<sup>+</sup> scăzut și PE în aorta izolată. Pm.Cr a dus la relaxarea contracțiilor declanșate de K<sup>+</sup> scăzut și PE. Relaxarea contracțiilor de K<sup>+</sup> scăzut a arătat o inhibare semnificativă în țesuturile pretratate cu GB, ceea ce confirmă influența canalelor K<sup>+</sup>-ATP ca mod de vasodilatație utilizat pentru tratamentul hipertensiunii arteriale. Catechina este utilizată

în tratamentul hipertensiunii arteriale, în timp ce acidul galic acționează ca protector cardiac în problemele cardiovasculare.

În diareea indusă de ulei de ricin, Pm.Cr a arătat un efect antidiareic similar cu cromakalimul, care are activitate spasmodică și antidiareică. Uleiul de ricin crește lichidul intestinal și promovează diareea din cauza constituentului său activ, acidul ricinoleic (hidroliza uleiului), și produce contracții în colon. Proprietățile antidiareice detectate ale extractului de plantă pot fi datorate implicării canalelor de potasiu, care au fost reduse prin pretratarea cu glibenclamidă (GB; un blocant al canalelor K<sup>+</sup> dependente de ATP). Activitatea antidiareică observată poate fi datorată prezenței flavonoidelor (catechină și quercetină), taninurilor și terpenoizilor prezenți în extract.

### Concluzie

Studiile *in vitro* și *in vivo* ale *Panicum miliaceum* L. au relevat activitățile antispastice, bronhodilatatoare, vasodilatatoare și antidiareice. Activitățile puternice antispastice, antidiareice, bronhodilatatoare și vasodilatatoare sunt probabil mediate datorită deschiderii canalelor de K<sup>+</sup> dependente de ATP. Aceasta oferă o bază importantă pentru utilizarea sa tradițională în afecțiunile tractului gastrointestinal, respirator și cardiovascular.

## Capitolul 2. Evoluție și dezvoltare profesională

### 2.1. Dezvoltarea carierei profesionale

Întreaga activitate didactică de 28 de ani s-a desfășurat în cadrul Catedrei de Medicină Internă, acum Departamentul de Specialități medicale și chirurgicale al Facultății de Medicină din Brașov. Am absolvit Facultatea de Medicină generală din Craiova în anul 1993, cu media 9,78. După anul de stagiatură în centrul universitar din Craiova, în urma susținerii examenului național de rezidențiat, am devenit medic rezident în noul centru universitar Brașov. În perioada ianuarie 1995 – decembrie 2000 am urmat modulele de pregătire în rezidențiat în centrul universitar Brașov. Am obținut diploma de medic specialist în centrul universitar Cluj-Napoca în sesiunea octombrie 2000 cu media 9.30 (confirmare prin Ordinul Ministrului Sănătății nr. 1011/200). În 2005 am obținut diploma de medic primar cu media 9.77 (Ordinul Ministrului Sănătății nr. 971/2005). După obținerea certificării de medic specialist în 2000 am primit integrare clinică pe secția Medicină Interne 1 a Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov, unde activez și în prezent. Între timp am ocupat funcția de director medical în perioada septembrie 2015-aprilie 2019. Începând cu iunie 2024 conduc Secția Clinic[Medicină Internă 1.

Cariera mea academică a început în anul 1995 ca preparator universitar la Facultatea de Medicină a Universității Transilvania din Brașov, unde mi-am desfășurat activitatea (lucrări practice de medicină internă) sub supervizarea doamnei prof. dr. med. Mariana Rădoi. În anul 2000 am promovat prin concurs ca asistent universitar, în anul 2012 am promovat prin concurs ca șef de lucrări și am predat cursuri la următoarele programe de studii de licență ale Facultății de Medicină: Medicină internă-anul IV și V, Asistență medicală generală anul II și III, Laborator clinic anul II, Balneofiziokinetoterapie anul III. Din anul 2017, ca o recunoaștere a calității activității mele didactice și științifice, am devenit conferențiar universitar.

În tot acest timp am desfășurat activitate didactică, cursuri și lucrări practice de Medicină internă cu studenții programului de studii Medicină, Laborator clinic și Asistență medicală generală și Reumatologie cu studenții programului de studii Balneofiziokinetoterapie.

Am depus toate eforturile pentru ca noțiunile însușite de studenți la cursuri și lucrări practice să constituie o bază solidă necesară viitoarei activități medicale. Proiectarea didactică a fost fundamentată pe achiziții anterioare de învățare ale studenților asigurând caracterul aplicativ al proiectării curriculare pentru disciplinele. Asigurarea caracterului aplicativ al proiectării curriculare l-am realizat prin includerea strategiilor didactice axate pe formarea competențelor prevăzute de programă, prin includerea conținuturilor care să îmbine aspectele teoretice cu cele practice promovând astfel interdisciplinaritatea. Am promovat în activitatea didactică metodele de învățare activ-participative centrate pe student, individualizarea procesului de învățământ în funcție de nevoile studenților, învățarea și încurajarea studenților să își evalueze propriile performanțe. În sprijinul procesului de învățare am pus la dispoziția studenților pe platforma de e-learning în format electronic materiale educaționale și resurse didactice actualizate continuu.

În fiecare an am coordonat lucrări de finalizare a studiilor la toate programele de studii la care am susținut activități didactice, majoritatea fiind apreciate cu calificativ maxim de către comisiile de licență, iar unele dintre lucrări fiind premiate în cadrul sesiunilor de comunicări științifice studentești.

De asemenea, în fiecare an am făcut parte din comisia de evaluare a lucrărilor de licență la programul de studii Medicină, comisiile de susținere a examenelor de medic specialist, respectiv primar pentru specialitatea medicină internă.

Activitatea mea educațională este apreciată de către studenți în anul universitar 2022-2023 fiind încununată cu nominalizarea în competiția *Cel mai apreciat profesor*.



## 2.2 Teza de doctorat și alte proiecte de cercetare

Lucrarea de doctorat a fost elaborată sub îndrumarea d-lui Prof. Dr. George Ioan Pandelescu, de la UMF „Gr. T. Popa” Iași și a evaluat relația dintre prezența markerilor de activare plachetară și evoluția cu evenimente trombotice recurente (arteriale, venoase și multiple) la pacienții cu sindrom antifosfolipidic primar și secundar. De asemenea, o atenție deosebită s-a acordat evaluării markerilor de inflamație fibrinogen și hsPC, rezultatele sugerând existența unui statut inflamator redus în sindromul antifosfolipidic, deși boala a fost definită ca o boală autoimună noninflamatorie. Rezultatele au fost mai întâi comunicate la International Congress on Autoimmunity 2010,2012, . EULAR Congress și ulterior publicate și citate în reviste de prestigiu pentru domeniul medical.

Teza de doctorat s-a intitulat Markerii de activare plachetară în sindromul antifosfolipidic, o entitate descrisă cu 22 de ani înainte de Graham Hughes. La acel moment, sindromul antifosfolipidic, această nouă entitate clinică, era deja privită ca una dintre cele mai comune boli autoimune. Impactul acestei descrieri asupra lumii medicale a fost major, fiind recunoscut beneficiul tratamentului anticoagulant în locul tratamentului cu steroizi sau AINS la pacienții cu boli de țesut conjunctiv și schimbând fundamental gândirea medicală. La momentul acela, în care am început teza de doctorat, erau deja standardizate tehnicile de determinare a anticorpilor antifosfolipidici (anticardiolipinici, anticoagulant lupic și anti-beta2-glicoproteina I), erau definite ca diagnostice titrurile moderat-înalte ale anticorpilor anticardiolipinici. și era stabilit intervalul optim pentru controlul INR între 2,5-3,5.

La acel moment asistam la un adevărat paradox în ceea ce privește rolul anticorpilor antifosfolipidici: constituiau un criteriu esențial de diagnostic, dar nu își dovediseră în studiile prospective rolul de factor de risc independent pentru evoluția cu evenimente trombotice recurente. Mai mult decât atât, precum în alte boli cu mecanism autoimun (poliartrita negativă,



lupusul eritematos sistemic) fusese definită o nouă entitate clinică, sindromul antifosfolipidic seronegativ. Existau deja studii publicate care sugerau posibilitatea întreruperii tratamentului anticoagulant la pacienții care prezentau serologie repetat negativă dar acest lucru nu este recunoscut în ghidurile de tratament.

Teza de doctorat s-a dorit o încercare de stratificare a riscului trombotic la pacienții cu sindrom antifosfolipidic evaluând markerii de activare plachetară, al căror rol în patogenia complexă a acestei boli este deja recunoscut. Au fost studiați doi markeri de activare plachetară Pselectina și sCD40L, realizând o determinare seriată prin două tehnici Elisa și flow-citometrică. Markerul de activare plachetară ar fi reprezentat un factor de risc independent în evaluarea riscului de tromboză la pacienții cu sindrom antifosfolipidic.

O multitudine de articole subliniau necesitatea analizării factorilor de risc adiționali pentru tromboză mai ales la pacienții cu SAF care nu asociau LA prezent pentru a obține cele mai bune informații clinice privind riscul trombotic. În acest studiu au fost identificați doi astfel de factori de risc: Pselectina și sCD40L. Am analizat în acest studiu doar doi astfel de potențiali markeri de activare, fără a exclude posibilitatea utilității altor potențiali markeri de activare în sindromul antifosfolipidic.

Și în prezent precierea riscului trombotic este cu atât mai dificilă la pacienții cu manifestări clinice sugestive pentru sindromul Hughes care prezintă repetat absența anticorpilor antifosfolipidici, la care diagnosticul poate fi de sindrom antifosfolipidic seronegativ. În cazul poliartritei reumatoide și al lupusului eritematos diagnosticul poate fi precizat însă și în absența factorului serologic, situație complet diferită de a sindromului antifosfolipidic, în care serologia negativă nu permite clasificarea pacienților conform consensului în vigoare. Criteriile de la Sapporo utilizate în prezent fiind criterii de clasificare și nu de diagnostic, este permisă astfel formularea diagnosticului de sindrom antifosfolipidic seronegativ în cazurile cu simptomatologie înalt sugestivă și serologie negativă. Folosirea combinată a Pselectinei și

sCD40L ar fi constituit un aport suplimentar în evaluarea riscului trombotic la pacientul cu sindrom antifosfolipidic seronegativ.

Determinarea markerilor de activare plachetară era de asemenea foarte importantă în evaluarea riscului trombotic la pacienții asimptomatici cu persistență a pozitivității aCL care constituiau și constituie și în prezent o controversă terapeutică. În prezent la acești pacienți se evaluează riscului individual de tromboză, luând în considerare factorii de risc congenitali sau dobândiți pentru tromboză, asocierea unei boli autoimune (mai ales a lupusului eritematos sistemic), și profilul anticorpilor antifosfolipidici (LA; IgG și / sau anti-β2-GPI în titru moderat mare) pentru a lua în considerare inițierea tratamentului profilactic primar pentru tromboză. Teza de doctorat a fost apreciată atât de conducătorul de doctorat dl. prof. univ. dr. George Ioan Pandele, cât și de comisia științifică formată din prof. univ. dr. Doina Azoicăi, prof. univ. dr. Minerva Muraru și prof. univ. dr. Viorel Stoica, drept o lucrare de un real interes științific și practic.

Am participat, în calitate de membru al echipei de cercetare la 3 proiecte de cercetare științifică câștigate prin competiție:

Granturi și contracte de cercetare științifică

a. internaționale 2007-2011 "De la teorie la practică în medicină"

contract nr. POSDRU/22/2.1/G/36443

Participare în cadrul proiectului "De la teorie la practică în medicină" ID 36443, Axa prioritară: 2 "Corelarea învățării pe tot parcursul vieții cu piața muncii", Domeniul major de intervenție: 2.1-"Tranziția de la școală la viața activă", Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane, 999999 contract nr. POSDRU/22/2.1/G/36443

b. naționale

Participarea la proiectul de cercetare cod 402 CNCIS cu titlul: Infecția cu Chlamydia pneumoniae în sindroamele coronariene acute, stroke și ocluzia aterotrombotică a membrelor inferioare (conducător științific prof. Mariana Radoi). (perioada 200-2003)

Participare Proiect PN II, IDEI, nr. 727/2008, Evaluarea eficienței agenților terapeutici cu mecanisme complementare de reducere a stresului oxidativ, a activării plachetare și a statusului procoagulant în sindroamele coronariene acute. (perioada 2008-2011).

Proiect cu terți Trombofilia genetica, un factor de risc protrombotic in sindromul antifosfolipidic. Valoare de 10030 euro, director de proiect.

Între 2000-2003 am participat ca membru în Grantul CNCIS, contract 3993/14.06.2000, „Infecția cu Chlamydia Pneumoniae ca factor de risc pentru sindroamele coronariene acute, accidentul vascular cerebral și boala arterială periferică”, coordonat de doamna Prof. Dr. Mariana Radoi. CP a fost detectată prin prin imunohistochimie și serologie, precum și evaluarea imunologică a pacienților cu sindroamr coronariene acute și a accidentelor vasculare cerebrale.

Studiul a evaluat incidența evenimentelor cardiovasculare majore (MACE) moarte cardiovasculară, infarct miocardic non-fatal, angină instabilă cu readmitere - după 30 de zile, 6 luni, 1 an, 2 ani și 3 ani de evoluție, la pacienții cu sindroame coronariene acute (ACS), cu sau fără infecție CP, așa cum a fost apreciată serologic. Obiectivele secundare au fost: 1) Evaluarea relației dintre infecția CP și inflamația sistemică (fibrinogen, proteină C reactivă, IL6, TGF- $\beta$ ), concentrația serică de T troponină, titrul anticorpilor anti-oxLDL și relația dintre infecția CP și factorii de risc aterosclerotici tradiționali; 2) studiul incidenței infecției CP în leziunile aterosclerotice instabile și corelarea infecției CP cu severitatea leziunilor aterosclerotice și cu evenimentele celulare implicate în instabilitatea plăcii; 3) evaluarea impactului asocierii tratamentului cu macrolide la tratamentul convențional al ACS asupra incidenței MACE după 3 luni, 6 luni și 4 ani de evoluție la pacienții cu ACS.

Dintre rezultatele studiului menționez: 1) Incidența infecției cu CP la pacienții cu ACS a fost semnificativ crescută, atât prin evaluarea serologică, cât și prin evaluarea imunohistochimică; 2) Prezența și persistența anticorpilor anti-CP la 30 de zile și titrul IgG anti-CP  $>1/1024$  UI/ml la momentul inițial au avut cea mai mare valoare prognostică pentru evoluția pe termen scurt, mediu și lung cu MACE; 3) Marcajele histologice ale infecției CP sunt implicate în promovarea instabilității leziunilor aterosclerotice, independent de expresia marcajelor histologice pentru activarea celulară, și în relație directă cu necroza miocardică; 4) Tratamentul cu Rovamicină® 12 sau 24 de zile adăugat la terapia convențională a sindroamelor coronariene acute este benefic pentru evoluția pe termen mediu și lung prin reducerea incidenței MACE la 6 luni și la 4 ani.

Datele serologice și imunohistochimice au evidențiat o incidență crescută a infecției cu CP în sindroamele coronariene acute, rezultate publicate și de alte studii la acel moment, conturându-se astfel reproductibilitatea cercetării. Datele studiului au conturat valoarea serologiei CP și relația ei cu dislipidemia ca mecanism indirect prin care CP favorizează inflamația sistemică.

Incidența crescută semnificativ a CD14 în plăcile aterosclerotice de gradul V și VI a fost raportată pentru prima dată aici și apoi a fost confirmată de numeroase studii publicate ulterior. Cercetarea aceasta a adus de asemenea suficiente date pentru demonstrarea efectului benefic al tratamentului cu macrolide în sindroamele coronariene acute.

Mariana Rădoj, Elena Bobescu, Ioana Agache, Claudia Timu; "Serological status for Chlamydia Pneumoniae, systemic inflammation and one month evolution of patients with unstable angina"; First International Symposium on PPARs: from basic science to clinical applications. Florence, April 4-7, 2001

Mariana Rădoi, Ioana Agache, Mariana Anghel, Marius Penciu, Elena Bobescu, Claudia Timu, Diana Tânt; "CD 14 receptor expression in unstable coronar atherosclerotic lesions"; Clinical and Experimental Rheumatology 22; pg. 21; 2004

Mariana Rădoi, Elena Bobescu, Diana Țânț, Mirela Șerbănoiu, Ioana Agache, Claudia Timu, T. Alexandru, Maria Anghel, Ioana Rusu; "Incidența infecției cu Chlamydia Pneumoniae în sindroamele coronariene acute"; Revista Națională de Cardiologie, 2000

Mariana Rădoi, Elena Bobescu, Ioana Agache, Claudia Timu, Mirela Șerbănoiu; "Status-ul serologic pentru Chlamydia pneumoniae, inflamația sistemică și evoluția la o lună a pacienților cu angină instabilă" Revista Română de Cardiologie, 2001, vol. XIV, nr.3, pg. 54-55

Elena Bobescu, Ioana Agache, Mariana Rădoi, Claudia Timu, Diana Tânt. "Persistența infecției cu Chlamydia Pneumoniae și valorile plasmatice ale colesterolului, PCR, fibrinogen, IL6, TGF beta, status-ul antioxidant total și sindroamele coronariene acute"; Revista Română de Cardiologie, vol. XVII, nr.3 ; pg.69; 2002

Mariana Rădoi, Ioana Agache, Mariana Anghel, Marius Penciu, Elena Bobescu, Claudia Timu, Diana Tânt; "Aterotromboza coronariană în relație cu activarea celulară evaluată imunohistochimic prin expresia receptorului CD14"; Revista Română de Cardiologie, vol. XVIII, nr. 3; pg. 110; 2003

Încă din primii ani de activitate profesională am participat ca investigator sau co-investigator la numeroase trialuri clinice fapt ce m-a ajutat în formarea deprinderilor de management și de etică ale cercetării:

Studii clinice, investigator principal

1. SkyePharma AG, Protocol nr. SKY2028-3-005 A Randomized, Double-blind, Active-controlled, Parallel Group, Stratified, Multi-center, 12-Week Study Comparing the Safety and Efficacy of Fluticasone and Formoterol Combination twice daily in a single inhaler

with the Administration of Fluticasone alone in Adolescent and Adult Patients with Moderate to Severe Asthma. 2007.

2. Cerexa Protocol NR P903-08 Studiu de fază 3, multicentric, randomizat, dublu-orb, comparativ pentru evaluarea siguranței și eficacității medicamentului Ceftaroline versus Ceftriaxonă, cu adăugarea Claritromicinei, în tratamentul subiecților adulți cu pneumonie dobândită în comunitate.

3. KRKA. Protocol KKL172014. Phase III international randomized, double-blind, 10 weeks multi-factorial clinical study to assess the efficacy and safety of olmesartan medoxomil/amlodipine fixed combination in patients with grade 1 to grade 2 arterial hypertension.2014.

4. Chiesi Protocol Tristar CCD-05993AA1-07. A Multinational, Multicentre, Randomised, Open-Label, Active-Controlled, 26-Week, 2-Arm, Parallel Group Study to Evaluate the Non-Inferiority of Fixed Combination of Beclometasone Dipropionate Plus Formoterol Fumarate Plus Glycopyrronium Bromide Administered Via pMDI (CHF 5993) Versus Fixed Combination Of Fluticasone Furoate Plus Vilanterol Administered Via DPI (Relvar®) Plus Tiotropium Bromide (Spiriva®) for the Treatment of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease.2015-2016.

#### Studii clinice subinvestigator

5. Pfizer. SMILE study phase III: The effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor zofenopril on mortality and morbidity after anterior myocardial infarction. 1995-1997.

5. Smith Kline Beecham Pharmaceuticals. Protocol 25000/547. An open, non comparative multicentre study to assess the efficacy safety of oral Augmentin SR 2000/125 mg twice daily for 7 days for the treatment of bacterial community acquired pneumonia in adults.

7. DUAAL phase IV study: Double Blind Atorvastatin Amlodipine that assessed the effect Of Amlodipine, Atorvastatin And The Combination On Transient Myocardia Ischemia In Coronary Artery Disease. 2001-2007.
8. SENIORS trial. An phase III, open, multicentre study to assess the efficacy and safety of nebivolol in elderly heart failure patients with impaired renal function. 2002-2004.
9. SCOUT trial. An phase III randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial, that assess the Effect of Sibutramine on Cardiovascular Outcomes in Overweight and Obese Subjects. 2003-2009.
10. Chiesi Protocol CCD-06302AA1-01 Phase 2, Randomised, Double Blind, Placebo-controlled, Incomplete Block, 3-way Cross-over Study to Evaluate Efficacy and Safety of 4 Doses of Glycopyrronium Bromide (CHF5259) DPI in Moderate to Severe Patients With COPD. 2007-2008
11. AMAG-FER=IDA-302. Protocol: A Phase III, Randomized, Open-label, Active-Controlled Trial Comparing Ferumoxytol with Iron Sucrose for the Treatment of Iron Deficiency Anemia. 2011.

### 2.3 Recunoașterea națională și internațională

Sunt membră a Societății Române de Medicină Internă și Uniunii Medicale Balcanice.

Din 2016 sunt referent științific la *Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Series VI: Medical Sciences* ([https://webbut.unitbv.ro/index.php/Series\\_VI/Editorial\\_Board](https://webbut.unitbv.ro/index.php/Series_VI/Editorial_Board)) și la *Jurnalul Medical Brașovean*, ambele reviste fiind indexate în baze de date internaționale (<https://webbut.unitbv.ro/index.php/jmb/about/editorialTeam>).

Recunoașterea internațională este concretizată prin numărul lucrărilor științifice publicate în reviste cu vizibilitate ridicată în bazele de date internaționale: 15 articole în ISI Web of Science având 116 de citări cu un index Hirsch de 6.

**CG**

**Claudia Gavris** ✓  
(Gavris, Claudia Mihaela)

**Identifiers** Web of Science  
ResearcherID: AAG-9553-2020

**Published names** Gavris, Claudia Gavris, Claudia Mihaela Gavris, C.

**Organizations** Transylvania University of Brasov  
Clin Emergency Cty Hosp  
Clin Emergency Cty Hosp Brasov  
Brasov Cty Emergency Hosp

**Subject Categories** Chemistry; Engineering; Pharmacology & Pharmacy; Research & Experimental Medicine; Biochemistry & Molecular Biology

**Metrics** ← Open dashboard

**Profile summary**

15	Total documents
15	Publications indexed in Web of Science
15	Web of Science Core Collection publications
0	Preprints
0	Dissertations or Theses
0	Non-indexed publications
0	Verified peer reviews
0	Verified editor records

**Web of Science Core Collection metrics**

6	15
H-Index	Publications
116	107
Sum of Times Cited	Citing Articles

## 2.4 Experiența de management și conducere

În perioada 2015-2019 am fost aleasă în funcția de director medical al Spitalului Clinic Județean de Urgență din Brașov, În această perioadă am coordonat, din partea spitalului echipa care a lucrat la scrierea proiectelor ce au fost finanțate prin Programul Operațional Regional 2014 – 2020 privind dotarea Ambulatoriului și a Unității de Primiri Urgențe.

Proiectul *Dotarea cu echipamente și aparatură medicală a Ambulatoriului Integrat al Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov* finanțat prin Programul Operațional Regional 2014 – 2020, a fost elaborat și implementat împreună cu reprezentanții Consiliului Județean Brașov.



Am identificat și prioritizat nevoile de echipamente medicale pentru ambulatoriul spitalului și am pus bazele ambulatoriului integrat dotat cu echipamente fapt ce a condus la scăderea numărului de pacienți internați în 3 secții ale Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov (medicină internă, cardiologie și ortopedie și traumatologie) între 4% - 25% iar 12 cabinete au fost dotate cu echipamente, aparatură medicală și mobilier de specialitate.

Proiectul a avut ca obiectiv creșterea calității serviciilor medicale și a accesibilității la servicii de îngrijire medicală primară în regim ambulatoriu. Scopul proiectului este de a contribui la eficientizarea sistemului de sănătate din județul Brașov, prin reducerea internărilor evitabile în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Brașov, cât și la accesibilizarea ofertei de servicii de asistență în cadrul Ambulatoriului.

Valoarea totală a proiectului a fost de 10.699.095,67 lei.

### **(B-ii) Planuri de evoluție și dezvoltare a carierei**

Pe viitor, consider că este o prioritate îmbinarea activității didactice cu activitatea de cercetare și activitatea clinică, întrucât acești trei piloni indispensabili ai excelenței profesionale lucrează împreună pentru a crea o identitate profesională de succes. Dezvoltarea profesională medicală include competență profesională, identitate profesională și bune abilități de predare. Am încercat să-mi ghidez viitorul plan de dezvoltare după o privire profundă în interiorul aspirațiilor personale, punctelor forte, valorilor, priorităților, rolurilor actuale și priorităților personale și ale departamentului.

## Plan de dezvoltare a carierei profesionale

Specialitatea de medicină internă se află într-o continuă transformare, orientându-se spre inovații care îmbunătățesc calitatea îngrijirii pacienților și personalizează tratamentele. În cei 30 de ani de când profesez, direcțiile de dezvoltare a fost de de la medicina bazată pe dovezi către medicina personalizată, medicina bazată pe dovezi rămânând baza medicinei moderne.

Principalele direcții de dezvoltare au fost:

- includerea metaanalizelor și ghidurilor internaționale standardizate, bazate pe dovezi, pentru crearea unui standard unitar pentru îngrijirea pacienților;
- creșterea volumului și calității studiilor clinice;
- tranziția de la o abordare generală, bazată pe ghiduri, către tratamente adaptate specific fiecărui pacient. Medicina personalizată începe să integreze date genetice pentru a ajusta tratamentele la caracteristicile genetice ale pacientului.
- utilizarea în practică a diagnosticului molecular avansat prin utilizarea tehnicii RT-PCR și variante, care permite diagnosticul etiologic al bolilor infecțioase (identificarea agenților patogeni bacterieni, virali, fungici și parazitari prin analiza secvențelor specifice de ADN sau ARN prin tehnica PCR), monitorizarea încărcăturii virale, identificarea mutațiilor genetice asociate cu cancerul, diagnosticul bolilor genetice ereditare (ex. fibroza chistică), evaluarea riscului trombotic în trombofilii etc;
- accesul la infrastructurile specializate pentru stocarea și gestionarea datelor imagistice (PACS), care permit abordarea multidisciplinară a patologieilor
- telemedicina și monitorizarea la distanță, dispozitive portabile de monitorizare în gestionarea bolilor cronice.

Pentru dezvoltarea mea profesională în specialitatea de medicină internă mi-am propus:

- obținerea de noi competențe, cunoștințe și calificări în activitatea profesională din societățile profesionale din care sunt membru, printr-un proces de educație continuă;
- adaptare și consolidare prin experiența profesională personală și dobândirea permanentă de noi cunoștințe profesionale prin formare continuă în programe EMC;
- asigurarea permanentă a corelației dintre activitățile de cercetare, profesionale medicale și academice;
- organizarea, participarea și susținerea prezentărilor în calitate de speaker la workshop-uri, conferințe naționale și internaționale, pentru popularizarea și diseminarea rezultatelor cercetării în domeniile menționate; participarea constantă la alte manifestări științifice reprezintă o modalitate de perfecționare permanentă, de colaborare, de creștere a vizibilității și prestigiului personal și instituțional.
- dezvoltarea abilităților de comunicare cu pacienții pentru a crește satisfacția acestora și pentru a clarifica planurile de tratament.
- colaborarea interdisciplinară cu alte specialități medicale pentru un management integrat al pacientului și pentru a dezvolta abordări holistice în îngrijirea pacienților.
- dezvoltarea unor metode eficiente de organizare și planificare a activităților clinice și administrative.
- solicitarea feedbackului din partea colegilor și a pacienților pentru a identifica ariile ce necesită îmbunătățiri.
- dezvoltarea abilităților de mentor pentru rezidenți sau studenți la medicină.

Principalele strategii pentru atingerea acestor obiective de dezvoltare a activității clinice sunt:

1. Implementarea de protocoale bazate pe medicina personalizată: Extinderea utilizării datelor genetice în protocoalele clinice, colaborând cu laboratoare specializate în diagnostic molecular pentru a personaliza și mai mult tratamentele pacienților.

2. Utilizarea inteligenței artificiale: explorarea instrumentelor bazate pe inteligență artificială pentru analiza datelor medicale complexe (de ex. date clinice, imagistice și biometrice) pentru a contribui la o diagnosticare mai rapidă și mai precisă.

3. Dezvoltarea de protocoale multidisciplinare:

4. Crearea unor echipe multidisciplinare care să abordeze holistic cazurile complexe, cu accent pe integrarea telemedicinii pentru consultații și monitorizare la distanță.

5. Training continuu în noile tehnologii: Participarea la formări axate pe utilizarea noilor tehnologii (PACS, dispozitive portabile, RT-PCR) și organizarea de sesiuni de formare pentru personalul medical de specialitate și rezidenți, sporind competențele echipei.

## Plan de dezvoltare a activității didactice

### Dezvoltarea competențelor didactice

- Inovarea metodelor de predare: Introducerea de noi tehnici de predare, utilizarea tehnologiei educaționale și îmbunătățirea experienței de învățare pentru studenți, folosirea de noi instrumente pentru învățarea interactivă cum ar fi tutoriale pentru facultate ;
- promovarea unui sistem educațional modern axat pe activități didactice activ-participative care să asigure formarea competențelor medicale;
- coordonarea lucrărilor de licență și oferirea unui suport constant pentru formarea tinerilor cercetători.
- crearea de noi cursuri și programe, dezvoltarea de cursuri noi, la nivel de licență, masterat sau doctorat, care să răspundă nevoilor pieței muncii și cerințelor științifice contemporane.
- corelarea și armonizarea continuă a conținutului cursurilor cu curricula europeană și internațională;
- menținerea unor standarde de calitate ridicate a activității didactice prin asigurarea coerenței și actualității planurilor de învățământ și a fișelor disciplinelor, respectarea planificării activităților didactice, evaluarea internă a calității predării și corectarea deficiențelor identificate;
- planificării activităților didactice, evaluarea internă a calității predării și corectarea deficiențelor identificate;
- asigurarea unui feed-back permanent cu privire la cunoștințele oferite și metodele de predare utilizate în cadrul disciplinelor predate;
- creșterea gradului de utilizare a tehnologiilor moderne de predare și utilizarea platformei e-learning;
- coordonarea studenților/masteranzilor/medicilor rezidenți/doctoranzilor în vederea participării la conferințe naționale și internaționale
- diseminarea rezultatelor cercetării împreună cu studenții, doctoranzii și medicii rezidenți pe care îi coordonez la conferințe, respectiv în publicații naționale/internaționale stimulându-le aptitudinile de cercetare, asigurând astfel și o corelație între activitatea didactică și cea de cercetare

- Creșterea vizibilității internaționale: Implicarea în rețele și consorții academice internaționale pentru a consolida poziția de expert în domeniu.

### 3. Plan de dezvoltare pentru activitatea de cercetare

Conform standardelor actuale cercetarea și diseminarea rezultatelor cercetării au devenit obligatorii pentru întreaga comunitate academică din România. Performanța în cercetarea științifică trebuie să fie în strânsă corelație cu activitatea didactică și medicală.

Planul de dezvoltare a activității de cercetare va fi axat în continuare pe principalele linii directoare ale activității mele de cercetare în care am fost implicată până în prezent. În plus, în urma rezultatelor cercetărilor din ultimii ani s-au conturat două noi direcții, cea a medicinei interdisciplinare și cea a medicinei integrative,

Evaluarea riscului trombotic la pacienții cu sindrom antifosfolipidic este o temă complexă și în continuă evoluție, având în vedere natura heterogenă a bolii, pe care intenționez să o dezvolt în continuare, **noile direcții de cercetare emergente**, care se vor concentra pe integrarea markerilor biologici, a tehnicilor avansate de imagistică și a profilurilor genetice fiind:

-Definirea biomarkerilor avansați și profilurilor multimarker (subtipuri de anticorpi antifosfolipidici : evaluarea specifică a anticorpilor IgA sau a anticorpilor împotriva domeniului 1 a beta-2-glicoproteinei I, evaluarea semnificației biomarkerilor de diagnostic seronegativ) pentru a stratifica mai bine riscul trombotic.

-Evaluarea biomarkerilor inflamatori și procoagulanți precum trombomodulina, factorul tisular, neutrofilele și capcanele extracelulare (NETs) în asociere cu aPL.

-Metabolomică: Identificarea profilurilor metabolice asociate hipercoagulabilității la pacienții cu SAF.

-Studierea variantelor genetice asociate coagulării (de exemplu, factorul V Leiden, protrombina) sau răspunsului inflamator.

-Analiza modificărilor epigenetice (metilarea ADN, miARN) asociate riscului de tromboză.

-Integrarea riscului trombotic în contextul altor boli autoimune (de exemplu, lupus eritematos sistemic) sau al asocierii factorilor de risc cardiovascular.

-Identificarea factorilor infecțioși sau de mediu care pot declanșa evenimente trombotice.

-Utilizarea modelelor integrate de risc și inteligență artificială (IA) pentru dezvoltarea de algoritmi care integrează date clinice, imagistice și biomarkeri pentru a prezice riscul trombotic cu mai mare precizie prin analiza datelor complexe și identificarea patternurilor de risc.

#### **Pentru consolidarea expertizei academice și științifice îmi propun:**

- Crearea de noi baze de date pentru cercetare cu date clinice și genetice, respectând confidențialitatea, care să sprijine studiile longitudinale privind personalizarea tratamentelor.
- Aprofundarea cercetării: dezvoltarea și extinderea ariei de cercetare prin proiecte noi, abordări interdisciplinare și colaborări internaționale. Extinderea cercetării în medicina integrativă: colaborare cu specialiști din alte domenii (psihologie, nutriție, științe sociale) pentru a explora legătura între abordările complementare și medicina internă.
- Aplicarea și obținerea de finanțări pentru proiecte de cercetare relevante, atât la nivel național, cât și internațional. Aplicare de proiecte pentru finanțări și granturi de cercetare pe teme interdisciplinare (medicină moleculară și personalizată), care să permită dezvoltarea unor proiecte de mare anvergură.
- Creșterea numărului de publicații în reviste științifice de prestigiu, indexate în baze de date internaționale.
- Prezentarea rezultatelor cercetării în cadrul conferințelor internaționale și participarea la dezbateri academice de top pentru creșterea impactului în comunitatea academică și științifică
- Participarea activă în comitete științifice și editoriale ale unor reviste de renume, precum și în comisii de evaluare academică.
- Crearea unui mediu de mentorat pentru tinerii studenți și cercetători, pentru a stimula inovația și creșterea profesională.



- Organizarea de evenimente academice: Organizarea de workshop-uri, conferințe sau simpozioane științifice naționale și internaționale în domeniul de expertiză.
- Identificarea de granturi/burse de cercetare pentru viitorii studenți doctoranzi și sprijinirea lor pentru aplicarea la competiții științifice naționale și internaționale;
- Continuarea colaborării în echipe de cercetare în desfășurarea de studii clinice în domeniile de competență;
- Organizarea de evenimente științifice sub egida Universității Transilvania din Brașov;
- Dezvoltarea și promovarea revistelor la care sunt membru referent: *Bulletin of Transilvania University of Brașov. Series VI. Medical Sciences* și *Jurnal Medical Brașovean* prin creșterea vizibilității acestora prin includerea în noi baze de date internaționale și prin invitarea unor lideri de opinie medicală din alte universități din țară și străinătate de a publica articole în aceste reviste.

## (B-iii) Bibliografie

de Groot PG, Lutters B, Derksen RH, Lisman T, Meijers JC, Rosendaal FR. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005 Sep;3(9):1993-7. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01485.x. PMID: 16102105.

del Río García E, Rodríguez C, Rodríguez-Martorell J, Serrano A, Girón-González JA. Platelet and endothelial activation are requisites for the development of antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2004 May;63(5):600-1. doi: 10.1136/ard.2003.010694. PMID: 15082497; PMCID: PMC1755007.

Urbanus RT, Derksen RH, de Groot PG. Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev.* 2008 Mar;22(2):93-105. doi: 10.1016/j.blre.2007.09.001. Epub 2007 Oct 25. PMID: 17964017.

Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(6):230. doi: 10.1186/ar2536. Epub 2008 Dec 15. PMID: 19090981; PMCID: PMC2656223.

Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Lakos G, Tincani A, Kontopoulou-Griva I, Galeazzi M, Meroni PL, Derksen RH, de Groot PG, Gromnica-Ihle E, Baleva M, Mosca M, Bombardieri S, Houssiau F, Gris JC, Quéré I, Hachulla E, Vasconcelos C, Roch B, Fernández-Nebro A, Boffa MC, Hughes GR, Ingelmo M; Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002 Apr;46(4):1019-27. doi: 10.1002/art.10187. PMID: 11953980.

Salmon JE, de Groot PG. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 2008 May;17(5):405-11. doi: 10.1177/0961203308090025. PMID: 18490417; PMCID: PMC2693020.

Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2003 Oct 15;102(8):2717-23. doi: 10.1182/blood-2002-11-3334. Epub 2003 Jun 19. PMID: 12816875.

de Laat B, Wu XX, van Lummel M, Derksen RH, de Groot PG, Rand JH. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1490-4. doi: 10.1182/blood-2006-07-030148. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17053060.

Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, Marfisi RM, Finazzi G, Marchioli R, Wisloff F, Marziali S, Morboeuf O, Barbui T. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1178-83. doi: 10.1182/blood-2007-01-066043. Epub 2007 Apr 17. PMID: 17440049.

Wahl DG, Guillemain F, de Maistre E, Perret C, Lecompte T, Thibaut G. Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus--a meta-analysis. *Lupus*. 1997;6(5):467-73. doi: 10.1177/096120339700600510. PMID: 9229367.

Urbanus RT, Derksen RH, de Groot PG. Platelets and the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2008 Oct;17(10):888-94. doi: 10.1177/0961203308096344. PMID: 18827053.

Horstman LL, Jy W, Bidot CJ, Ahn YS, Kelley RE, Zivadinov R, Maghzi AH, Etemadifar M, Mousavi SA, Minagar A. Antiphospholipid antibodies: paradigm in transition. *J Neuroinflammation*. 2009 Jan 20;6:3. doi: 10.1186/1742-2094-6-3. PMID: 19154576; PMCID: PMC2640381.

Vega-Ostertag M, Harris EN, Pierangeli SS. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep;50(9):2911-9. doi: 10.1002/art.20434. PMID: 15457460.

Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Pérez C, Sáez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost.* 2006 Jan;95(1):94-9. PMID: 16543967.

Joseph JE, Donohoe S, Harrison P, Mackie IJ, Machin SJ. Platelet activation and turnover in the primary antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 1998;7(5):333-40. doi: 10.1191/096120398678920163. PMID: 9696137.

Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Machin SJ. Platelet activation markers and the primary antiphospholipid syndrome (PAPS). *Lupus.* 1998;7 Suppl 2:S48-51. doi: 10.1177/096120339800700212. PMID: 9814673.

Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol.* 2001 Nov;115(2):451-9. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.03101.x. PMID: 11703349.

Vega-Ostertag ME, Pierangeli SS. Mechanisms of aPL-mediated thrombosis: effects of aPL on endothelium and platelets. *Curr Rheumatol Rep.* 2007;9:190-197. Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A, Meroni PL. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood.* 2003;101:3495-3500.

Urbanus RT, Derksen RH, de Groot PG. Platelets and the antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2008 Oct;17(10):888-94. doi: 10.1177/0961203308096344. PMID: 18827053.

López-Pedrerera C, Buendía P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, Montiel-Duarte C, Torres A, Khamashta M, Velasco F. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-

activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum.* 2006 Jan;54(1):301-11. doi: 10.1002/art.21549. PMID: 16385547.

Kornberg A, Blank M, Kaufman S, Shoenfeld Y. Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anticardiolipin antibodies. *J Immunol.* 1994;153:1328–1332. López-Pedrerá C, Buendía P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, Montiel-Duarte C, Torres A, Khamashta M, Velasco F. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF- $\kappa$ B/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum.* 2006;54:301–311.

Sorice M, Longo A, Capozzi A, Garofalo T, Misasi R, Alessandri C, Conti F, Buttari B, Riganò R, Ortona E, Valesini G. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthritis Rheum.* 2007 Aug;56(8):2687-97. doi: 10.1002/art.22802. PMID: 17665396.

Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, Bossi F, Ziller F, Sblattero D, Meroni P, Tedesco F. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2340-6. doi: 10.1182/blood-2005-03-1319. Epub 2005 Jun 14. PMID: 15956288.

Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* 2005 Jul;52(7):2120-4. doi: 10.1002/art.21157. PMID: 15986360.

Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009 Jun;68(6):1030-5. doi: 10.1136/ard.2008.090670. Epub 2008 Jul 14. PMID: 18625630.

Pennings MT, Derksen RH, van Lummel M, Adelmeijer J, VanHoorelbeke K, Urbanus RT, Lisman T, de Groot PG. Platelet adhesion to dimeric beta-glycoprotein I under conditions of

flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein Ibalpha and apolipoprotein E receptor 2'. *J Thromb Haemost.* 2007 Feb;5(2):369-77. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02310.x. Epub 2006 Nov 10. PMID: 17096706.

Horstman LL, Jy W, Bidot CJ, Ahn YS, Kelley RE, Zivadinov R, Maghzi AH, Etemadifar M, Mousavi SA, Minagar A. Antiphospholipid antibodies: paradigm in transition. *J Neuroinflammation.* 2009 Jan 20;6:3. doi: 10.1186/1742-2094-6-3. PMID: 19154576; PMCID: PMC2640381.

Ferro D, Pignatelli P, Loffredo L, Conti F, Valesini G, D'Angelo A, Violi F. Soluble CD154 plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus: modulation by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 2004 May;50(5):1693-4. doi: 10.1002/art.20177. PMID: 15146442.

Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res.* 2003 May 16;92(9):1041-8. doi: 10.1161/01.RES.0000070111.98158.6C. Epub 2003 Apr 3. PMID: 12676820.

Joseph JE, Donohoe S, Harrison P, Mackie IJ, Machin SJ. Platelet activation and turnover in the primary antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 1998;7(5):333-40. doi: 10.1191/096120398678920163. PMID: 9696137.

Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Machin SJ. Platelet activation markers and the primary antiphospholipid syndrome (PAPS). *Lupus.* 1998;7 Suppl 2:S48-51. doi: 10.1177/096120339800700212. PMID: 9814673.

Proulle V, Furie RA, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS. *Blood.* 2014 Jul 24;124(4):611-22. doi: 10.1182/blood-2014-02-554980. Epub 2014 May 13. PMID: 24825863; PMCID: PMC4110663.

Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2013 Mar 14;368(11):1033-44. doi: 10.1056/NEJMra1112830. PMID: 23484830.

de Groot PG. Platelets as pivot in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):475-6. doi: 10.1182/blood-2014-06-576983. PMID: 25061169; PMCID: PMC4110653.

del Río García E, Rodríguez C, Rodríguez-Martorell J, Serrano A, Girón-González JA. Platelet and endothelial activation are requisites for the development of antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2004 May;63(5):600-1. doi: 10.1136/ard.2003.010694. PMID: 15082497; PMCID: PMC1755007.

Urbanus RT, Derksen RH, de Groot PG. Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev*. 2008 Mar;22(2):93-105. doi: 10.1016/j.blre.2007.09.001. Epub 2007 Oct 25. PMID: 17964017.

Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome: frequency, main causes and risk factors of mortality. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 May;6(5):296-300. doi: 10.1038/nrrheum.2010.47. Epub 2010 Apr 13. PMID: 20386563.

de Groot PG, Meijers JC.  $\beta(2)$ -Glycoprotein I: evolution, structure and function. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul;9(7):1275-84. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04327.x. PMID: 21535391.

Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2003 Oct 15;102(8):2717-23. doi: 10.1182/blood-2002-11-3334. Epub 2003 Jun 19. PMID: 12816875.

de Laat B, Wu XX, van Lummel M, Derksen RH, de Groot PG, Rand JH. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1490-4. doi: 10.1182/blood-2006-07-030148. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17053060.

Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B.  $\beta_2$ -Glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3453-9. doi: 10.1182/blood-2010-08-300715. Epub 2011 Jan 18. PMID: 21245481; PMCID: PMC3069681.

Wahl DG, Guillemin F, de Maistre E, Perret C, Lecompte T, Thibaut G. Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus--a meta-analysis. *Lupus*. 1997;6(5):467-73. doi: 10.1177/096120339700600510. PMID: 9229367.

Emmi L, Bergamini C, Spinelli A, Liotta F, Marchione T, Caldini A, Fanelli A, De Cristofaro MT, Dal Pozzo G. Possible pathogenetic role of activated platelets in the primary antiphospholipid syndrome involving the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Aug 14;823:188-200. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48391.x. PMID: 9292045.

Fanelli A, Bergamini C, Rapi S, Caldini A, Spinelli A, Buggiani A, Emmi L. Flow cytometric detection of circulating activated platelets in primary antiphospholipid syndrome. Correlation with thrombocytopenia and anticardiolipin antibodies. *Lupus*. 1997;6(3):261-7. doi: 10.1177/096120339700600309. PMID: 9104734.

Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Machin SJ. Platelet activation markers and the primary antiphospholipid syndrome (PAPS). *Lupus*. 1998;7 Suppl 2:S48-51. doi: 10.1177/096120339800700212. PMID: 9814673.

Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J*. 2001 Sep;22(17):1561-71. doi: 10.1053/euhj.2000.2515. PMID: 11492985.

Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, Marin V, Grégoire R, Gatel A, Durand JM, Harlé JR, Bongrand P, Piette JC. Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):55-64. doi: 10.1002/1529-0131(200001)43:1<55::AID-ANR8>3.0.CO;2-M. PMID: 10643700.



Romay-Penabad Z, Carrera Marin AL, Willis R, Weston-Davies W, Machin S, Cohen H, Brasier A, Gonzalez EB. Complement C5-inhibitor rEV576 (coversin) ameliorates in-vivo effects of antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2014 Oct;23(12):1324-6. doi: 10.1177/0961203314546022. PMID: 25228739.

Mason PJ, Chakrabarti S, Albers AA, Rex S, Vitseva O, Varghese S, Freedman JE. Plasma, serum, and platelet expression of CD40 ligand in adults with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2005 Nov 15;96(10):1365-9. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.07.039. Epub 2005 Sep 19. PMID: 16275179.

Lood C, Tydén H, Gullstrand B, Sturfelt G, Jönsen A, Truedsson L, Bengtsson AA. Platelet activation and anti-phospholipid antibodies collaborate in the activation of the complement system on platelets in systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2014 Jun 12;9(6):e99386. doi: 10.1371/journal.pone.0099386. PMID: 24922069; PMCID: PMC4055750.

García E, Rodríguez C, Rodríguez-Martorell J, et al. Platelet and endothelial activation are requisites for the development of antiphospholipid syndrome *Annals of the Rheumatic Diseases* 2004;63:600-601.

Horstman Lawrence L, Wenche Jy, Bidot CJ et al. Antiphospholipid antibodies: Paradigm in transition. *Journal of Neuroinflammation* 2009;6(3)742-751.

Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anti-cardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986;13:486-489.

Jacob H. Rand. Molecular Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *Circ Res*. 2002;90:29-37.

Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C. Thrombogenicity of  $\beta 2$  -glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in hamster. *Blood*, January 2003 vol 101;1:p157-161.

Levine JS, Branch W, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002;346:752–63.

Patrick A., Nannizzi-Alaimo L., Srinivasa K. et al. Platelet-derived CD40L, the Switch-Hitting Player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:902–906.

Perry S.L., Ortel T.L., Clinical and laboratory evaluation of thrombophilia *Clin.Chest.Med.*, 2003, 24:153–170.

Shechter Y, Tal Y, Greenberg A, et al. Platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome. *Blood Coag Fibrinol* 1998;9:653–657.

Tănăsescu C., *Sindromul antifosfolipidic*, Ed. Academiei Române, București, 2007, p:363–368.

Saraiva Sda S, Custódio IF, Mazetto Bde M, Collela MP, de Paula EV, Appenzeller S, Annichino-Bizzachi J, Orsi FA. Recurrent thrombosis in antiphospholipid syndrome may be associated with cardiovascular risk factors and inflammatory response. *Thromb Res.* 2015 Dec;136(6):1174–8. doi: 10.1016/j.thromres.2015.10.029. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26601900.

Sciascia S, Baldovino S, Schreiber K, Solfiatti L, Radin M, Cuadrado MJ, Menegatti E, Erkan D, Roccatello D. Thrombotic risk assessment in antiphospholipid syndrome: the role of new antibody specificities and thrombin generation assay. *Clin Mol Allergy.* 2016 Jul 15;14:6. doi: 10.1186/s12948-016-0043-2. PMID: 27429595; PMCID: PMC4947367.

Chaturvedi S, McCrae KR. The antiphospholipid syndrome: still an enigma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;2015:53–60. doi: 10.1182/asheducation-2015.1.53. PMID: 26637701; PMCID: PMC4877624.

Salmon JE, Girardi G, Lockshin MD. The antiphospholipid syndrome as a disorder initiated by inflammation: implications for the therapy of pregnant patients. *Nat Clin Pract*

Rheumatol. 2007 Mar;3(3):140-7; quiz 1 p following 187. doi: 10.1038/ncprheum0432. PMID: 17334336.

Ames PR, Antinolfi I, Ciampa A, Batuca J, Scenna G, Lopez LR, Delgado Alves J, Iannaccone L, Matsuura E. Primary antiphospholipid syndrome: a low-grade auto-inflammatory disease? *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Dec;47(12):1832-7. doi: 10.1093/rheumatology/ken382. Epub 2008 Oct 17. PMID: 18930964.

Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev*. 2007 Mar;21(2):99-111. doi: 10.1016/j.blre.2006.06.001. Epub 2006 Sep 20. PMID: 16987572.

Proulle V, Furie RA, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):611-22. doi: 10.1182/blood-2014-02-554980. Epub 2014 May 13. PMID: 24825863; PMCID: PMC4110663.

Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2013 Mar 14;368(11):1033-44. doi: 10.1056/NEJMra1112830. PMID: 23484830.

Salmon JE, Girardi G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation. *J Reprod Immunol*. 2008 Jan;77(1):51-6. doi: 10.1016/j.jri.2007.02.007. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17418423; PMCID: PMC2247372.

Mulla MJ, Salmon JE, Chamley LW, Brosens JJ, Boeras CM, Kavathas PB, Abrahams VM. A role for uric acid and the Nalp3 inflammasome in antiphospholipid antibody-induced IL-1 $\beta$  production by human first trimester trophoblast. *PLoS One*. 2013 Jun 6;8(6):e65237. doi: 10.1371/journal.pone.0065237. PMID: 23762324; PMCID: PMC3675211.

Müller-Calleja N, Köhler A, Siebald B, Canisius A, Orning C, Radsak M, Stein P, Mönnikes R, Lackner KJ. Cofactor-independent antiphospholipid antibodies activate the NLRP3-

inflammasome via endosomal NADPH-oxidase: implications for the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2015 May;113(5):1071-83. doi: 10.1160/TH14-07-0628. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25589411.

Lood C, Tydén H, Gullstrand B, Sturfelt G, Jönsen A, Truedsson L, Bengtsson AA. Platelet activation and anti-phospholipid antibodies collaborate in the activation of the complement system on platelets in systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2014 Jun 12;9(6):e99386. doi: 10.1371/journal.pone.0099386. PMID: 24922069; PMCID: PMC4055750.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006 Feb;4(2):295-306. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x. PMID: 16420554.

de Groot PG. Platelets as pivot in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2014 Jul 24;124(4):475-6. doi: 10.1182/blood-2014-06-576983. PMID: 25061169; PMCID: PMC4110653.

Galicía López A, Olgúin Ortega L, Saavedra MA, Méndez Cruz R, Jimenez Flores R, García de la Peña M. Increased concentrations of soluble CD40 ligand platelet in patients with primary antiphospholipidic syndrome. *Reumatol Clin.* 2013 Jul-Aug;9(4):216-20. English, Spanish. doi: 10.1016/j.reuma.2012.10.018. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23453663.

Gavris C, Moga S, Dima L, Hogeia M, Pascu A. Predictive role of hs-c-reactive protein and platelets activation markers for recurrent thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome, *Archives of Balkan Medical Union*, 52, nr. 2, 2017, p. 162-165.

Bibliografie SARS-CoV2

Kozloff N, Mulsant BH, Stergiopoulos V, Voineskos AN. The COVID-19 Global Pandemic: Implications for People With Schizophrenia and Related Disorders. *Schizophr Bull.* 2020 Jul 8;46(4):752-757. doi: 10.1093/schbul/sbaa051. PMID: 32343342; PMCID: PMC7197583.

Fond G, Salas S, Pauly V, Baumstarck K, Bernard C, Orleans V, Llorca PM, Lancon C, Auquier P, Boyer L. End-of-life care among patients with schizophrenia and cancer: a population-based cohort study from the French national hospital database. *Lancet Public Health.* 2019 Nov;4(11):e583-e591. doi: 10.1016/S2468-2667(19)30187-2. PMID: 31677777.

Melamed OC, Hahn MK, Agarwal SM, Taylor VH, Mulsant BH, Selby P. Physical health among people with serious mental illness in the face of COVID-19: Concerns and mitigation strategies. *Gen Hosp Psychiatry.* 2020 Sep-Oct;66:30-33. doi: 10.1016/j.genhosppsy.2020.06.013. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32645586; PMCID: PMC7831754.

Nemani K, Li C, Olfson M, Blessing EM, Razavian N, Chen J, Petkova E, Goff DC. Association of Psychiatric Disorders With Mortality Among Patients With COVID-19. *JAMA Psychiatry.* 2021 Apr 1;78(4):380-386. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2020.4442. PMID: 33502436; PMCID: PMC7841576.

Plasencia-García BO, Rodríguez-Menéndez G, Rico-Rangel MI, Rubio-García A, Torelló-Iserte J, Crespo-Facorro B. Drug-drug interactions between COVID-19 treatments and antipsychotics drugs: integrated evidence from 4 databases and a systematic review. *Psychopharmacology (Berl).* 2021 Feb;238(2):329-340. doi: 10.1007/s00213-020-05716-4. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33410987; PMCID: PMC7788177.

Maripuu M, Bendix M, Öhlund L, Widerström M, Werneke U. Death Associated With Coronavirus (COVID-19) Infection in Individuals With Severe Mental Disorders in Sweden During the Early Months of the Outbreak-An Exploratory Cross-Sectional Analysis of a

Population-Based Register Study. *Front Psychiatry*. 2021 Jan 8;11:609579. doi: 10.3389/fpsy.2020.609579. PMID: 33488430; PMCID: PMC7819873.

Lee SW, Yang JM, Moon SY, Yoo IK, Ha EK, Kim SY, Park UM, Choi S, Lee SH, Ahn YM, Kim JM, Koh HY, Yon DK. Association between mental illness and COVID-19 susceptibility and clinical outcomes in South Korea: a nationwide cohort study. *Lancet Psychiatry*. 2020 Dec;7(12):1025-1031. doi: 10.1016/S2215-0366(20)30421-1. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32950066; PMCID: PMC7498216.

Wang Q, Xu R, Volkow ND. Increased risk of COVID-19 infection and mortality in people with mental disorders: analysis from electronic health e United States. *World Psychiatry*. 2020;20(1):124-130. doi:10.1002/wps.2080612. Fond G, Pauly V, Orleans V, et al. Increased in-hospital mortality from COVID-19 in patients with schizophrenia. *Encephale*. 2021;47(2):89-95. PMID: 32933762; PMCID: PMC7392112. doi:10.1016/j.encep.2020.07.00313.

Fu L, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, Li P, Zhou Y, Lin YF, Duan Q, Luo G, Fan S, Lu Y, Feng A, Zhan Y, Liang B, Cai W, Zhang L, Du X, Li L, Shu Y, Zou H. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2020 Jun;80(6):656-665. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.041. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32283155; PMCID: PMC7151416.

Albert CM, Ruskin JN. Risk stratifiers for sudden cardiac death (SCD) in the community: primary prevention of SCD. *Cardiovasc Res*. 2001 May;50(2):186-96. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00319-9. PMID: 11334822.

Straus SM, Bleumink GS, Dieleman JP, van der Lei J, Stricker BH, Sturkenboom MC. The incidence of sudden cardiac death in the general population. *J Clin Epidemiol*. 2004 Jan;57(1):98-102. doi: 10.1016/S0895-4356(03)00210-5. PMID: 15019016.

Sudden cardiac death. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1985;726:5-25. PMID: 3936284.

Myerburg RJ, Castellanos A. Cardiac arrest and sudden cardiac death. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, et al, eds. Braunwald's Heart Disease:

Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, Evanado A, Kehr E, Al Samara M, Mariani R, Gunson K, Jui J. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 2008 Nov-Dec;51(3):213-28. doi: 10.1016/j.pcad.2008.06.003. PMID: 19026856; PMCID: PMC2621010.

McNally B, Robb R, Mehta M, Vellano K, Valderrama AL, Yoon PW, Sasson C, Crouch A, Perez AB, Merritt R, Kellermann A; Centers for Disease Control and Prevention. Out-of-hospital cardiac arrest surveillance --- Cardiac Arrest Registry to Enhance Survival (CARES), United States, October 1, 2005--December 31, 2010. *MMWR Surveill Summ.* 2011 Jul 29;60(8):1-19. PMID: 21796098.

Iribarren C, Crow RS, Hannan PJ, Jacobs DR Jr, Luepker RV. Validation of death certificate diagnosis of out-of-hospital sudden cardiac death. *Am J Cardiol.* 1998 Jul 1;82(1):50-3. doi: 10.1016/s0002-9149(98)00240-9. PMID: 9671008.

Wannamethee G, Shaper AG, Macfarlane PW, Walker M. Risk factors for sudden cardiac death in middle-aged British men. *Circulation.* 1995 Mar 15;91(6):1749-56. doi: 10.1161/01.cir.91.6.1749. PMID: 7882483.

Burke AP, Farb A, Virmani R, Goodin J, Smialek JE. Sports-related and non-sports-related sudden cardiac death in young adults. *Am Heart J.* 1991 Feb;121(2 Pt 1):568-75. doi: 10.1016/0002-8703(91)90727-y. PMID: 1825009.

Ifteni P, Correll CU, Burtea V, Kane JM, Manu P. Sudden unexpected death in schizophrenia: autopsy findings in psychiatric inpatients. *Schizophr Res.* 2014 May;155(1-3):72-6. doi: 10.1016/j.schres.2014.03.011. Epub 2014 Apr 4. PMID: 24704220.

Ifteni P, Grudnikoff E, Koppel J, Kremen N, Correll CU, Kane JM, Manu P. Haloperidol and sudden cardiac death in dementia: autopsy findings in psychiatric inpatients. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2015 Dec;30(12):1224-9. doi: 10.1002/gps.4277. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25790441.

Tan HL, Hofman N, van Langen IM, van der Wal AC, Wilde AA. Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation*. 2005 Jul 12;112(2):207-13. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.522581. Epub 2005 Jul 5. PMID: 15998675.

Behr ER, Dalageorgou C, Christiansen M, Syrris P, Hughes S, Tome Esteban MT, Rowland E, Jeffery S, McKenna WJ. Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J*. 2008 Jul;29(13):1670-80. doi: 10.1093/eurheartj/ehn219. Epub 2008 May 27. PMID: 18508782.

Marcus FI, Chugh SS. Unexplained sudden cardiac death: an opportunity to identify hereditary cardiac arrhythmias. *Eur Heart J*. 2011 Apr;32(8):931-3. doi: 10.1093/eurheartj/ehq505. Epub 2011 Jan 14. PMID: 21239419.

Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation*. 1998 Nov 24;98(21):2334-51. doi: 10.1161/01.cir.98.21.2334. PMID: 9826323.

Gerber Y, Jacobsen SJ, Frye RL, Weston SA, Killian JM, Roger VL. Secular trends in deaths from cardiovascular diseases: a 25-year community study. *Circulation*. 2006 May 16;113(19):2285-92. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.590463. Epub 2006 May 8. PMID: 16682616.

Byrne R, Constant O, Smyth Y, Callagy G, Nash P, Daly K, Crowley J. Multiple source surveillance incidence and aetiology of out-of-hospital sudden cardiac death in a rural population in the West of Ireland. *Eur Heart J*. 2008 Jun;29(11):1418-23. doi: 10.1093/eurheartj/ehn155. Epub 2008 Apr 17. PMID: 18424446.



Engelstein ED, Zipes DP. Sudden cardiac death. In: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V, et al, eds. *The Heart, Arteries and Veins*. New York, NY: McGraw-Hill; 1998:1081–1112.

Fishman GI, Chugh SS, Dimarco JP, Albert CM, Anderson ME, Bonow RO, Buxton AE, Chen PS, Estes M, Jouven X, Kwong R, Lathrop DA, Mascette AM, Nerbonne JM, O'Rourke B, Page RL, Roden DM, Rosenbaum DS, Sotoodehnia N, Trayanova NA, Zheng ZJ. Sudden cardiac death prediction and prevention: report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop. *Circulation*. 2010 Nov 30;122(22):2335-48. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.976092. PMID: 21147730; PMCID: PMC3016224.

Nanavati PP, Mounsey JP, Pursell IW, Simpson RJ Jr, Lewis ME, Mehta ND, Williams JG, Bachman MW, Myers JB, Chung EH. Sudden Unexpected Death in North Carolina (SUDDEN): methodology review and screening results. *Open Heart*. 2014 Aug 27;1(1):e000150. doi: 10.1136/openhrt-2014-000150. PMID: 25332830; PMCID: PMC4189226.

Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet*. 2014 Mar 15;383(9921):999-1008. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61752-3. Epub 2013 Sep 29. PMID: 24084292; PMCID: PMC4159698.

Berdowski J, Berg RA, Tijssen JG, Koster RW. Global incidences of out-of-hospital cardiac arrest and survival rates: Systematic review of 67 prospective studies. *Resuscitation*. 2010 Nov;81(11):1479-87. doi: 10.1016/j.resuscitation.2010.08.006. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20828914.

Sasson C, Rogers MA, Dahl J, Kellermann AL. Predictors of survival from out-of-hospital cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2010 Jan;3(1):63-81. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.109.889576. Epub 2009 Nov 10. PMID: 20123673.

Nolan JP, Laver SR, Welch CA, Harrison DA, Gupta V, Rowan K. Outcome following admission to UK intensive care units after cardiac arrest: a secondary analysis of the ICNARC Case Mix Programme Database. *Anaesthesia*. 2007 Dec;62(12):1207-16. doi: 10.1111/j.1365-2044.2007.05232.x. PMID: 17991255.

de Vreede-Swagemakers JJ, Gorgels AP, Dubois-Arbouw WI, van Ree JW, Daemen MJ, Houben LG, Wellens HJ. Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990's: a population-based study in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Nov 15;30(6):1500-5. doi: 10.1016/s0735-1097(97)00355-0. PMID: 9362408.

Habiyaremye C, Matanguihan JB, D'Alpoim Guedes J, Ganjyal GM, Whiteman MR, Kidwell KK, et al. Proso millet (*Panicum miliaceum* L.) and its potential for cultivation in the Pacific Northwest, US: a review. *Front Plant Sci*. 2017:19-67.

Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Jul;15(7):387-407. doi: 10.1038/s41569-018-0007-y. PMID: 29674714.

Li F, Xu Q, Zheng T, Huang F, Han L. Metabonomic analysis of *Allium macrostemon* Bunge as a treatment for acute myocardial ischemia in rats. *J Pharm Biomed Anal*. 2014 Jan;88:225-34. doi: 10.1016/j.jpba.2013.09.002. Epub 2013 Sep 14. PMID: 24080525.

Abdelmonem M, Ibrahim SM, Essam RM, Amin HAA, Abd-Elmawla MA. Lutein exerts its cardioprotective effect against the experimental model of isoprenaline-induced myocardial infarction via MIAT/miR-200a/Nrf2/TXINP pathway. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021 Nov;35(11):e22899. doi: 10.1002/jbt.22899. Epub 2021 Aug 26. PMID: 34435724.

Shaito A, Thuan DTB, Phu HT, Nguyen THD, Hasan H, Halabi S, Abdelhady S, Nasrallah GK, Eid AH, Pintus G. Herbal Medicine for Cardiovascular Diseases: Efficacy, Mechanisms, and Safety. *Front Pharmacol*. 2020 Apr 7;11:422. doi: 10.3389/fphar.2020.00422. PMID: 32317975; PMCID: PMC7155419.

Minaiyan M, Zolfaghari B, Kamal A. Effect of Hydroalcoholic and Buthanolic Extract of Cucumis sativus Seeds on Blood Glucose Level of Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2011 Sep;14(5):436-42. PMID: 23493930; PMCID: PMC3586845.

Hossain MB, Rai DK, Brunton NP, Martin-Diana AB, Barry-Ryan C. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 2010 Oct 13;58(19):10576-81. doi: 10.1021/jf102042g. PMID: 20825192.

Agarwal R, Kolkhof P, Bakris G, et al. Steroidal and non-steroidal mineralocorticoid receptor an-tagonists in cardiorenal medicine. *Eur Heart J.* 2021; 42(2): 152-161.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care* 2023; 46(Suppl. 1): S1–S291.

Bakris GL, Agarwal R, Anker SD, et al. Effect of Finerenone on Chronic Kidney Disease Out-comes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2020; 383(23): 2219-2229.

Bhattacharjee N, Barma S, Konwar N, et al. Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets: An update. *Eur J Pharmacol.* 2016; 791: 8-24.

Bjornstad P, Cherney D, Lawson J, et al. MO399: Remodel: A Mechanistic Trial Evaluating the Effects of Semaglutide on the Kidneys In People With Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease, *Nephrology Dialysis Trans-plantation*, 2022; gfac070.013.

Bulum T. Nephroprotective Properties of the Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) and Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Re-cep-tor Agonists. *Biomedicines.* 2022; 10(10): 2586.

Cherney DZI, Verma S. DAPA-CKD: The Be-ginning of a New Era in Renal Protection. *JACC Basic Transl Sci.* 2021; 6(1): 74-77.

Chung EY, Ruospo M, Natale P, et al. Aldosterone antagonists in addition to renin angiotensin system antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease. *Cochrane Data-base Syst Rev.* 2020; 10(10): CD007004.

Donate-Correa J, Luis-Rodríguez D, Martín-Núñez E, et al. Inflammatory targets in diabetic nephropathy. *J. Clin. Med.* 2020; 9:458.

M, Reaven NL, Funk SE, et al. Evaluation of the treatment gap between clinical guidelines and the utilization of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors. *Am J Manag Care.* 2015; 21(11 Suppl): S212-S220.

HC, Colhoun HM, Dagenais GR, et al. Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2019; 394(10193): 121-130.

Gheith O, Farouk N, Nampoory N, et al. Diabetic kidney disease: worldwide difference of prevalence and risk factors. *J Nephroarmacol.* 2015; 5(1): 49-56.

Green JB, Mottl AK, Bakris G, et al. Design of the COMBINATION effect of Flnerenone and Empagliflozin in participants with chronic kidney disease and type 2 diabetes using a UACR Endpoint study (CONFIDENCE). *Nephrol Dial Transplant.* 2023; 38(4): 894-903.

Heerspink HJL, Greene T, Tighiouart H, et al. Change in albuminuria as a surrogate endpoint for progression of kidney disease: a meta-analysis of treatment effects in randomised clinical trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019; 7: 128–139.

Heerspink HJL, Sattar N, Pavo I, et al. Effects of tirzepatide versus insulin glargine on kidney outcomes in type 2 diabetes in the SURPASS-4 trial: post-hoc analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2022;10(11):774-785.

Heerspink HJL, Stefansson BV, Correa-Rotter R, et al. Dapagliflozin in patients with chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2020; 383: 1436–1446.

Ilatovskaya DV, Blass G, Palygin O, et al. A NOX4/TRPC6 Pathway in Podocyte Calcium Regulation and Renal Damage in Diabetic Kid-ney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 29, 1917–1927.

Ito S, Kashihara N, Shikata K, et al. Esaxerenone (CS-3150) in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria (ESAX-DN): Phase 3 Randomized Controlled Clinical Trial. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020; 15(12): 1715-1727.

Keane WF, Brenner BM, de Zeeuw D, et al. The risk of developing endstage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAAL study. *Kidney Int.* 2003; 63: 1499–1507.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Diabetes Work Group. KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline for Diabetes Man-agement in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2022;102(4S): S1–S127.

Mann JFE, Fonseca V, Mosenzon O, et al. Ef-fects of Liraglutide Versus Placebo on Cardio-vascular Events in Patients with Type 2 Diabe-tes Mellitus and Chronic Kidney Disease. *Cir-culation.* 2018; 138(25): 2908-2918.

Marso SP, Bain SC, Consoli A, et al. Semag-lutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016; 375(19): 1834-1844.

Martínez-Díaz I, Martos N, Llorens-Cebrià C, et al. Endothelin Receptor Antagonists in Kid-ney Disease. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(4): 3427.

McGuire DK, Busui RP, Deanfield J, et al. Ef-fects of oral semaglutide on cardiovascular out-comes in individuals with type 2 diabetes and established atherosclerotic cardiovascular dis-ease and/or chronic kidney disease: Design and baseline characteristics of SOUL, a randomized trial. *Diabetes Obes Metab.* 2023; 10.1111/dom.15058.

McGuire DK, Shih WJ, Cosentino F, et al. Association of SGLT2 Inhibitors with Cardiovascular and Kidney Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *JAMA Cardiol.* 2021; 6(2): 148-158.

Nangaku M, Takama H, Ichikawa T, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study of bardoxolone methyl in patients with diabetic kidney disease: Design and base-line characteristics of AYAME study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2022; gfac242.

Neal B, Perkovic V, Matthews DR. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2017; 377(21): 2099.

Pan D, Xu L, Guo M. The role of protein kinase C in diabetic microvascular complications. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022; 13: 973058.

Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, et al. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001; 345: 870–878.

Perkovic V, de Zeeuw D, Mahaffey KW, et al. Canagliflozin and renal outcomes in type 2 diabetes: results from the CANVAS Program randomized clinical trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018; 6: 691–704.

Pitt B, Filippatos G, Agarwal R, et al. Cardiovascular Events with Finerenone in Kidney Disease and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2021; 385(24): 2252-2263.

Provenzano M, Pelle MC, Zaffina I, et al. Sodium-Glucose Co-transporter-2 Inhibitors and Nephroprotection in Diabetic Patients: More Than a Challenge. *Front Med (Lausanne).* 2021 Jun 4; 8: 654557.

Qiao Y, Shin JI, Chen TK, et al. Association Between Renin-Angiotensin System Blockade Discontinuation and All-Cause Mortality Among Persons with Low Estimated Glomerular Filtration Rate. *JAMA Intern Med.* 2020; 180(5): 718-726.

Ritz E, Tomaschitz A. Aldosterone, a vaso-toxic agent--novel functions for an old hormone. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 24, 2302–2305.

Rossing P, Baeres FMM, Bakris G, et al. The rationale, design and baseline data of FLOW, a kidney outcomes trial with once-weekly semaglutide in people with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2023; gfad009.

The EMPA-KIDNEY Collaborative Group, Herrington WG, Staplin N, et al. Empagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med.* 2023; 388(2): 117-127.

Tuttle KR, Agarwal R, Alpers CE et al. Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease. *Kidney Int.* 2022, 102, 248–260.

Tuttle KR, Brosius FC, Adler SG, et al. JAK1/JAK2 inhibition by baricitinib in diabetic kidney disease: results from a Phase 2 randomized controlled clinical trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2018; 33(11): 1950-1959.

Tuttle KR, Lakshmanan MC, Rayner B, et al. Dulaglutide versus insulin glargine in patients with type 2 diabetes and moderate-to-severe chronic kidney disease (AWARD-7): a multicentre, open-label, randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(8):605-617.

Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA revises warnings regarding use of the diabetes medicine metformin in certain patients with reduced kidney function, 2017. Accesat 10 mai 2023, <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-revises-warnings-regarding-use-diabetes-medicine-metformin-certain>.

Wang J, Xiang H, Lu Y, et al. New progress in drugs treatment of diabetic kidney disease. *Biomed Pharmacother.* 2021; 141: 111918.

Wanner C, Heerspink HJL, Zinman B, et al. Empagliflozin and Kidney Function Decline in Patients with Type 2 Diabetes: A Slope Analysis from the EMPA-REG OUTCOME Trial. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(11):2755-2769.

[Watanabe K, Sato E, Mishima E, et al. What's New in the Molecular Mechanisms of Diabetic Kidney Disease: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1):570.

Lu H, Zhang J, Liu KB, Wu N, Li Y, Zhou K, Ye M, Zhang T, Zhang H, Yang X, Shen L, Xu D, Li Q. Earliest domestication of common millet (*Panicum miliaceum*) in East Asia extended to 10,000 years ago. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 5;106(18):7367-72. doi: 10.1073/pnas.0900158106. Epub 2009 Apr 21. PMID: 19383791; PMCID: PMC2678631.

Sivasankari B, Anandharaj M, Gunasekaran P. An ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plants used by the village peoples of Thoppampatti, Dindigul district, Tamilnadu, India. *J Ethnopharmacol*. 2014 Apr 28;153(2):408-23. doi: 10.1016/j.jep.2014.02.040. Epub 2014 Feb 27. PMID: 24583241.

Malik S, Ahmad S, Sadiq A, Alam K, Wariss HM, Ahmad I, Hayat MQ, Anjum S, Mukhtar M. A comparative ethno-botanical study of Cholistan (an arid area) and Pothwar (a semi-arid area) of Pakistan for traditional medicines. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2015 Apr 30;11:31. doi: 10.1186/s13002-015-0018-2. PMID: 25925727; PMCID: PMC4460735.

Zhang L, Liu R, Niu W. Phytochemical and antiproliferative activity of proso millet. *PLoS One*. 2014 Aug 6;9(8):e104058. doi: 10.1371/journal.pone.0104058. PMID: 25098952; PMCID: PMC4123978.

Sala A, Recio M, Giner RM, Máñez S, Tournier H, Schinella G, Ríos JL. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *J Pharm Pharmacol*. 2002 Mar;54(3):365-71. doi: 10.1211/0022357021778600. PMID: 11902802.



Park KO, Ito Y, Nagasawa T, Choi MR, Nishizawa N. Effects of dietary Korean proso-millet protein on plasma adiponectin, HDL cholesterol, insulin levels, and gene expression in obese type 2 diabetic mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008 Nov;72(11):2918-25. doi: 10.1271/bbb.80395. Epub 2008 Nov 7. PMID: 18997420.

.Saqib F, Janbaz KH. Rationalizing ethnopharmacological uses of *Alternanthera sessilis*: A folk medicinal plant of Pakistan to manage diarrhea, asthma and hypertension. *J Ethnopharmacol*. 2016 Apr 22;182:110-21. doi: 10.1016/j.jep.2016.02.017. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26900127.

Masuzawa K, Matsuda T, Asano M. Evidence that pinacidil may promote the opening of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels yet inhibit the opening of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in K<sup>+</sup>-contracted canine mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1990 May;100(1):143-9. doi: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb12066.x. PMID: 2115387; PMCID: PMC1917474.

Yanagisawa T, Teshigawara T, Taira N. Cytoplasmic calcium and the relaxation of canine coronary arterial smooth muscle produced by cromakalim, pinacidil and nicorandil. *Br J Pharmacol*. 1990 Sep;101(1):157-65. doi: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb12106.x. PMID: 2149290; PMCID: PMC1917636.

Mehmood MH, Siddiqi HS, Gilani AH. The antidiarrheal and spasmolytic activities of *Phyllanthus emblica* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca<sup>2+</sup> channels. *J Ethnopharmacol*. 2011 Jan 27;133(2):856-65. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.023. Epub 2010 Nov 17. PMID: 21093572.

Zhu Y, Zhang S. Antibacterial Activity and Mechanism of Lacidophilin From *Lactobacillus pentosus* Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2020 Oct 29;11:582349. doi: 10.3389/fmicb.2020.582349. PMID: 33193219; PMCID: PMC7658196.

Ghayur MN, Khan H, Gilani AH. Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. Arch Pharm Res. 2007 Aug;30(8):970-5. doi: 10.1007/BF02993965. PMID: 17879750.

Giliani AU, Ghayur MN, Khalid A, Zaheer-ul-Haq, Choudhary MI, Atta-ur-Rahman. Presence of antispasmodic, antidiarrheal, antisecretory, calcium antagonist and acetylcholinesterase inhibitory steroidal alkaloids in *Sarcococca saligna*. Planta Med. 2005 Feb;71(2):120-5. doi: 10.1055/s-2005-837777. PMID: 15789498.

Syarifah-Noratiqah SB, Zulfarina MS, Ahmad SU, Fairus S, Naina-Mohamed I. The Pharmacological Potential of Oil Palm Phenolics (OPP) Individual Components. Int J Med Sci. 2019 May 10;16(5):711-719. doi: 10.7150/ijms.29934. PMID: 31217739; PMCID: PMC6566743.

Gilani AH, Khan AU, Jabeen Q, Subhan F, Ghafar R. Antispasmodic and blood pressure lowering effects of *Valeriana wallichii* are mediated through K<sup>+</sup> channel activation. J Ethnopharmacol. 2005 Sep 14;100(3):347-52. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.010. PMID: 16002246.

Gilani AH, Rehman NU, Khan A, Alkharfy KM. Studies on Bronchodilator Activity of *Salvia officinalis* (Sage): Possible Involvement of K<sup>+</sup> Channel Activation and Phosphodiesterase Inhibition. Phytother Res. 2015 Sep;29(9):1323-1329. doi: 10.1002/ptr.5384. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26032019.

Vogalis F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. J Auton Pharmacol. 2000 Aug;20(4):207-19. doi: 10.1046/j.1365-2680.2000.00183.x. PMID: 11260359.

Edwards G, Weston AH. Pharmacology of the potassium channel openers. Cardiovasc Drugs Ther. 1995 Mar;9 Suppl 2:185-93. doi: 10.1007/BF00878465. PMID: 7647022.

Poggioli R, Benelli A, Arletti R, Cavazzuti E, Bertolini A. K<sup>+</sup> channel openers delay intestinal transit and have antidiarrheal activity. *Eur J Pharmacol.* 1995 Dec 12;287(2):207-9. doi: 10.1016/0014-2999(95)00658-3. PMID: 8749038.

Gaginella TS, Phillips SF. Ricinoleic acid: current view of an ancient oil. *Am J Dig Dis.* 1975 Dec;20(12):1171-7. doi: 10.1007/BF01070759. PMID: 1200010.

Croci T, Landi M, Emonds-Alt X, Le Fur G, Maffrand JP, Manara L. Role of tachykinins in castor oil diarrhoea in rats. *Br J Pharmacol.* 1997 Jun;121(3):375-80. doi: 10.1038/sj.bjp.0701130. PMID: 9179376; PMCID: PMC1564694.

Franck H, Puschmann A, Schusdziarra V, Allescher HD. Functional evidence for a glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channel in rat ileal smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1994 Dec 27;271(2-3):379-86. doi: 10.1016/0014-2999(94)90797-8. PMID: 7535707.

Kim JE, Lee MR, Park JJ, Choi JY, Song BR, Son HJ, Choi YW, Kim KM, Hong JT, Hwang DY. Quercetin promotes gastrointestinal motility and mucin secretion in loperamide-induced constipation of SD rats through regulation of the mAChRs downstream signal. *Pharm Biol.* 2018 Dec;56(1):309-317. doi: 10.1080/13880209.2018.1474932. PMID: 29952685; PMCID: PMC6130520.