



Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara

REZUMAT al Tezei de abilitare intitulată

Evaluarea unor markeri ai aparatului reproducător femel consecutiv expunerii la plumb & Noi abordări fitoterapeutice în entități oncologice

elaborată de
Conf. dr. Dumitrescu Eugenia

Subsemnata **Dumitrescu Eugenia**, Doctor în Științe Medicale, domeniul *Medicină veterinară*, Conferențiar la disciplinele *Farmacie și Terapeutică veterinară*, Departamentul III –Învățământ Clinic II, din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Timișoara, candidată la obținerea titlului științific de **doctor abilitat** (*dr. habil.*), prezintă această *Teză de abilitare*.

Date generale

- *Studii postdoctorale*, în perioada 2010-2012 – “Școala Postdoctorală în domeniul *Agriculturii și al Medicinii Veterinare*”, Cod Contract: POSDRU/89/1.5/S/62371
- *Doctor* în Științe Medicale, domeniul *Medicină Veterinară*, din anul 2009;
- Absolventă, în anul 2001, a Facultății de Medicină Veterinară Timișoara, din cadrul USAMVB Timișoara.

Evoluția activității profesionale / didactice

Sunt cadru didactic al Facultății de Medicină Veterinară Timișoara, din cadrul USAMVB Timișoara din anul 2003, ocupând succesiv, prin concurs, posturile didactice, de la preparator universitar la conferențiar universitar.

În ceea ce privește relevanța și impactul rezultatelor științifice, trebuie menționate, în primul rând, cele obținute în timpul derulării cercetării științifice în cadrul tezei de doctorat intitulată *Impactul unor poluanți (aluminii și plumb) asupra aparatului genital și a hormonilor sexuali la femele* (studiu realizat în perioada de doctorat 2002-2008), care a avut ca obiective majore de cercetare următoarele:

- evaluarea markerului de expunere (nivelul aluminii și plumbului în țesuturi și organe) perioadă de expunere trei luni, șase luni, perioada de gestație, lactație, prepubertală și timp de două generații;
- evaluarea markerilor integrității aparatului reproducător femel (greutatea organelor și țesuturilor);
- evaluarea modificărilor structurale ale aparatului genital (ovar, uter, col uterin);
- evaluarea markerilor fundamentali ai funcționalității reproducerii (caracteristicile citologice ale frotiului vaginal, caracteristicile ciclului sexual – durată și regularitate);
- evaluarea *in vivo* a markerilor pentru stabilirea potențialului perturbator al funcției de reproducere a hormonilor sexuali (FSH, LH, estradiol, progesteron, testosteron);
- evaluarea markerilor toxicității asupra dezvoltării (consumul mediu zilnic de furaj și apă, greutatea corporală, dinamica greutateii corporale în perioada de gestație, durata gestației, numărul de pui obținuți la o fătare, greutatea cuibului de la naștere și până la înțarcare, sex ratio, vârsta și greutatea corporală în momentul deschiderii vaginale).

Perioada de expunere pentru evaluarea acestor markeri a fost de: trei luni, șase luni, pe parcursul perioadei de gestație, lactație, prepubertală și timp de două generații.

Cercetările efectuate pe parcursul perioadei postdoctorale (2010-2012) privind *Agresiunea unor poluanți asupra structurii hormonale și a aparatului genital femel – studiu farmaco-toxico epidemiologic* și prezentate în prezenta teză de abilitare, au avut ca obiective principale:

Stabilirea impactului expunerii timp de 12 luni la acetat de plumb prin apa de băut a femelelor de șobolan asupra:

- Markerilor funcției sexuale: determinarea nivelului de plumb în ovare și uter; evaluarea duratei ciclului sexual;
- Markerilor biochimici: determinarea FSH-ului, LH-ului, estradiolului, progesteronului și testosteronului;
- Greutății corporale pe parcursul gestației în urma împerecherii femelelor expuse timp de 12 luni la acetat de plumb cu masculi neexpuși la acetat de plumb;
- Numărului de zile până la împerechere și a intervalului dintre fătări;

- Duratei și evoluției gestației precum și determinarea numărului de pui viabili, morți, stabilirea raportului dintre sexe și a greutateii cuibului;

Realizarea unui studiu epidemiologic privind cauzele infertilității la femei, avortului spontan sau ale creșterii infantile, obiectiv care a generat următoarele activități:

- Determinarea nivelului de plumb din sânge la femeile însărcinate și din cordonul ombilical la nou-născuți;
- Întocmirea unui chestionar privind modul de viață, tipul de ocupație etc., și încercarea stabilirii posibilelor cauze ale intoxicației;
- Stabilirea greutateii, înălțimii și circumferinței capului la nou-născuți.

Rezultatele acestor cercetări au fost prezentate în cadrul unor conferințe naționale și internaționale și au generat redactare a peste **25 de lucrări** științifice ca prim autor din care două în reviste internaționale cu factor de impact.

Aceste lucrări științifice au fost citate în peste **35 de articole** publicate în reviste indexate în baze de date internaționale și în reviste cu factor de impact.

În **Capitolul 1. Consecințele aportului diferențiat de plumb asupra markerilor funcției sexuale - determinarea nivelului de plumb din ovare, uter și trompe uterine în urma expunerii timp de 12 luni la acetat de plumb** după o scurtă prezentare a efectelor plumbului asupra aparatului reproducător femel și a principalilor markeri luați în studiu, sunt prezentate scopul, obiectivele, materialele și metodele prezentei cercetări. În cadrul rezultatelor la punctul 1.1.4.1. este prezentată dinamica nivelului de plumb în uterul și ovarele femelelor de șobolan.

Nivelul plumbului în organele genitale (ovar, trompe uterin și uter) s-a determinat prin spectrometrie de absorbție atomică în cadrul Spitalului Județean Timișoara cu spectofotometru de absorbție atomică AA-240 Zeeman cu programmable sample dispenser (PSD 120).

S-a determinat absorbția măsurând aria pik-ului și s-a determinat concentrația în micrograme/l pe baza algoritmului de calibrare New Rational. Curba de calibrare s-a făcut pe 5 nivele de element standard de Pb în 0,1% HNO₃, Wavelength 283,3 nm cu Slit Width 0,5nm. La fiecare 10 determinări s-a făcut recalibrarea, cu RSD 10%. Valorile obținute au fost raportate la cantitatea de substanță uscată.

Determinările efectuate au arătat că, expunerea la acetat de plumb a determinat creșterea semnificativă ($p < 0,001$) a nivelului de plumb în ovare comparativ cu lotul martor și în corelație directă, semnificativă ($p < 0,001$), cu nivelul de expunere..

De asemenea, în uter și trompe uterine nivelul plumbului a crescut semnificativ ($p < 0,01$), comparativ cu lotul martor și în corelație directă, semnificativ ($p < 0,001$) cu nivelul de expunere.

La punctul 1.1.4.2 s-a urmărit o evaluarea a markerilor integrității aparatului reproducător femel. Modificări privind histoarhitectura ovariană și uterină au fost observate în secțiunile histologice din ovar și uter, colorate prin colorația hematoxilină-eozină și colorație Tricromică Mallory după fixare în alcool și secționare la 5 μ m. Lamele au fost vizualizate cu ajutorul microscopului Olympus CX 41 în cadrul Laboratorului de Biologie celulară și histologie a FMV Timișoara.

Rezultatele au arătat că în urma expunerii femelelor de șobolan timp de 12 luni la acetat de plumb prin apa de băut, în ovar și uter au apărut următoarele modificări structurale: distrugerea foliculilor ovarieni și a parenchimului ovarian, distrugerea foliculilor ovarieni, vacuolizarea celulelor epiteliale din parenchimul ovarian, edem folicular, necroza glandelor uterine, distrugerea parțială a epitelului uterin, vacuolizarea celulelor epiteliale.

La punctul 1.1.5. Consecințele aportului diferențiat de plumb asupra markerilor biochimici au fost urmărite valorile hormonilor sexuali (FSH, LH, estradiol, progesteron și testosteron) în faza de proestru.

Determinările efectuate au arătat că expunerea la acetat de plumb a determinat scădere semnificativă ($p < 0,01$) a nivelului FSH-ului seric comparativ cu lotul iar creșterea nivelului de expunere la plumb a influențat semnificativ ($p < 0,01$) nivelul FSH-ului seric, în corelație inversă cu nivelul de expunere.

Creșterea semnificativă ($p < 0,01$) a nivelului seric al LH-ului la loturile E comparativ cu lotul M, precum și creșterea nivelului plumbului a atras după sine creșterea semnificativă ($p < 0,01$) a nivelului seric al LH-ului în corelație directă cu nivelul de expunere.

Cu excepția lotului M, nivelul LH-ului seric a fost net superior limitelor fiziologice ale speciei pentru faza de proestru (< 35 ng/ml).

Nivelul expunerii a influențat semnificativ ($p < 0,01$) nivelul estradiolului seric, în corelație inversă cu nivelul de expunere (E_2/E_1 : - 41,00%; E_3/E_2 : - 63,00%; E_3/E_1 : - 78,00%).

Nivelul progesteronului a scăzut semnificativ la loturile E față de lotul M dar, s-a menținut în limitele fiziologice ale speciei pentru faza de proestru (< 60 ng/ml). Diferențele între loturile experimentale și lotul M au fost semnificative ($p < 0,01$).

Creșterea nivelului seric al testosteronului, semnificativ ($p < 0,01$) la loturile E comparativ cu lotul M, nivelul de expunere influențând semnificativ ($p < 0,01$) concentrația serică a testosteronului (E_2/E_1 : +20,00%; E_3/E_2 : +18,00%; E_3/E_1 : +44,00%) și în corelație directă cu nivelul de expunere.

La punctul 1.1.6. Consecințele aportului diferențiat de plumb asupra gestației rezultatele au arătat că, la loturile E, durata gestației a fost mai crescută decât limitele fiziologice, De asemenea, durata gestației a fost mai mare comparativ cu lotul M, semnificativ ($p < 0,01$), doar în cazul lotului

expus la 150 ppb Pb și în corelație directă cu nivelul de expunere, semnificativ, la creșterea nivelului de expunere de la 50 la 150 ppb Pb.

La punctul 1.1.6.2. am urmărit numărul de pui obținuți la o fătare consecutiv expunerii la acetat de plumb (*expunere în perioada de gestație*) unde am constatat că, expunerea la plumb a determinat nașterea unui număr semnificativ ($p < 0,01$) mai scăzut de pui față de lotul M, acest număr scăzând semnificativ ($p < 0,01$) pe măsura creșterii nivelului de expunere.

Punctul 1.1.6.3. privind consecințele expunerii la acetat de plumb asupra greutateii cuibului arată că, la naștere, greutatea cuibului la loturile E a fost semnificativ ($p < 0,01$) mai scăzută decât la lotul M și a scăzut semnificativ ($p < 0,01$) odată cu creșterea nivelului de expunere.

Legat de consecințele expunerii la acetat de plumb asupra sex ratio, descrise la punctul 1.1.6.4. putem spune că această expunere a modificat în mică măsură raportul între sexe, în favoarea femelelor la loturile expuse la 100 și 150 ppb Pb.

De asemenea a fost urmărită durata ciclului sexual și a numărului de cicluri normale la femelele adulte expuse timp de 12 luni la acetat de plumb, evaluare descrisă la punctul 1.1.6.5.

În cazul acestui marker nu s-au constatat modificări ale caracteristicilor citologice ale frotiului vaginal, indiferent de momentul expunerii, durata expunerii sau numărul de generații expuse și nivelul de expunere dar, a fost observată *perturbarea stadiilor ciclului sexual în sensul reducerii*, cu grade diferite de semnificație a procentului de cicluri sexuale cu proestru, estru, diestru I și diestru II cu durată fiziologică, creșterii semnificative a procentului de cicluri sexuale cu stadii prelungite comparativ cu lotul martor și în corelație directă, cu grade diferite de semnificație, cu nivelul de expunere, apariției de cicluri sexuale cu stadii absente, mai frecvent stadiul de estru în cazul expunerii la 150 ppb Pb;

În Capitolul 2 am realizat un studiu epidemiologic privind cauzele infertilității la femei, avortului spontan și creșterii infantile, concepând un chestionar care se regăsește ca parte anexă a prezentei teze. Am dorit să realizăm acest studiu deoarece în cazul femeilor, expunerea la plumb crește riscul de avort spontan, naștere prematură sau chiar pierderea sarcinii.

Plumbul pătrunde în placentă acumulându-se în țesuturile embrionului, inclusiv în creierul său, putând să vătămeze permanent copilul. Poate produce creștere întârziată, dificultăți de învățare, probleme de auz, memorie scăzută sau chiar agresivitate.

Studiu s-a realizat pe un eșantion de 25 de femei însărcinate între a șapte-a și a noua lună de sarcină și pe nou-născuți acestora. Au fost recoltate probe de sânge de la mame și de la nou-născuții acestora. De la nou-născuți probele de sânge au fost recoltate la naștere din cordonul ombilical.

Probele de sânge provenite de la femeile însărcinate și de la nou-născuți acestora au fost prelucrate și analizate prin spectrometrie cu absorbție atomică (AAS) în cadrul Spitalului Județean Timișoara.

Nivelul plumbului din sângele femeilor însărcinate a avut valori cuprinse între 0.2-9 $\mu\text{g/dl}$ iar în cazul nou-născuților aceste au fost cuprinse între 0.1-3.5 $\mu\text{g/dl}$. Circumferința capului nou născuților a variat între 30-36 cm, greutatea la naștere a variat între 2200-4000 g iar înălțimea între 46 și 52 cm.

În Capitolul 3 este prezentată eficacitatea farmaco-terapeutică a unor extracte din plante asupra liniei celulare HepG2 (carcinom hepatocelular).

În subcapitolul 3.1. am urmărit eficacitatea farmaco-terapeutică a extractului de ghimbir asupra liniei celulare HepG2. HepG2 este o linie de carcinom hepatocelular, cu celule de tip epitelial care au 55 de cromozomi, dimensiunea de 18 microni și care formează colonii aderente, de obicei în monostrat sau în agregate mici.

Celulele HepG2 pot fi crescute la scară largă, secretă multe proteine plasmatică (transferină, fibrinogen, plasminogen și albumină) și se utilizează cu succes ca sistem de studiu a hepatocitelor polarizate, model de studiu pentru dinamica și transportul proteinelor și lipidelor din canaliculele și sinusurile biliare, sistem model pentru studierea metabolismului ficatului și a toxicității xenobioticelor dar și pentru detectarea citoprotectorilor.

Obiectivul acestui studiu a fost de evaluarea *in vitro* a efectelor celulare și analiza efectului terapeutic al extractului de Ghimbir 6% și 8% pe linia celulară HepG2 (carcinom hepatocelular).

În urma cercetărilor realizate pe extracte de ghimbir 6% și respectiv 8%, la concentrații de 7,5 și respectiv 3,75 mg substanță extrasă / ml, folosind linia celulară HepG2, la 48 de ore de la expunere și utilizând testul MTT s-a constatat că: ghimbirul inhibă creșterea celulelor HepG2 într-o manieră dependentă de concentrație și timp de expunere; cel mai mare procent de inhibare a proliferației celulelor HepG2 de către ghimbir a fost observat după 48 de ore de la expunere la o doză de 7,5mg/ml (76,00%); calculând valoarea IC50% pentru 48 de ore putem afirma că, extractul de ghimbir, atât la concentrația de 6% și 8%, folosit ca substanță extrasă la o concentrație de 7,5mg/ml și 3,75 mg/ml a dus la creșterea numărului de celule apoptotice și necrotice iar, rezultatele obținute certifică faptul că, ghimbirul poate fi utilizată în tratamentul carcinomului hepatocelular deoarece are efect citotoxic scăzut asupra celulelor sănătoase.

În subcapitolul 3.2. este prezentată eficacitatea farmaco-terapeutică a extractului de turmeric asupra liniei celulare HepG2 unde rezultatele obținute arată că: curcumina inhibă creșterea celulelor HepG2 într-o manieră dependentă de concentrație și timpul de expunere; cel mai mare procent de inhibare a proliferației celulelor HepG2 de către curcumină a fost observat după 48 de ore de la

expunere la o doză de 15mg/ml (79,61%); calculând valoarea IC50% pentru 48 de ore putem afirma că, extractul de turmeric la concentrația de 8% și folosit ca substanță extrasă la o concentrație de 15mg/ml a produs fenomene de apoptoză și necroză ale celulelor HepG2 iar rezultatele obținute certifică faptul că, curcumina poate fi utilizată în tratamentul carcinomului hepatocelular deoarece are efect citotoxic scăzut asupra celulelor sănătoase.

În partea a doua a tezei de abilitare este prezentat „*Planul de evoluție și dezvoltare a carierei*” care cuprinde în partea de început câteva date personale precum și evoluția carierei profesionale până la gradul didactic deținut, cel de conferențiar.

În acest capitol sunt redată câteva aspecte legate de tema de doctorat și publicațiile conexe acesteia fiind prezentate un număr de **20 lucrări** științifice publicate în reviste incluse în baze de date internaționale și prezentate la conferințe naționale și internaționale.

În ceea ce privește capacitatea de a îndruma studenți și tineri cercetători precum și competențele didactice, am coordonat mai mult de **10 de studenți** la lucrările de licență, dar și mai mulți doctoranzi și postdoctoranzi formând colective în cadrul cărora au fost publicate numeroase lucrări științifice în reviste incluse în baze de date internaționale, **18 lucrări fiind în reviste ISI cu factor de impact cumulat de 16,89.**

De asemenea, am publicat în calitate de prim sau coautor 6 manuale didactice sau monografii în edituri recunoscute, două dintre acestea primind diploma de excelență și **premiul Paul Rigler al ASAS** acordat în anul 2016 pentru lucrarea *Elemente de terapie alternativă și complementară în medicina veterinară.*

Referitor la capacitatea de a transfera cunoștințele și rezultatele sale către mediul economic sau social, ori de a populariza propriile rezultate științifice, precum și la capacitatea de a lucra în echipă și eficiența colaborărilor științifice, am publicat peste 120 lucrări științifice, ca autor principal sau coautor.

Sunt membru în colectivul editorial-științific al revistei *Medicamentul veterinar* iar începând cu anul 2016 sunt vicepreședintele Societății Române pentru Oligoelemente în Medicină (SROM).

Capacitatea de a conduce proiecte de cercetare s-a materializat prin conducerea în calitate de director a două proiecte de cercetare cu CNCSIS, dar și prin câștigarea unei burse postdoctorale de 24 luni.

Perspectiva dezvoltării carierei se bazează pe două obiective principale și anume, aprofundarea și dezvoltarea activității didactice și de cercetare, dar și extinderea domeniilor de expertiză, cu dezvoltarea activității de cercetare.

Partea a treia cuprinde referințele bibliografice.