



**UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI**

**FACULTATEA DE BIOLOGIE**

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

**ASPECTE COMPORTAMENTALE ȘI BIOCHIMICE ÎN  
STUDIUL SINDROMULUI DE COLON IRITABIL -  
MODELE ANIMALE ȘI PACIENȚI UMANI**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**CS I Dr. Habil. CIOBÎCĂ Alin – Stelian**

**Student-doctorand:**

**POPOVICI (căs COJOCARIU) Roxana Oana**

**IAȘI**

**2022**

## MULȚUMIRI

Alese mulțumiri și considerație adresez domnului C.S. I Dr. Habil. Ciobîcă Alin – Stelian, conducătorul științific al acestei teze de doctorat, care m-a îndrumat, sprijinit și a oferit cadrul favorabil ducerii la bun sfârșit a cercetării.

De asemenea, doresc să adresez calde mulțumiri membrilor comisiei doctorale pentru amabilitatea de a analiza această lucrare.

În același context, alese mulțumiri sunt adresate și membrilor comisiei de îndrumare, formată din Dna. Conf. Univ. Dr. Zenovia Olteanu, Dl. Prof. Univ. Dr. Habil. Dumitru Cojocaru și Dna Șef de Lucrări. Dr. Sabina Cojocaru, care au participat cu sugestii, sfaturi și îndrumări de un real ajutor în întreg demersul de cercetare și de realizare a prezentei lucrări.

Mulțumiri alese pentru o frumoasă colaborare adresez Dnei. Dr. Ioana Miruna Balmuş, Dnului. Dr. Radu Lefter, Dnei. Dr. Ababei Daniela, alături de gânduri de recunoștință și prietenie.

Nu în ultimul rând, mulțumesc familiei și prietenilor pentru sprijinul necondiționat oferit, pentru împărtășirea atât a bucuriilor, dar și a dificultăților care au marcat și au încununat această etapă a vieții mele. Mulțumirile mele merg către fiecare persoană care mi-a oferit ajutor, sfaturi, înțelegere și încurajare fără de care nu aş fi putut duce la realizare această lucrare.

## CUPRINS

INTRODUCERE.....	11
CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL DE CERCETARE.....	15
1.1. Noțiuni generale cu privire la sindromului de colon iritabil.....	15
1.1.1. Definiția sindromului de colon iritabil.....	15
1.1.2. Aspecte clinice si epidemiologice ale sindromului de colon iritabil .....	15
1.1.3. Diagnosticul sindromului de colon iritabil .....	17
1.1.3.1 Criteriile ROMEIV .....	17
1.1.3.2 Scala Bristol.....	18
1.1.3.3. Clasificarea sindromului de colon iritabil.....	18
1.2. Teorii cu privire la etiologia sindromului de colon iritabil.....	19
1.2.1. Axa intestin-creier.....	19
1.2.2. Factori psihosociali.....	21
1.2.3. Inflamația .....	22
1.2.4. Mecanisme postinfecțioase.....	25
1.2.5. Variații genetice de predispoziție.....	26
1.2.6. Alimentația.....	28
1.2.7. Fluctuațiile hormonale.....	28
1.3. Potențiali parametri biochimici relevanți în sindromul de colon iritabil.....	29
1.3.1. Potențiali parametri biochimici din ser sanguin.....	29
1.3.2. Potențiali parametri biochimici din materii fecale.....	32
1.3.3. Alți potențiali parametri biochimici.....	34
1.4. Teorii cu privire la abordarea moleculară a sindromului de colon iritabil.....	35
1.5. Perspectiva microbiomului in sindromul de colon iritabil.....	38

1.6. Stresul oxidativ și sindromul de colon iritabil.....	42
1.7. Asocieri între sindromul de colon iritabil și boala Parkinson.....	45
1.8. Mecanisme de interacțiune între simptomele asociate sindromului de colon iritabil și somn.....	47
1.9. Modele animale ale sindromului de colon iritabil.....	51
<b>CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....</b>	<b>53</b>
2.1. Materiale de cercetare.....	53
2.1.1. Animale și modele animale.....	53
2.1.1.1. Pregătirea animalelor .....	53
2.1.1.2. Obținerea modelelor animale utilizate.....	53
2.1.1.3. Obținerea și prelucrarea probelor biologice.....	61
2.1.2. Extracte din plante.....	61
2.1.2.1. Extracte etanolice și metanolice de <i>Camelina sativa</i> var. Mădălina.....	61
2.1.2.2. Extract polifenolic de <i>Chrysanthellum americanum</i> .....	62
2.1.3. Pacienți umani.....	62
2.1.3.1. Selectarea participanților.....	62
2.1.3.2. Obținerea și pregătirea probelor biologice.....	63
2.2. Metode de cercetare.....	64
2.2.1. Determinări comportamentale la animalele de experiență.....	64
2.2.1.1. Testul labirintului Y .....	64
2.2.1.2. Testul labirintului plus înălțat.....	65
2.2.1.3. Testul de înot forțat.....	66
2.2.2. Evaluarea comportamentală a participanților umani.....	68
2.2.2.1. Scala analogică vizuală pentru sindromul de colon iritabil (VAS-IBS).....	68
2.2.2.2. Chestionarul Pittsburgh de evaluare a calității somnului.....	71
2.2.3. Determinări biochimice și imunoenzimatic.....	71
2.2.3.1. Metoda de determinare a activității superoxid dismutazei (SOD).....	72
2.2.3.2. Metoda de determinare a activității enzimei glutatation peroxidazei (GPx).....	73
2.2.3.3. Metoda de determinare a malondialdehidei (MDA).....	75
2.2.3.4. Metoda de determinare a oxidului nitric(NO).....	76
2.2.3.5. Metoda de determinare a serotoninei.....	77
2.2.3.6. Metoda de determinare a catalazei.....	78

2.2.3.7. Metoda de determinare axantin oxidazei (XO).....	80
2.2.3.8. Metoda de determinare a interleukinei IL1, IL6, IL8 și a factorului de necroză tumorală (TNF $\alpha$ ).....	81
2.2.4. Evaluarea și examenul citologic colorat al materiilor fecale.....	83
2.2.5. Interpretarea statistică a rezultatelor.....	83
<b>CAPITOLUL 3. REZULTATELE CERCETĂRII.....</b>	<b>85</b>
3.1. Rezultate obținute prin studiul modelelor animale.....	85
3.1.1.1. Evaluarea parametrilor comportamentali.....	85
3.1.1.1.1. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra tractului gastrointestinal.....	85
3.1.1.1.2. Efecte ale diferitelor combinații de factori de stres asupra parametrilor evaluați utilizând în testul labirintului Y.....	86
3.1.1.1.3. Efecte ale diferitelor combinații de factori de stres asupra parametrilor evaluați utilizând testul labirintului plus înălțat.....	87
3.1.1.1.4. Efectele ale diferitelor combinații de factori de stres asupra parametrilor evaluați utilizând testul de înot forțat.....	90
3.1.1.2. Evaluarea parametrilor biochimici prezenți în țesutul cerebral.....	92
3.1.1.3. Evaluarea parametrilor biochimici prezenți în țesutul intestinal.....	94
3.1.1.4. Corelații ale parametrilor comportamentali și biochimici .....	96
3.1.2. Rezultatele obținute în urma aplicării paradigmei stresului multifactorial la șoareci și administrarea extractului de <i>Camelina sativa</i> var. Mădălina.....	105
3.1.2.1. Evaluarea parametrilor comportamentali.....	105
3.1.2.1.1. Efectul administrării extractului metanolic și etanolic de <i>Camelina sativa</i> var. Mădălina asupra memoriei de scurtă durată.....	105
3.1.2.1.2. Efectul administrării extractului metanolic și etanolic de <i>Camelina sativa</i> var. Mădălina asupra comportamentului anxios.....	106
3.1.2.1.3. Efectul administrării extractului metanolic și etanolic de <i>Camelina sativa</i> var. Mădălina asupra comportamentului depresiv.....	110
3.1.2.2. Efectul extractului metanolic și etanolic din semințele de <i>Camelina sativa</i> var. Mădălina asupra statusului oxidativ de la nivelul țesutului cerebral.....	112
3.1.2.3. Efectul extractului metanolic și etanolic din semințele de <i>Camelina sativa</i> var.	

Mădălina asupra statusului oxidativ de la nivelul țesutului colonic.....	116
3.1.2.4. Corelații ale parametrilor comportamentali și biochimici.....	120
3.1.2.5. Evaluarea și examenul citologic colorat al materiilor fecale.....	122
3.1.3. Rezultatele obținute în urma aplicării paradigmei stresului multifactorial la șobolani și administrarea extractului de <i>Chrysanthellum americanum</i> .....	124
3.1.3.1 Evaluarea parametrilor comportamentali.....	124
3.1.3.1.1. Efectul extractului polifenolic de <i>Chrysanthellum americanum</i> asupra memoriei de scurtă durată.....	124
3.1.3.1.2. Efectul extractului polifenolic de <i>Chrysanthellum americanum</i> asupra comportamentului anxios.....	125
3.1.3.1.3. Efectul extractului polifenolic de <i>Chrysanthellum americanum</i> asupra comportamentului depresiv.....	127
3.1.3.2. Evaluarea biochimică a biomarkerilor de stres oxidativ.....	129
3.1.3.3. Corelații Pearson și analiza regresiei.....	131
3.2. Rezultate obținute prin studiul pacienților umani.....	134
3.2.1. Evaluarea scalei vizuale analogice pentru sindromul de colon iritabil (VAS-IBS).....	134
3.2.2. Rezultatele evaluării tulburărilor de somn.....	137
3.2.3. Rezultatele obținute în urma analizelor biochimice din lacrimi.....	139
3.2.4. Analiza corelațiilor liniare Pearson.....	141
3.2.5. Rezultatele obținute în urma analizelor biochimice și imunologice din ser, urină și materii fecale.....	142
CAPITOLUL 4. DISCUTII.....	151
CONCLUZII.....	171
LISTA LUCRĂRILOR PUBLIFICATE	
LISTA LUCRĂRILOR SUSȚINUTE LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE ȘI NAȚIONALE.....	175
BIBLIOGRAFIE.....	179

## LISTA ABREVIERILOR ȘI CUVINTELE CHEIE

### Lista abrevierilor

- ACTH - hormoni adrenocorticotropi;
- ANCA - anticorp citoplasmatic antineutrofil;
- ANS - sistem nervos autonom;
- ASCA IgA - anticorpi anti-*Saccharomyces cerevisiae*;
- BDNF - factor neurotrofic derivat din creier;
- CgA- cromogranina A;
- COV - compuși organici volatili;
- CRP- proteina C-reactivă;
- EE - extract etanolic;
- ENS - sistemul nervos enteric;
- FC - calprotectină fecală;
- GPX - glutation peroxidaza;
- HBD-2 -  $\beta$ -defensin-2 umană;
- HPA - axa hipotalamo-hipofizo-cortico-suprarenală;
- IBD - sindrom de colon inflamator (din engl. inflammatory bowel disease);
- IBS - sindrom de colon iritabil( din engl. irritable bowel syndrome);
- IBS-C - sindrom de colon iritabil cu constipație;
- IBS-D - sindrom de colon iritabil cu diaree;
- IBS-M - sindrom de colon iritabil cu manifestări mixte;
- IEC - celule epiteliale intestinale;
- IELs - limfocite intraepiteliale;
- IL-1 $\beta$  - interleukina-1 $\beta$ ;
- LBT - test de identificare a lactozei în respirație;
- MDA- malondialdehidă
- ME - extract metanolic;

MF - stres multifactorial;

NMS - separare maternă neonatală;

NO - oxid nitric;

PD - boala Parkinson;

PD-IBS - sindrom de colon iritabil post-diverticulită;

P-IBS - sindrom de colon iritabil predominant dureros;

Pi-IBS - sindrom de colon iritabil post-infecțios;

PMN- granulocite polimorfonucleare;

PSQI - Chestionarul Pittsburgh de evaluare a calității somnului (din engl. Pittsburgh Quality Sleep Index)

ROS - specii reactive de oxigen;

SC - stres de conținție;

SCFA - acizi grași cu lanț scurt (shortchainfattyacids);

SOD - superoxid dismutaza;

TIMP-1- inhibitor de țesut al metaloproteinazei-1;

TNF- factor de necroză tumorală;

U-IBS - sindrom de colon iritabil neclasificat;

VAS-IBS - scală analogică vizuală pentru sindromul de colon iritabil;

VSH - viteză de sedimentare a hematiilor;

XO - xantin oxidaza;



## Cuvinte cheie

- Sindrom de colon iritabil
- Afecțiuni gastrointestinale
- ROME IV
- Biomarkeri
- Axa intestin-creier
- Stres oxidativ
- Stres nitrosativ
- Depresie
- Anxietate
- Tulburări de somn
- VAS-IBS
- PSQI
- Inflamație
- Modele animale
- Stres multifactorial
- Stres de conținție
- Separare maternă neonatală
- Testul labirintului Y
- Testul labirintului plus înălțat
- Testul înotului forțat
- Extract metanolic
- Extract etanolic
- Extract polifenolic
- *Camelina sativa* var. Mădălina
- *Chrysanthellum americanum*
- Glutathion peroxidază
- Superoxid dismutază
- Malondialdehidă
- Oxid nitric
- Xantinoxidază
- Catalază
- Interleukine
- Serotonina
- Factor de necroză tumorală
- Biomarkeri din lacrimi
- Biomarkeri din urină
- Biomarkeri din materii fecale

## INTRODUCERE

Prezenta lucrare aduce în prim plan o patologie din ce în ce mai des întâlnită în practica medicală clinică – sindromul de colon iritabil (din engl. irritablebowelsyndrome- IBS). Un număr considerabil de publicații și studii de specialitate evidențiază interesul față de grupul tulburărilor funcționale digestive, în care sindromul de colon iritabil își face simțită prezența.

Patogeneza acestei afecțiuni, similar altor afecțiuni funcționale, nu este încă în totalitate cunoscută. Din acest motiv, au fost propuse multiple mecanisme care să explice patogeneza acestui sindrom de-a lungul timpului, însă, până în prezent, nu există doar un singur mecanism care să ducă la sindromul de colon iritabil, acceptându-se în acest fel perspectiva unei etiopatogeneze multifactoriale.

Fiind definită printr-un tipar variabil de simptome, care pot fi prezente atât la nivelul intestinului subțire cât și în colon, tulburarea se caracterizează prin dureri sau disconfort abdominal, în care apar modificări ale tranzitului intestinal. Cele mai frecvente simptome prezente în sindromul de colon iritabil sunt reprezentate de balonare, constipație, diaree, senzația de defecare incompletă sau prezența mucusului în scaun (Schmulson and Drossman, 2017).

Stabilirea diagnosticului de sindrom de colon iritabil este un proces complicat, uneori asemănător unui puzzle complex, care cuprinde culegerea și analiza informațiilor. Criteriile ROME IV, care susțin diagnosticul de sindrom de colon iritabil, pun în prim plan perturbarea funcționării tractului gastrointestinal și propun conceptul de tulburări intestinale în strânsă corelație cu axa intestin-creier. Aceste afecțiuni se caracterizează prin simptome digestive legate de tulburări de motilitate, hipersensibilitate viscerală, fiind corelate cu procesarea stimulului microbiomului, sistemului imunitar al mucoasei sau sistemului nervos central (Gilkin Jr, 2005).

În prezent, există tot mai multe dovezi ale rolului microbiomului intestinal în patogeneza acestui sindrom. Prin urmare, sindromul colonului iritabil ar putea fi definit ca un cumul de simptome cronice precum durerea și tulburările tranzitului intestinal (diaree sau constipație), dar care rezultă din alterarea microbiomului intestinal, fiind strâns corelate cu modificările răspunsului imunitar parietal și sensibilitatea crescută a peretelui intestinal (Schmulson and Drossman, 2017). În urma acestei schimbări de paradigmă, trebuie luate în considerare inclusiv noi opțiuni terapeutice.

Totodată, diagnosticul trebuie să fie însoțit de excluderea oricăror boli metabolice sau organice, diabet zaharat, tulburări de natură tiroidiană, intoleranță la lactoza, afecțiuni maligne sau benigne, tulburări din sfera psihiatrică sau intervenții chirurgicale cu posibile aderențe (Sullivan and Nord, 2005).

Un aspect cunoscut este faptul că severitatea simptomelor variază de la un pacient la altul, cu predominanța unuia sau mai multor simptome, evoluția bolii fiind variabilă, imprevizibilă, de cele mai multe ori de lungă durată, etapele de remisiune alternând cu fazele de recidivă a simptomatologiei. Datorită naturii cronice a acestei afecțiuni, a cărei cauză nu a fost încă elucidată, în care factorii emoționali, alimentari, medicamentoși sau hormonalți pot favoriza sau agrava simptomele gastrointestinale, tratamentul este în primul rând simptomatic, cu accent pe dietă. Chiar dacă patologia este cunoscută sub numele de „sindromul colonului iritabil”, prin tehnicile imagistice nu se poate observa iritația colonului.

Deoarece până în prezent nu a fost evidențiat niciun biomarker specific IBS, atenția a fost îndreptată către markerii stresului oxidativ, având în vedere că studiile recente au evidențiat atât

deficiențe de semnalizare, cât și modificări ale echilibrului oxidativ în unele afecțiuni gastrointestinale și neurologice (Grenham et al., 2011; Mayer et al., 2015). În această privință, mai multe studii au indicat implicarea speciilor reactive la oxigen (ROS) în dezvoltarea IBS, cu o scădere semnificativă a capacității antioxidante nu numai la pacienți (Schwartz, Repine and Abraham, 1995; Mete et al., 2013; Choghakhori et al., 2017), ci și la modelele de șobolan cu simptome induse de sindrom de colon iritabil. Acest aspect a fost evidențiat cu precădere de scăderea activității superoxid dismutazei (SOD) și glutatation peroxidazei (GPx), în țesutul intestinal, și creșterea peroxidării lipidice (Mozaffari et al., 2011; Dolatabadi et al., 2018).

Având în vedere că până în prezent nu a fost identificat un tratament specific, țintit, care să vindece sindromul de colon iritabil, tehnica terapeutică ar trebui să implice abordarea problemelor pacientului, în special prescrierea tratamentelor care acționează asupra simptomatologiei (Basnayake, 2018). În prezent, se utilizează o gamă largă de tratamente farmaceutice, cele mai multe fiind concepute pentru alte indicații, cum ar fi medicamentele antispasmodice (Ruepert et al., 2011), uleiul de mentă (Camilleri and Boeckxstaens, 2017), antidepressive triciclice și serotonina selectivă (Alexander C Ford et al., 2014), Rifaximin, un antibiotic care reduce simptomele IBS (Pimentel et al., 2011) sau probioticele (Chey, 2017). Mai mult decât atât, terapia cognitivă comportamentală, terapia psihologică cu mai multe componente, psihoterapia dinamică, hipnoterapia sunt, de asemenea, utilizate pentru ameliorarea simptomelor (Alexander C. Ford et al., 2014).

În lumina informațiilor relatate anterior în ceea ce privește stadiul actual al cunoașterii în acest domeniu, faptul că există încă o serie de conexiuni și elemente din etiologia bolii necunoscute pe deplin, dar și pentru că, până în prezent nu există un biomarker propriu diagnosticării bolii, elementele propuse pentru a fi studiate în prezenta lucrare sunt motivante, mai ales prin prisma înțelegerii mecanismelor complexe pe care acesta boală le cunoaște.

Principalul **scop** al lucrării de față este acela de a evalua și cerceta diferite aspecte comportamentale și biochimice la pacienții umani și modelele animale, aspecte determinate prin tehnici diferite, de a stabili posibile corelații între parametrii evaluați și, nu în ultimul rând, de a oferi caracterizarea unui lot de pacienți cu diagnosticul de sindrom de colon iritabil.

Un prim **obiectiv** a fost acela de a obține unele modele animale ale sindromului de colon iritabil care au replicat o serie de simptome ușoare ale afecțiunii. În acest context, s-a încercat evidențierea efectului unor tratamente antioxidante asupra sindromului de colon iritabil la șobolani, având la bază administrarea unui extract de *Chrysanthellum americanum* L. Vatke. Ulterior, au fost evaluate aspecte comportamentale și statusul oxidativ la animalele respective.

Tot legat de modelele experimentale animale, un alt **obiectiv** a fost acela de a compara unele aspecte comportamentale și de a evalua markerii stresului oxidativ la un model experimental ușor al sindromului de colon iritabil la șoareci supuși paradigmei stresului multifactorial. Ulterior, a fost evaluat potențialul antioxidant al extractului etanolic, respectiv metanolic obținut din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina, atât prin prisma statusului oxidativ cât și prin prisma evaluării comportamentale ale animalelor supuse experimentului.

Plecând de la aceste premise, un **obiectiv** notabil este acela că, din perspectiva neurologică, ne dorim să aflăm dacă implicarea neuropsihiatrică în sindromul de colon iritabil are o relevanță, mai mult decât atât, dacă există o suprapunere între substratul biochimic studiat și tulburările neuropsihiatrice.

Un alt **obiectiv** al prezentei lucrări este legat de evaluarea statusului afectiv la un grup de pacienți diagnosticați cu IBS, atât din perspectiva simptomatologiei cât și din privința modului în care somnul și mai ales disfuncțiile acestuia le influențează viața. În legătură cu același lot de pacienți, am evaluat statusul oxidativ din probe de lacrimi, prelevate prin metode non-invasive, dar și din ser, urina și materii fecale.

Experimentele desfășurate care sunt prezentate în lucrare au fost găzduite de Laboratorul de Fiziologie Animală al Facultății de Biologie a Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași și cel al Facultății de Medicină Veterinară, Universitatea de Științe ale vieții "Ion Ionescu de la Brad", Iași, Spitalul Sf.Spiridon, Iași, Clinica Medicală Oftaprof, Iași.

Atât studiile bazate experimentele cu animale cât și cele care au avut la bază participarea pacienților umani și a voluntarilor s-au efectuat cu respectarea legislației europene și naționale care reglementează aceste activități, cât cu acordul scris și informat al participanților, Comisia de Etică a Spitalului Sf.Spiridon, Iași și Comisia de Etică a Facultății de Biologie a Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, respectiv Comisia de Etică a Facultății de Medicină Veterinară, Universitatea de Științe ale vieții "Ion Ionescu de la Brad", Iași.

## CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

Sindromul de colon iritabil este la ora actuală una dintre cele mai frecvente tulburări gastrointestinale funcționale. Fiind o disfuncție funcțională definită printr-un tipar variabil de simptome, care pot apărea atât în intestinul subțire, cât și în intestinul gros, având o progresie cronică a cărei diagnosticare este adesea dificil de stabilit, această afecțiune deseori necesită investigații multiple și costuri pe măsură. Un aspect deloc de neglijat îl constituie tratamentul care este, în mod obișnuit, unul pe termen lung.

Cercetarea cu privire la acest subiect din ultimii ani prezintă sindromul de colon iritabil ca fiind un complex de simptome digestive recurente, care asociază în mod normal durerea abdominală, modificări ale frecvenței și consistenței scaunului, meteorismul abdominal, senzația de defecare incompletă însoțită de durere sau senzație de arsură, modificări ale tranzitului intestinal cu variații între constipație și diaree, balonări și emisie de gaze, mucus în scaun (Gilkin Jr, 2005; Longstreth *et al.*, 2006; Drossman, 2016). Testele de laborator s-au dovedit de-a lungul timpului deficitare, iar în absența oricărui daune structurale sau a unor modificări radiologice, endoscopice, histologice sau biochimice a mucoasei intestinale, procedura de diagnostic poate fi întârziată sau îngreunată (Spiller *et al.*, 2007).

Conform celor mai noi clasificări care vizează bolile gastroenterologice (Videlock and Chang, 2015), sindromul de colon iritabil este considerat ca o fiind o afecțiune funcțională gastrointestinală care cuprinde mai multe simptome intestinale cheie. Cele mai frecvente manifestări clinice ale sindromului de colon iritabil sunt modificări ale obiceiurilor intestinale, fiind definite în principal prin variații de consistență a scaunului (constipație, diaree sau alterarea din cauza lipsei unei cauze clinice exacte, cum ar fi inflamația intestinală sau infecția) (Canavan, West and Card, 2014). Simptomatologia suplimentară include dureri abdominale și disconfort, care uneori se îmbunătățește odată cu defecarea, aceasta întâlnind-o în absența unui factor patologic declanșator.

Încă din 1820, sindromul de colon iritabil era documentat ca fiind o durere ocazională raportată la nivelul intestinelor însoțită de o perturbare a capacității de digestie, alături de flatulență și senzație

de sufocare (Powell, 1818). Aproape 30 de ani mai târziu, Cummings vorbește despre eterogenitatea simptomelor, atât constipația cât și diareea, prezente la aceeași persoană (Cumming, 1849).

În primele descrieri ale bolii, atenția a fost axată pe trecerea vizibilă a mucusului în scaun (denumită boala mucoasă a colonului) (Clark, 1859), mai ales sub forma unor pseudomembrane sau a unor porțiuni din lumenul colonic (Da Costa, 1871; White, 1905). În momentul când aceste descrieri nu au căpătat o semnificație clară în ceea ce privește patologia bolii, a devenit foarte clar faptul că este necesară o lărgire a orizontului simptomatologic.

Deși severitatea simptomelor variază de la un pacient la altul, în egală măsură variază și predominanța lor. Totodată, evoluția bolii fiind una de o factură extrem de variabilă, imprevizibilă, cel mai adesea de lungă durată, fazele remisei alternând cu fazele de reapariție a simptomatologiei. Datorită naturii cronice ale acestei afecțiuni, a cărei cauză încă nu a fost pe deplin elucidată, la care factorii emoționali, alimentari, medicamentoși sau hormonal pot favoriza sau agrava simptomele gastrointestinale, tratamentul este în principal orientat pe simptomatologie, punându-se cel mai adesea accent pe dietă (Lembo and Bollom, 2015).

Pentru a susține diagnosticul sindromului de colon iritabil, simptomele bolii trebuie să îndeplinească criteriile ROME IV) care evidențiază perturbarea activității tractului gastrointestinal, dar aduc un element de noutate esențial, și anume conceptul de tulburări ale axei creier-intestin (gut-brain axis) (Schmulson and Drossman, 2017).

Cu toate acestea, în conformitate cu criteriile ROME IV, tulburările gastrointestinale funcționale au primit o nouă definiție. Astfel, tulburările gastrointestinale funcționale sunt tulburări ale interacțiunii axei intestin-creier, un grup vast de tulburări gastrointestinale, care includ simptome comune, cum ar fi tulburările de motilitate, hipersensibilitate viscerală, modificarea funcției mucoase și imune, alterarea microbiotei intestinale și alterarea procesării sistemului nervos central (Drossman, 2016).

Având în vedere incidența simptomatologiei și necunoscând modelul exact de interacțiune între componentele genetice și de mediu, sindromul de colon iritabil suportă mai multe variante clinice, clasificându-se astfel în funcție de caracteristica principală. În acest fel, luând în considerare consistența scaunelor, sindromul de colon iritabil a fost clasificat în 4 subtipuri:

1. sindromul de colon iritabil cu constipație (IBS-C) caracteristic prin scaune tari cel puțin 25% din timp sau scaune moi sau apoase mai puțin de 25% din timp;
2. sindromul de colon iritabil cu diaree (IBS-D) caracteristic prin scaune moi sau apoase cel puțin 25% din timp sau scaune tari mai puțin de 25% din timp;
3. tip mixt - scaune moi sau tari cel puțin 25% din timp;
4. neclasificat - atât scaune moi cât și tari mai puțin de 25% din timp (Longstreth *et al.*, 1997).

Teoriile actuale cu privire la etiologia sindromului de colon iritabil implică o serie de factori, printre care amintim axa intestin-creier, factorii psihosociali, inflamația, mecanismele postinfecțioase, variațiile genetice de predispoziție, alimentația sau fluctuațiile hormonale.

Abordarea moleculară a sindromului de colon iritabil pornește de la o serie de biomarkeri, dar care nu sunt implicați în diagnosticul direct, ci la diferențierea acestei boli de alte afecțiuni. În acest fel, pe lângă panoul de biomarkeri imunologici cu opt elemente descris de Mujagic și colaboratorii săi, care a propus și validat interleukina 1-beta, interleukina 6, interleukina 12p70, factorul  $\alpha$  de necroză tumorală, cromogranina A, beta-defensina umană 2 (HBD2) și calprotectina într-un panou IBS multi-test, multe studii au descris diferențierea biomarkerilor (Mujagic *et al.*, 2016). Pe de altă

parte, exista o perspectivă a studiului microbiomului în sindromul de colon iritabil, și a stresului oxidativ.

Faptul că stresul oxidativ este implicat în multe căi fiziologice comune și, de asemenea, în patologii extrem de incidente, cum ar fi patologii gastro-intestinale, nutriționale, neurologice și psihiatrice, nu este un lucru nou pentru cercetare (Mesika and Reichmann, 2019). Deoarece sindromul de colon iritabil ar putea fi problema căilor de semnalizare deficitare care implică atât secreția gastro-intestinală, cât și stimularea neuro-vegetativă, această afecțiune nu face excepție de la ipoteza oxidativă din mecanismele patologice.

Este cunoscut faptul că sistemul nervos este susceptibil leziunilor provocate de stresul oxidativ datorită structurilor lipidice și conținutului scăzut de antioxidanți (Finkel and Holbrook, 2000). Pe de altă parte, există numeroase teorii care leagă stresul oxidativ și mecanismele sale de tulburările gastrointestinale și în special de mecanismele sindromului de colon iritabil.

Într-o recenzie recentă care vizează modelele animale ale sindromului de colon iritabil, Wang și colaboratorii săi (Wang *et al.*, 2017) au remarcat că mecanismele patogene de bază ale afecțiunii rămân ambigue, deși crește permeabilitatea intestinală, inflamația, hipersensibilitatea viscerală iar interacțiunea creier-intestin este modificată și joacă un rol esențial. Cu toate acestea, cea mai folosită metodă pentru obținerea simptomatologiei sindromului de colon iritabil la modelele de animale este expunerea la stres. Acest lucru ar putea sugera faptul că tocmai căile de răspuns la stres ar putea fi implicate în simptomatologia sindromului de colon iritabil, fără a ține cont de subtipurile acestuia. Cu toate acestea, eforturile de cercetare au confirmat că și în aceste modele animale, modificările moleculare apar la niveluri de acțiune sistemice și locale. Prin urmare, se pare că modelele animale ale sindromului de colon iritabil demonstrează că diagnosticul și evaluarea clinică nu ar fi suficiente în cercetarea și tratamentul afecțiunii.

În ceea ce privește implicarea stresului oxidativ în sindromul de colon iritabil, eforturile anterioare de cercetare au evidențiat rezultate controversate. În timp ce unele modele animale și studii ale pacienților au raportat un dezechilibru oxidativ clar atât la nivel sistemic cât și la nivel local, nicio dovadă concretă nu indică o corelație directă între stresul oxidativ și sindromul de colon iritabil.

Corelația dintre sistemul antioxidant și sindromul de colon iritabil a fost stabilită în continuare în studiile modelelor animale. În acest fel, legătura dintre inflamație și creșterea speciilor reactive de oxigen (ROS) a fost realizată într-un studiu care a utilizat un amestec cu potențial antioxidant de *Aloe vera* și *Matricaria recutita*, care a urmărit să descrie efectele sale benefice asupra dezechilibrului gastrointestinal indus de stresul de conținție (Asadi-Shahmirzadi *et al.*, 2012). Mai mult decât atât, ei au observat că administrarea amestecului de plante și a agenților spasmolitici nu numai că a schimbat dezechilibrul stresului oxidativ în celulele colonice, dar a îmbunătățit și capacitatea antioxidantă, însă fără să existe dovezi privind tipul de corelație între evenimentele dăunătoare și apărarea antioxidantă.

## CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

### 2.1. Materiale de cercetare

#### 2.1.1. Animale și modele animale

Animalele au fost tratate conform cadrului legal în vigoare, experimentele fiind efectuate în conformitate cu legislația României și Uniunii Europene cu privire la utilizarea animalelor în experimentele biomedicale. Au fost depuse toate eforturile pentru reducerea numărului și suferinței tuturor animalelor utilizate în modelele experimentale. Totodată, experimentele au avut avizul favorabil al Comisiei de Etică a Facultății de Biologie din cadrul Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași și al Comisiei de Etică a Facultății de Medicină Veterinară, Universitatea de Științe ale Vieții “Ion Ionescu de la Brad”, Iași

Studiile experimentale desfășurate în cadrul cercetării au avut în prim plan șoareci de sex masculin din rasa Swiss, având o masă corporală inițială cuprinsă între 30-40 g și șobolani rasa Wistar, de sex feminin, cu o masă corporală inițială cuprinsă între 180-220 g.

Pentru a putea evalua aspectele comportamentale legate de sindromul de colon iritabil, am indus simptomele afecțiunii printr-o serie de modele experimentale, atât la șoareci cât și la șobolani. Experimentele au mers în 3 direcții diferite. Un prim experiment a vizat efectul stresului multifactorial asupra unui model de sindrom de colon iritabil indus la șoareci. Al doilea experiment s-a desfășurat tot pe șoareci supuși stresului multifactorial, însă am dus cercetarea mai departe din dorința evaluării efectului antioxidant al unor extracte etanolică și metanolică din semințer de *Camelina sativa* variațiunea Mădălina. În cel de-al treilea experiment, am demonstrat capacitatea antioxidantă și relevanța cognitivă a extractului polifenolic de *Chrysanthellum americanum* într-un model animal experimental de sindrom de colon iritabil la șobolani, obținut, de asemenea, prin expunerea la stresul multifactorial.

#### ❖ Paradigma stresului multifactorial la șoareci

Pentru obținerea modelului experimental bazat pe paradigma stresului multifactorial au fost selectați 40 de pui masculi de șoarece și au fost create patru grupuri (n = 10). Trei grupuri au fost ulterior expuse la diferite combinații de stres - așa cum este descris mai jos - și stabilite ca modele animale ale sindromului de colon iritabil. Grupul rămas a servit ca grup de control și a fost supus condițiilor de mediu identice în absența oricărui factor de stres studiați.

Două dintre cele trei grupuri IBS (n = 20), au fost supuse separării materne neonatale (NMS) timp de 3 ore/zi între zilele postnatale 1 și 14. Au rămas al treilea grup IBS și grupul de control neatins.

Începând cu ziua 90 postnatală, al treilea grup IBS și unul dintre cele două grupuri care au fost supuse separării materne neonatale (NMS) au fost supuse la 7 zile (între zilele 90 și 96) de expunere multifactorială la stres combinată constând din stresori de intensitate scăzută, imprevizibili și un factor de stres repetitiv.

Pe parcursul celor 7 zile de expunere, factorii de stres de intensitate scăzută, imprevizibili au fost aplicați dimineața - cu excepția lipsei de hrană / apă, acești factori de stres au fost persistenți pe parcursul unei perioade de 24 de ore. În a doua parte a zilei, șoarecii au fost supuși timp de 1 oră/zi la stresul de tip repetitiv reprezentat de paradigma stresului de evitare a apei.

Tabel 2.1 Tipul de stresori aplicați în fiecare grup experimental

Grup de control	Grup expus la stres multifactorial + separare maternă neonatală <b>MF+NMS</b>	Grup expus la stres multifactorial <b>MF</b>	Grup expus la separare maternă neonatală <b>NMS</b>
	<p><b>A. FACTORI IMPREVIZIBILI</b></p> <p>(1) factor de stres de conținție timp de 30 minute / zi;</p> <p>(2) factor de stres prin expunere la sunet de prădător</p> <p>(3) factor de stres cauzat de lipsa apei 24 de ore;</p> <p>(4) factor de stres cauzat de simularea unei injecții abdominale</p> <p>(5) factor de stres cauzat de poziția înclinată a cuștii la 45 de grade</p> <p>(6) factor de stres cauzat de ciupirea cozii</p> <p>(7) factor de stres cauzat de lipsa hranei timp de 24 de ore.</p> <p><b>B. FACTOR REPETITIV</b></p> <p>Stres de evitare a apei (zilnic)</p>	<p><b>A. FACTORI IMPREVIZIBILI</b></p> <p>(1) factor de stres de conținție timp de 30 minute / zi;</p> <p>(2) factor de stres prin expunere la sunet de prădător</p> <p>(3) factor de stres cauzat de lipsa apei 24 de ore;</p> <p>(4) factor de stres cauzat de simularea unei injecții abdominale</p> <p>(5) factor de stres cauzat de poziția înclinată a cuștii la 45 de grade</p> <p>(6) factor de stres cauzat de ciupirea cozii</p> <p>(7) factor de stres cauzat de lipsa hranei timp de 24 de ore.</p> <p><b>B. FACTOR REPETITIV</b></p> <p>Stres de evitare a apei (zilnic)</p>	<p>Separare maternă neonatală</p>

După expunerea la stres, toate animalele au fost supuse evaluării comportamentale în intervalul cuprins între zilele 101 și 109 în următoarea ordine: testul labirintului Y (ziua 101), testul labirintului plus înălțat (ziua 103) și testul de înot forțat (între zilele 106 și 109). Recoltarea probelor biologice a avut loc în ziua 111, așa după cum se poate observa și în figura 2.1.

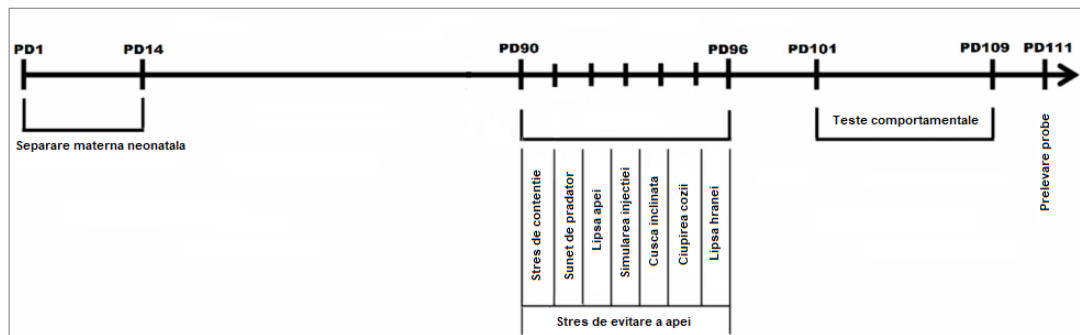


Figura 2.1. Parcursul designului experimental al modelului de sindrom de colon iritabil bazat pe paradigma stresului multifactorial la șoareci.



## ❖ Paradigma stresului multifactorial la șoareci și administrarea extractului de *Camelina sativa*

În scopul inducerii simptomelor sindromului de colon iritabil la șoareci printr-un model experimental de expunere cronică la stres, 36 nou-născuți au fost supuși separării materne neonatale între zilele postnatale 1 și 14, și la 3 zile de stres de conținție între zilele postnatale 90 și 92, timp de 30 de minute în fiecare zi a experimentului. Expunerea la stresul de conținție a constat în imobilizarea șoarecelui într-o cușca de mici dimensiuni care, deși îi asigură spațiul necesar să trăiască, nu îi permite să se miște. Între zilele 93 și 98, animalele au fost expuse unei serii de factori de stres impredictibili, heterogeni și de intensitate scăzută:

- 1) factor de stres prin expunerea sonoră a prădătorului timp de 10 minute (camera care găzduiește animalele este expusă unor zgomote care mimează sunetul unor păsări de pradă);
- 2) factor de stres prin privațiune de apă timp de 24 de ore;
- 3) factor de stres prin imitarea unei injecții abdominale, conform metodei de executare, dar în absența acului de la seringă;
- 4) factor de stres cauzat de înclinarea cuștii la un unghi de 45 grade față de planul orizontal între 1 și 4 ore;
- 5) factor de stres obținut prin pișcarea cozii, la 1 cm de la capătul acesteia, cu un clește timp de 1 minut;
- 6) factor de stres prin privare de hrană timp de 24 de ore;
- 7) factor de stres prin conținție, timp în care animalul a stat câte o oră pe zi imobilizat într-o cutie de dimensiuni mici.

Un avantaj al acestei abordări care vizează folosirea stresorilor heterogeni, constă în evitarea habituării animalelor, lucru imposibil de realizat în condițiile aplicării constante a unor stimuli homotipici.

În intervalul de timp cuprins între zilele 93 și 102, pe lângă stresorii heterogeni aplicați în fiecare zi, animalele au fost supuse unui stimul stresant suplimentar, și anume stresul de evitare al apei. Această procedură a constat în plasarea fiecărui șoarece timp de o oră, pe o platformă cu un diametru de 2,5 cm, în mijlocul unui bazin mic din plastic, umplut cu apă încălzită la 22°C, la nivelul înălțimii platformei.

Animalelor din lotul de control nu li s-au aplicat stresori de niciun fel, ele fiind menținute în condiții controlate de mediu, primind hrană și apă *ad libitum*.

În intervalul de timp cuprins între zilele 98 și 101, o parte din șoareci au primit câte o doză de extract metanolic (ME), respectiv etanolic (EE) de *Camelina sativa*, pentru a urmări efectul său antioxidant, în doze de câte 5 g/kg corp (Fig.4) Extractele au fost administrate oral sub forma unei suspensii de 0.1% ser fiziologic, maxim 0.5 ml suspensie per administrare, folosind un ac de gavaj, conform procedurilor standard. Animalele din lotul de control au primit aceeași doză de ser fiziologic cu scopul asigurării condițiilor de hidratare identice pentru toate animalele care au participat la studiu.

Pentru a realiza modelul experimental, șoarecii au fost împărțiți în 4 subgrupuri, conform figurii de mai jos:

În perioada cuprinsă între ziua 102 și 110, am evaluat animalele din punct de vedere comportamental, urmând ca în ziua 112 acestea să fie sacrificate. Am colectat probe de creier și intestin pentru testarea biochimică. Din materiile fecale s-au efectuat coprocitograme.

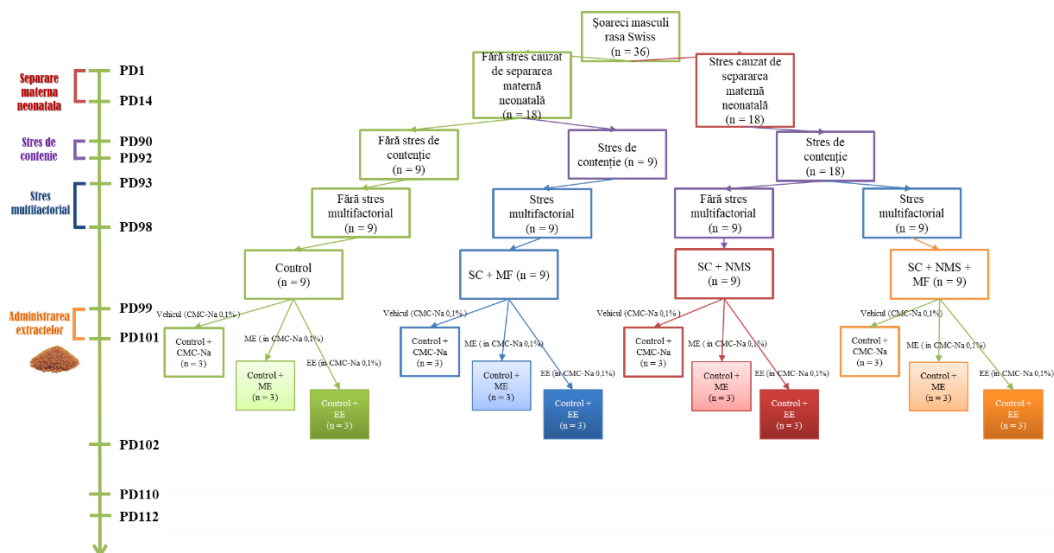


Figura 2.2. Descrierea schematică a designului experimental care vizează paradigma stresului multifactorial și administrarea extractului de *Camelina sativa*

### ❖ Paradigma stresului multifactorial la șobolani și administrarea extractului de *Chrysanthellum americanum*

Pentru a induce simptomele sindromului de colon iritabil la șobolani, am folosit un model experimental care include paradigma stresului multifactorial combinat cu o suita de stresori diferiți, așa cum este descris în unele studii din literatura de specialitate (Li *et al.*, 2016). Pentru experimentul actual, noi a adaptat metoda folosind o combinație originală de factori de stres pentru a optimiza protocolul și a reduce timpul de expunere, pe care l-am prezentat anterior (LEFTER, Radu, CIOBICA, Alin, TIMOFTE, Daniel, ABABEL, Daniela, DOBRIN Dobrin, LUCA, Andrei, TRIFAN, Anca, STANCIU, Carol, SFARTI, Catalin, 2018).

Astfel, grupurile IBS au fost expuse în fiecare zi la doi factori de stres, pentru o perioadă relativ scurtă de doar șapte zile. Primul factor de stres a fost folosit în mod constant în fiecare dimineață, iar folosirea celui de-al doilea stresor, diferit în fiecare zi, a reușit minimizarea habituării animalelor.

Șobolani au fost expuși câte o oră în prima jumătate a zilei, pe parcursul unei întregi săptămâni, la stresul de evitare a apei; procedura standard constă în plasarea șobolanului pe o platformă cu dimensiunile de 8x6 cm, în mijlocul unui bazin mic de plastic umplut cu apă caldă (25°C), la nivelul înălțimii platformei (Yang *et al.*, 2006). Șobolani grupului de control au fost așezați pe aceeași platformă, tot pentru o oră, însă într-un recipient gol, fără apă.

La o oră distanță după încheierea episodului care a provocat stresul de evitare a apei, grupul IBS a fost expus la câte unul din cei 6 factori de stres diferiți, pentru fiecare din ultimele șase zile ale protocolului astfel:

1. Expunerea la sunetul unui prădător timp de 5 minute;
2. Privarea de apă timp de 24 de ore;
3. Imitația unei injecții abdominale;

4. Plasarea într-o cușcă înclinată într-un unghi de 45 de grade timp de 12 ore;
5. Pișcarea cozii, la 1 cm de la capătul acesteia, cu un clește timp de 1 minut;
6. Privarea de hrană timp de 24 de ore (Lü *et al.*, 2009).

După finalizarea acestui protocol, s-a administrat extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum*, după care a urmat o zi de odihnă și bateria de teste comportamentale. Administrarea extractului s-a făcut pe cale orală, prin gavaj, timp de 5 zile consecutive.

Cei 24 de șobolani participanți la acest experiment au fost împărțiți în 4 grupuri, fiecare grup având câte 6 animale, astfel:

- grupul de control a primit ser fiziologic (2,5 ml/kg greutate corporală), consecutiv, timp de 6 zile;
- un grup tratat cu extract polifenolic de *Chrysanthellum americanum* (100mg/kg greutate corporală, timp de 6 zile consecutive;
- un grup la care a fost indus sindromul de colon iritabil și care a primit ser fiziologic (2,5 ml/kg greutate corporală) 2 zile în timpul și la 4 zile după ce șobolanii au fost expuși la paradigma stresului multifactorial;
- un grup la care a fost indus sindromul de colon iritabil, dar căruia i s-a administrat extractul polifenolic amintit (100 mg/kg greutate corporală) 2 zile în timpul și 4 zile după ce șobolanii au fost expuși paradigmei stresului multifactorial.

Extractul polifenolic uscat a fost dizolvat în ser fiziologic (0,9 mg/ml) și a fost administrat intragastric, prin gavaj oral pe stomacul gol, cu o oră înainte de orice paradigmă de expunere la stres.

### 2.1.2 Pacienți umani

Așa cum studiul pe modelele animale a urmat 3 trasee de cercetare, studiul pe participanții umani a mers în 2 direcții care au presupus, în primă instanță, recrutarea pacienților și voluntarilor sănătoși.

În primul studiu, au fost recrutați 10 pacienți cu sindrom de colon iritabil și 14 voluntari sănătoși de la Clinica Oftalmologică Oftaprot (Iași, România), cu vârsta medie de 42.6 ani și raportul în ceea ce privește sexul de 50% femei, respectiv 50% bărbați. Pacienții recrutați au fost împărțiți în subgrupuri în funcție de sistemul de clasificare al sindromului de colon iritabil: IBS-D (sindrom de colon iritabil predominant cu diaree) și IBS-C (sindrom de colon iritabil predominant cu constipație).

Pentru selectarea celor 14 voluntari sănătoși participanți am respectat raportul legat de sex (50% femei și 50% bărbați), media de vârstă fiind de 39.42 ani.

Pentru cel de-al doilea studiu, au fost recrutați 60 de voluntari de la Spitalul Sf. Spiridon din Iași, 15 dintre ei făcând parte din grupul de control, în timp ce ceilalți 45 au fost împărțiți în 3 subgrupuri, raportate la sistemul de clasificare al afecțiunii studiate: 15 participanți în subgrupul IBS-D (sindrom de colon iritabil predominant cu diaree), 15 participanți în subgrupul IBS-C (sindrom de colon iritabil predominant cu constipație) și 15 participanți în subgrupul IBS-M (sindrom de colon iritabil cu manifestări mixte). Media de vârstă pentru grupul de control a fost de 43.72 ani, pentru grupul IBS-D 48 ani, pentru IBS-C 44.8 ani, iar pentru grupul IBS-M 47.2 ani. Pentru toate cele 4 subgrupuri, s-a păstrat raportul de 30% bărbați și 70% femei.

Înainte de implicarea propriu-zisă, pacienții au fost informați cu privire la studiul în care sunt incluși. Le-au fost prezentate și explicate pe larg direcțiile și etapele experimentului, informații care se regăsesc de altfel și în *Consimțământul informat scris*, iar acordul exprimat prin semnătură l-au dat după lămurirea posibilelor neclarități.

Participanții au luat la cunoștință faptul că au dreptul să cunoască stadiul în care se află studiul din care fac parte, și vor fi contactați pentru a putea obține aceste informații, dacă vor dori.

Studiul a fost realizat în conformitate cu reglementările naționale și europene privind cercetarea biomedicală și a fost aprobat de comitetul local. Au fost protejate identitatea participanților și datele cu caracter personal în acord cu legislația în vigoare, folosindu-se notații, ID-uri, cu semnificație pentru investigator.

#### *Obținerea și pregătirea probelor biologice*

Pentru primul studiu experimental, probele de lacrimi au fost colectate în timpul orelor de dimineață, pe benzi Schirmer, conform procedurii de testare Schirmer fără anestezie (Stuchell *et al.*, 1984), așa cum a mai fost prezentat de către grupul nostru de cercetare (Balmus *et al.*, 2020).

Pentru al doilea studiu experimental, probele biologice folosite au constat din sânge venos, urină și scaun.

## **2.2. Metode de cercetare**

### **2.2.1. Determinări comportamentale la animalele de experiență**

Modificările comportamentale din sfera cognitivă sau afectiv-emoțională au fost evidențiate în urma efectuării testelor comportamentale, în scopul atingerii unor praguri ridicate de anxietate, respectiv depresie la animalele de experiență. Metodele se regăsesc în lucrarea "Methods of Behavior Analysis In Neuroscience" ("Metode de analiză a comportamentului în Neuroștiințe") (Buccafusco, 2009).

#### *2.2.1.1. Testul labirintului Y*

Baza acestei paradigme constă în tendința nativă a animalului de a explora mediul în care se află, respectiv explorarea succesivă și alternantă a celor trei brațe care intră în structura aparatului, evaluând astfel memoria sa de scurtă durată.

#### *2.2.1.2. Testul labirintului plus înălțat*

Testul labirintului plus înălțat este utilizat pentru evaluarea stării de anxietate la animalele de experiență.

#### *2.2.1.3. Testul de înot forțat*

Testul de înot forțat este o metoda des utilizată pentru observarea comportamentului depresiv al animalelor de laborator

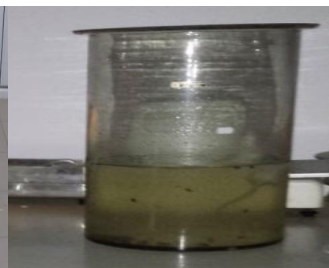


Figura 2.3. Testului labirintului Y    Figura 2.4. Testul labirintului plus ridicat    Figura 2.5. Testul de înot forțat (foto original).

## **2.2.2. Evaluarea comportamentală a participanților umani**

### *2.2.2.1. Scala analogică vizuală pentru sindromul de colon iritabil (VAS-IBS)*

Scala analogică vizuală VAS-IBS este o scală de evaluare a durerii, bine cunoscută, inițial dezvoltată de prof. Dr. Mariette Bengtsson, în 2007. Pornind de la criteriile de diagnostic ale bolii gastrointestinale ROME III, prof. Bengtsson și colaboratorii săi au propus VAS-IBS ca instrument care ar putea fi utilizat în practica clinică de diferiți profesioniști din domeniul sănătății pentru a evalua starea în timp a pacienților cu IBS (Bengtsson *et al.*, 2011).

Cu toate acestea, chiar dacă Bengtsson și colaboratorii au sugerat ca versiunea în limba engleză a VAS-IBS să fie utilizată în țările vorbitoare de limbă engleză și să fie testată în continuare pentru validitate și fiabilitate la pacienții vorbitori de limbă engleză (Bengtsson *et al.*, 2013), populația română nu este o populație predominant vorbitoare de limbă engleză. Astfel, în instanță, ne-am propus să validăm traducerea și adaptarea în limba română a scalei VAS-IBS în conformitate cu criteriile ROME IV, iar pe aceasta cale mulțumim pentru bunăvoința și buna colaborare cu autoarea acestei scale.

Astfel, conform Schmulson și Drossman (Schmulson and Drossman, 2017), criteriile ROME IV au fost actualizate, inclusiv modificarea „lunii trecute” cu „ $\geq 1$  zi / săptămână în ultimele 3 luni” pentru apariția durerii și eliminarea „disconfortului abdominal” din cauza expresiei nespecifică și ambiguă în multe limbi. De asemenea, diferențierea dintre subtipurile IBS se face recent pe baza scării Bristol pentru cel puțin 25% din mișcările intestinului. În acest fel, VAS-IBS tradus și adaptat a fost aplicat sub forma unui chestionar de completare oferind o posibilitate de răspuns de la scara 1 la 10 (Figura 2.7).

Traducerea a fost efectuată de specialiști în gastroenterologie, psihiatrie și fiziologie și revizuită de un vorbitor nativ de limbă engleză (dr. Walter Bild, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași, România). După traducere, chestionarele au fost completate de 14 persoane sănătoase (7 bărbați, 7 femei) pentru a evalua înțelegerea lor. Nu au fost necesare alte actualizări.

De asemenea, încurajăm clinicienii români de gastroenterologie să utilizeze această scală pe o mare varietate de pacienți cu tulburări gastro-intestinale pentru a verifica și a evalua utilitatea, punctele tari și punctele slabe ale traducerii noastre.

### *2.2.2.2. Chestionarul Pittsburgh de evaluare a calității somnului*

Pentru evaluarea tulburărilor de somn și tiparele acestuia la pacienții cu sindrom de colon iritabil, a fost aplicată tuturor participanților la studiu scala Pittsburgh referitoare la calitatea somnului (Pittsburgh Sleep Quality Index -PSQI) disponibilă de pe <http://www.goodmedicine.org.uk/>.

## **2.2.3. Determinări biochimice și imunoenzimatic**

Determinările biochimice și imunoenzimatic efectuate pentru evaluarea stresului oxidativ și a statusului inflamator din ser sau alte produse biologice au fost efectuate în cadrul Facultății de Biologie a Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași.

Determinările biochimice au la bază tehnici colorimetrice de măsură, iar pentru evaluarea absorbanțelor a fost utilizat sistemul spectrofotometric de măsură Specord 210 PLUS Analytik Jena.

Testele imunoenzimatiche au fost realizate prin tehnica ELISA, iar absorbantele, respectiv concentrațiile de analiți au fost obținute utilizând cititorul automat de microplaci ELISA Mindray MR-96A, Shenzhen, PR China.

#### **2.2.4. Evaluarea și examenul citologic colorat al materiilor fecale**

Coprocitograma reprezintă o serie de teste efectuate pe o mostră de materii fecale cu scopul diagnosticării anumitor afecțiuni ale tractului digestiv, dar în special pentru a aprecia răspunsul inflamator de la nivelul acestuia.

Sunt necesare materii fecale proaspete emise spontan, în recipient cu capac pentru fecale, fără mediu de transport. De preferat, se examinează proba în aceeași zi cu recoltarea din cauza stabilității reduse (maxim 24 ore la temperatura de 2-8°C).

Cu o ansă, s-a prelevat conținut suficient cât să fie întins pe suprafața unei lame, după care s-a lăsat la uscat la temperatura camerei. Peste lama așezată pe stativul de colorare, s-a pus un anumit număr de picături din soluție May - Grunwald, suficiente cât să acopere întregul frotiu. Fixarea s-a făcut cu alcool metilic, după care, lama s-a acoperit cu soluție Giemsa diluată.

După spălarea și uscarea lamelor, s-au efectuat examene microscopice. Citirea a avut loc la microscopul Nikon Eclipse E200, la obiectivul 100X cu ulei de imersie și s-a făcut o apreciere calitativă (foarte rare, rare, prezente, relativ frecvente și frecvente). După citire, lamele au fost degresate cu toluen și puse la păstrare în histotecă.

#### **2.2.5. Interpretarea statistică a rezultatelor**

Rezultatele obținute în studiile prezentate au fost analizate din punct de vedere statistic utilizând software-ul Minitab 19 (Minitab Inc., 2019). S-a utilizat analiza dispersională de varianță, model unifactorial (ANOVA one-way), pentru evaluarea semnificației varianței dintre și în grupuri, cât și testul t Student. Toate rezultatele au fost exprimate ca medie ± S.E.M. Corelațiile statistice au fost, de asemenea, calculate cu ajutorul coeficienților Pearson și Spearman. Valorile F pentru care  $p < 0,05$  au fost considerate ca semnificative din punct de vedere statistic.

## **CAPITOLUL 3. REZULTATELE ȘI DISCUȚII**

### ***3.1. Rezultate obținute prin studiul modelelor animale***

#### **3.1.1. Rezultatele obținute în urma aplicării paradigmei stresului multifactorial la șoareci**

##### **3.1.1.1.1. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra tractului gastrointestinal**

Evaluarea obiceiurilor tractului gastrointestinal la animalele de experiență a furnizat informații importante cu privire la efectul stresului multifactorial, astfel încât am observat că expunerea la diferite combinații de factori de stres pot induce creșteri semnificative ale timpului de tranzit intestinal. S-a identificat și o tendință de constipare a animalelor, în toate cele trei combinații de factori de stres, comparativ cu grupul de control, acest lucru fiind cuantificat prin numărul de materii fecale obținute în 24 ore (Figura 3.1). Cu toate acestea, diferențele mai mari față de grupul de control au fost mai clare pentru grupul expus la stres multifactorial și separare maternă neonatală, NMS+MF vs. control ( $F(1, 18) = 24.13, p = 0.001$ ).

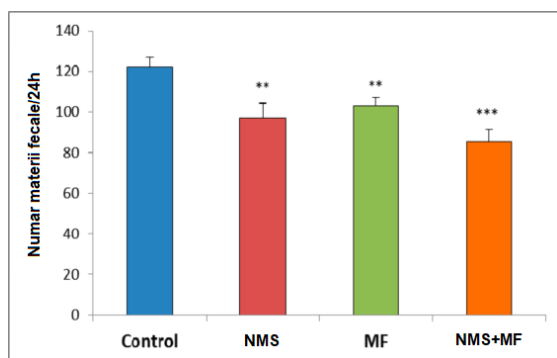


Figura 3.1. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra obiceiurilor tractului gastrointestinal, așa cum este prezentat după numărul de materii fecale la 24 de ore. Valorile sunt medii S.E.M (n = 10 per grup, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial.

### 3.1.1.1.2. Efectele diferitelor combinații de factori de stres asupra parametrilor evaluați utilizând în testul labirintului Y

Analiza comportamentală a performanței cognitive, în speță memoria de scurtă durată, nu a evidențiat diferențe semnificative generale din punct de vedere statistic între grupurile experimentale ( $F(3, 36) = 2.28, p = 0.09$ ) în ceea ce privește procentul de alternanță spontană. Cu toate acestea, analiza *post-hoc* a indicat o scădere semnificativă din punct de vedere statistic a procentului de alternanță spontană în grupul MF ( $F(1, 18) = 4.42, p = 0.04; t(18) = 2.11, p = 0.02$ ) și grupul NMS+MF ( $F(1, 18) = 5.65, p = 0.02; t(18) = 2.03, p = 0.03$ ), în comparație cu grupul de control (Figura 3.2).

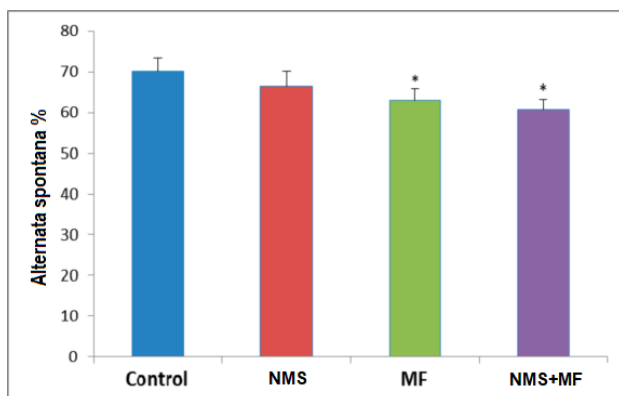


Figura 3.2. Efectele diferitelor combinații de factori de stres în testul labirintului Y, așa cum a arătat parametru de alternanță spontană. Valorile sunt medii ± S.E.M (n = 10 per grup, \* p < 0.05 vs. control, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial.

### 3.1.1.1.3. Efectele diferitelor combinații de factori de stres asupra parametrilor evaluați utilizând testul labirintului plus înălțat

Pentru evaluarea stării de anxietate la animalele de experiență, s-a cuantificat numărul de intrări în brațele deschise ale labirintului, care reprezintă un parametru al căror valori scăzute sunt caracteristice unui comportament anxiogenic, bazându-se pe aversiunea naturală a rozătoarelor pentru încăperi deschise. Numărul de intrări în brațele deschise a scăzut vizibil în toate grupurile expuse la stres, însă scăderi semnificative din punct de vedere statistic s-au înregistrat în NMS+MF vs. control ( $F(1, 18) = 6.18, p = 0.023; t(9) = 2.75, p = 0.01$ ) și aproape semnificative în grupul NMS vs. grupul de control ( $F(1, 18) = 3.92, p = 0.063; t(16) = 1.97, p = 0.03$ ) (Figura 3.3).

Timpul petrecut în brațele deschise (Figura 3.4), unul dintre cei mai sugestivi indicatori pentru efectele anxiolitice, a scăzut vizibil în toate grupurile expuse la stres în comparație cu grupul de control, dar o scădere semnificativă din punct de vedere statistic s-a putut observa doar pentru

grupurile MF vs. grupul de control ( $F(1, 18) = 4.52, p = 0.047; t(10) = 2.12, p = 0.02$ ) și MS+MF vs. grupul de control ( $F(1, 18) = 4.42, p = 0.049; t(18) = 2.10, p = 0.03$ ).

Un aspect interesant a fost observat atunci când am analizat explorarea brațelor închise (Figura 3.5), un parametru orientat către funcția locomotorie, și am constatat o scădere semnificativă a numărului de intrări în brațele închise ale labirintului în grupul NMS ( $F(1, 18) = 5.44, p = 0.037; t(16) = 2.33, p = 0.01$ ) față de grupul control, în timp ce celelalte două grupuri expuse la stres au prezentat scăderi mai puțin semnificative.

Episoadele de îngrijire a blănii (Figura 3.6), un alt indicator folosit pentru evaluarea anxietății, nu au înregistrat nicio variație generală semnificativă din punct de vedere statistic între grupuri, cu excepția unei creșteri moderate în grupul NMS ( $F(1, 18) = 4.64, p = 0,044; t(12) = -2.15, p = 0.01$ , comparativ cu grupul de control).

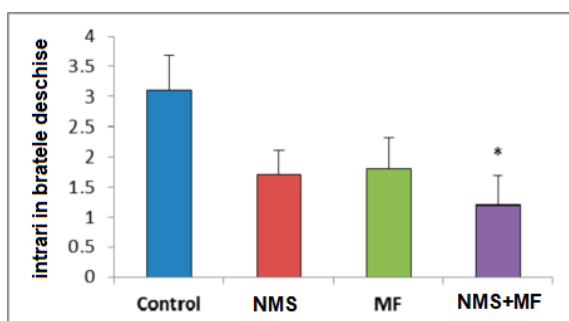


Figura 3.3. Efectele diferitelor combinații de factori de stres asupra numărului de intrări în brațele deschise evaluați în testul labirintului plus înălțat. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M ( $n = 10$  per grup, \*  $p < 0.05$  față de control, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial)

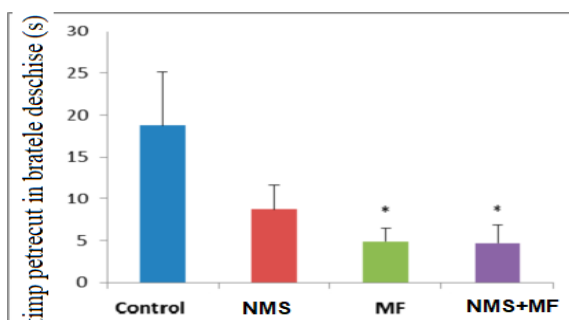


Figura 3.4. Efectele diferitelor combinații de factori de stres asupra timpului petrecut în brațele deschise evaluați în testul labirintului plus înălțat. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M ( $n = 10$  per grup, \*  $p < 0.05$  față de control, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial)

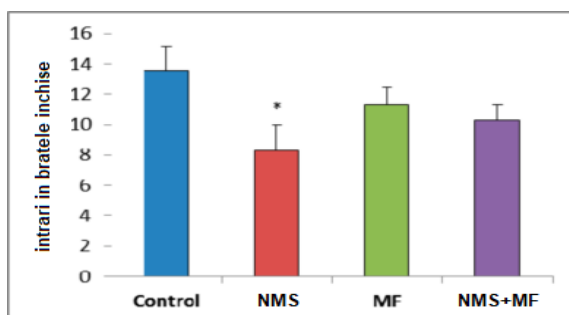


Figura 3.5. Efectele diferitelor combinații de factori de stres asupra numărului de intrări în brațele închise evaluați în testul labirintului plus înălțat. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M ( $n = 10$  per grup, \*  $p < 0.05$  față de control, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial)



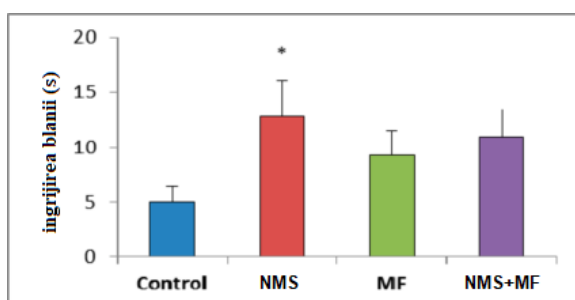


Figura 3.6. Efectele diferitelor combinații de factori de stres asupra episoadelor de îngrijire a blănii evaluați în testul labirintului plus înălțat. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M ( $n = 10$  per grup, \*  $p < 0.05$  față de control, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

#### 3.1.1.1.4. Efectele diferitelor combinații de factori de stres asupra parametrilor evaluați utilizând testul de înot forțat

Pentru testul de înot forțat, analiza statistică a timpului de înot a arătat o scădere semnificativă din punct de vedere statistic pentru grupul NMS comparativ cu grupul de control ( $F(1, 18) = 6.69$ ,  $p = 0.018$ ;  $t(17) = 2.58$ ,  $p = 0.009$ ), deși timpul de înot a fost vizibil scăzut și în celelalte două grupuri expuse la stres (Figura 3.7).

Analiza *post-hoc* a arătat diferențe generale semnificative între grupuri pentru timpul de imobilitate (plutire) ( $F(3, 36) = 2.874$ ,  $p = 0.04$ ). În mod evident, timpul de imobilitate a crescut în toate cele trei grupuri expuse la stres, înregistrând o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în grupul expus la stres multifactorial, MF, versus grupul de control ( $F(1, 18) = 3.64$ ,  $p = 0.048$ ;  $t(18) = 2.10$ ,  $p = 0.02$ ) și, respectiv, grupul expus la stresul multifactorial și separarea maternă neonatală, NMS+MF, ( $F(1, 18) = 6.614$ ,  $p = 0.019$ ;  $t(14) = 2.57$ ,  $p = 0.01$ ) față de grupul de control (Figura 3.8).

Mai mult decât atât, testele au relevat o diferență generală semnificativă între grupuri în ceea ce privește durata timpului de zbatere ( $F(3, 36) = 5.433$ ,  $p = 0.03$ ) și o scădere semnificativă a acestuia în grupul NMS+MF față de grupul de control ( $F(1, 18) = 7.154$ ,  $p = 0.015$ ;  $t(13) = 2.67$ ,  $p = 0.009$ ) și, de asemenea, față de grupul MS ( $F(1, 18) = 4.21$ ,  $p = 0.05$ ;  $t(10) = 3.62$ ,  $p = 0.02$ ) (Figura 3.9). Interesant este faptul că am observat o creștere aproape semnificativă a timpului de zbatere, fapt care poate sugera un comportament anxios, în grupul cu stresul multifactorial, în comparație cu grupul de control ( $F(1, 18) = 3.928$ ,  $p = 0.06$ ;  $t(13) = -1.98$ ,  $p = 0.03$ ).

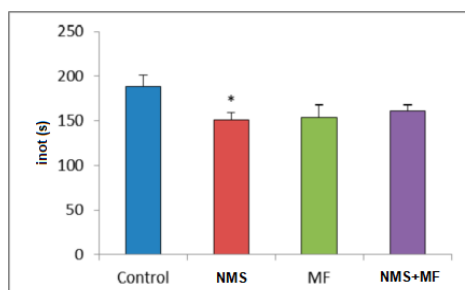


Figura 3.7. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra timpului de înot evaluați în testul de înot forțat. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M,  $n = 10$  per grup, \*  $p < 0.05$  față de control și #  $p < 0.05$  față de grupul NMS (NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

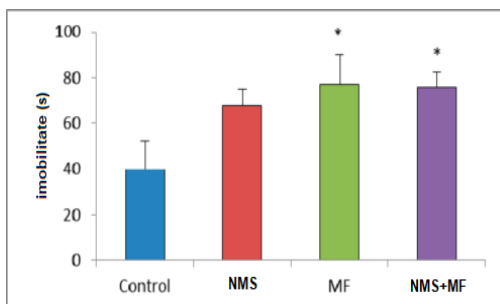


Figura 3.8. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra timpului de imobilitate (plutire) evaluați în testul de înot forțat (c) timp de luptă (secunde). Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M, n= 10 per grup, \* p < 0.05 față de control și # p < 0.05 față de grupul NMS (NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

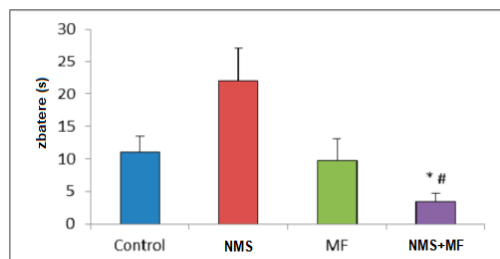


Figura 3.9. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra timpului de zbatere evaluați în testul de înot forțat (c) timp de luptă (secunde). Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M, n= 10 per grup, \* p < 0.05 față de control și # p < 0.05 față de grupul NMS (NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

### 3.1.1.2. Evaluarea parametrilor biochimici prezenți în țesutul cerebral

Evaluarea parametrilor stresului oxidativ, în speță analiza *post-hoc*, nu a evidențiat variații semnificative din punct de vedere statistic între grupuri în ceea ce privește activitatea antioxidantă a SOD (Figura 3.10), deși activitatea enzimatică a înregistrat scăderi vizibile cu precădere în grupul NMS+MFvs. control ( $F(1, 18) = 4.27, p = 0.53; t(18) = 2.06, p = 0.02$ ) și ușoare creșteri în grupul expus stresului multifactorial (MF).

Cu toate acestea, nivelurile GPx au fost în general scăzute în grupurile expuse la stres și scăderi semnificative au fost detectate în grupurile MF și NMS+MF comparativ cu grupul de control ( $F(1, 18) = 15.33, p = 0.002; t(12) = 3.91, p = 0.002$ ) și ( $F(1, 18) = 8.44, p = 0.009; t(17) = 2.90, p = 0.04$ ) (Figura 3.11).

În ceea ce privește concentrația MDA la nivelul țesutului cerebral, au fost observate diferențe generale semnificative între grupuri ( $F(3, 36) = 3.21, p = 0.03$ ), acest lucru indicând efectul expunerii la stres asupra acestui parametru de stres oxidativ. Niveluri crescute ale malondialdehidei au fost evidențiate în grupul MF față de grupul de control ( $F(1, 18) = 8.604, p = 0.008; t(15) = 2.93, p = 0.005$ ) și NMS+MF față de grupul de control ( $F(1, 18) = 7.516, p = 0.013; t(14) = -2.74, p = 0.007$ ), dar nu și în grupul NMS (Figura 3.12).

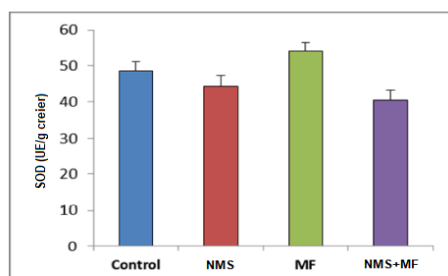


Figura 3.10. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra activității SOD de la nivel cerebral la șoareci. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per grup, \* p < 0.05 și \*\* p < 0.01, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

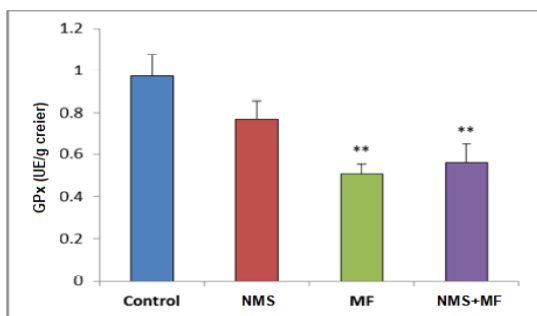


Figura 3.11. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra activității GPx de la nivel cerebral la șoareci. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per grup, \* p < 0.05 și \*\* p < 0.01, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

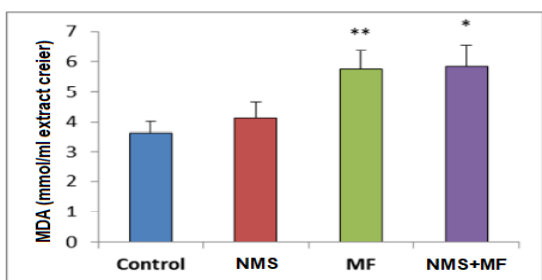


Figura 3.12. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra nivelurilor de MDA de la nivel cerebral la șoareci. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per grup, \* p < 0.05 și \*\* p < 0.01, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

### 3.1.1.3. Evaluarea parametrilor biochimici prezenți în țesutul intestinal

În ceea ce privește markerii stresului oxidativ la nivel colonic, nu există diferențe semnificative în activitatea SOD între grupuri (Figura 3.13).

În mod similar, activitatea enzimatică a GPx în grupurile stresate nu a variat semnificativ în raport cu controlul, cu excepția unei scăderi semnificative din punct de vedere statistic în grupul NMS versus grupul de control (F (1, 18) 7.77, p = 0.012; t (18) = 2.78, p = 0.006) (Figura 3.14).

Nivelurile MDA de la nivelul țesutului intestinal au înregistrat o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în grupul NMS+MF comparativ cu grupul de control (F (1, 18) = 7.241, p = 0.0149; t(15) = 2.69, p = 0.008), în timp ce celelalte două grupuri expuse la stres nu au avut creșteri semnificative în comparație cu martorii (Figura 3.15).

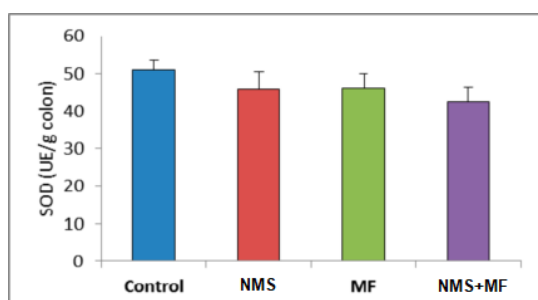


Figura 3.13. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra activității SOD de la nivel colonic la șoareci. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per grup, \* p < 0.05 și \*\* p < 0.01, NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

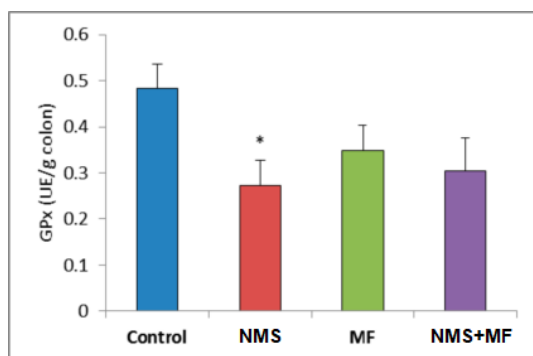


Figura 3.14. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra activității GPx de la nivel colonic la șoareci. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per grup, \*  $p < 0.05$  și \*\*  $p < 0.01$ , NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

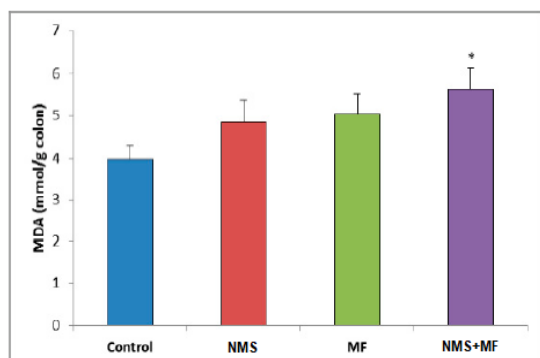


Figura 3.15. Efectul diferitelor combinații de factori de stres asupra nivelurilor de MDA de la nivel cerebral la șoareci. Valorile sunt medii  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per grup, \*  $p < 0.05$  și \*\*  $p < 0.01$ , NMS = separarea maternă neonatală, MF = stres multifactorial).

### 3.1.2. Rezultatele obținute în urma aplicării paradigmei stresului multifactorial la șoareci și administrarea extractului de *Camelina sativa*

#### 3.1.2.1.1. Efectul administrării extractului metanolic și etanolic de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra memoriei de scurtă durată

În ceea ce privește evaluarea memoriei de scurtă durată la șoarecii de experiență, utilizând testul labirintului Y, nu s-au înregistrat diferențe generale semnificative din punct de vedere statistic între grupele expuse la stres și tratate cu extractele metanolice și etanolice (ME și EE), însă am putut evidenția o variație semnificativă generală legată de procentul de alternare spontană ( $F_{11, 24} = 3.89$ ,  $p = 0.000874$ ), chiar dacă nu am putut observa diferențe semnificative în legătură cu activitatea locomotorie ( $F_{11, 24} = 1.18$ ,  $p = 0.331$ ).

Analiza ulterioară a datelor a arătat faptul că nu există variații semnificative între grupul de control nestresat, care a primit extractul metanolic ( $p = 0.646$ ) sau grupul de control nestresat care a primit extractul etanolic ( $p = 0.646$ ), comparativ cu grupul de control (Figura 3.30).

De asemenea, când am comparat efectul celor două extracte din grupurile expuse la stres, respectiv, controale, nu am observat diferențe statistice sau variații între grupele control+EE și control+ME ( $p = 0.817$ ). Totuși, s-a putut constata tendința de îmbunătățire a memoriei de scurtă durată în grupul expus la stres multifactorial și de conținție (SC+MF) care a primit EE, în comparație cu ME ( $p = 0.018$ ) și soluție salină ( $p = 0.007$ ).

În mod similar, EE s-a dovedit a fi mai eficient pentru îmbunătățirea memoriei pe termen scurt în grupul de șoareci expus la stres SC+NMS+MF, în comparație cu ME ( $p = 0.05$ ). De asemenea, o creștere semnificativă din punct de vedere al performanței memoriei de scurtă durată a fost observată la grupul de șoareci expus la stresul provocat de separarea maternă neonatală și stresul de

contenție (SC+NMS) în timp ce primesc EE ( $p = 0.048$ ), în comparație cu grupul stresat corespondent dar netratat, și nicio diferență importantă între efectul ME și EE asupra acestui tip de stres ( $p = 0.116$ ).

Cu toate acestea, s-a observat că performanța memoriei de scurtă durată a fost semnificativ scăzută în grupul de șoareci stresati și tratați cu ME în comparație cu grupul de controlul care a primit acest extract ( $p = 0.008$ ).

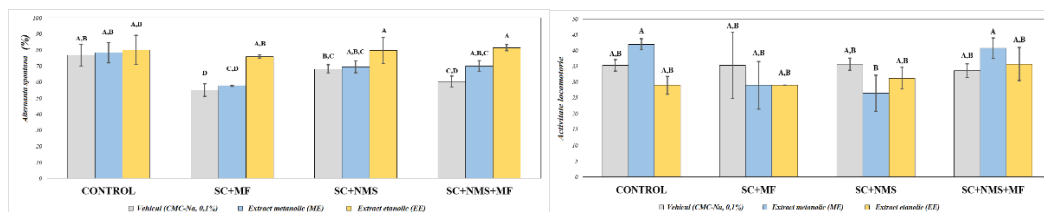


Figura 3.30. Efecte ale extractelor metanolic (ME) și etanolic (EE) obținute din semințe de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra memoriei spațiale pe termen scurt (a) și a activității locomotorii (b), așa cum s-a observat în testul labirintului Y, într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie ± S.E.M ( $n = 3$  per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic; A, B, C, D= testul LSD al lui Fisher).

### 3.1.2.1.2. Efectul administrării extractului metanolic și etanolic de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului anxios

Comportamentul asemănător anxietății a fost evaluat cu ajutorul testului labirintului plus înălțat și am găsit o diferență semnificativă de grup în ceea ce privește timpul petrecut în brațele deschise ale dispozitivului ( $F_{11, 24} = 6.04$ ,  $p = 1.5E^{-05}$ ) și numărul de intrări în brațele deschise ( $F_{11, 24} = 2.05$ ,  $p = 0.0045$ ). Analiza ulterioară nu a arătat nicio diferență în ceea ce privește apariția comportamentului anxios în grupurile nestresate în timp ce primesc ME ( $p = 0.719$ ) și EE ( $p = 0.28$ ), însă au existat modificări semnificative în ceea ce privește numărul intrărilor în brațele deschise (deci mobilitatea animalului) în grupul SC+MF tratat cu ME vs. SC+MF tratat cu EE ( $p=0.026$ ) (Figura 3.31).

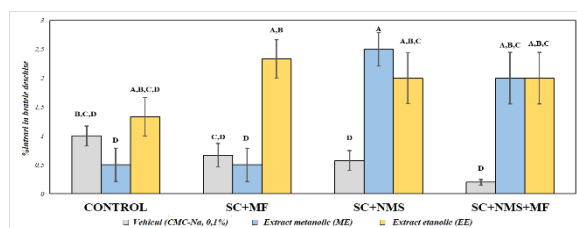


Figura 3.31. Efectele extractelor metanolic (ME) și etanolic (EE) obținute din semințe de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului anxios, așa cum s-a observat în testul labirintului plus înălțat, prin numărul de intrări în brațele deschise, într-un model

animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie ± S.E.M ( $n = 3$  per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic; A, B, C, D= testul LSD al lui Fisher).

Efectul anxiolitic semnificativ a fost evidențiat și în grupurile expuse la cele trei tipuri de stres (SC+NMS+MF) care primesc ME și EE ( $p < 0.001$ ) (Figurile 3.31 și 3.32), dar cu un randament mai mare pentru EE ( $p = 0.01$ , în comparație cu ME) (Figura 3.32). O îmbunătățire semnificativă a comportamentului anxios s-a observat în grupul SC+NMS după administrarea extractului etanolic (EE) ( $p=0.034$ ) și doar o ușoară ameliorare a acestui comportament a rezultat după administrarea aceluiași extract în grupul SC+MF ( $p=0.07$ ), așa cum a putut fi observat în urma evaluării timpului petrecut în brațele deschise (Figura 3.32).

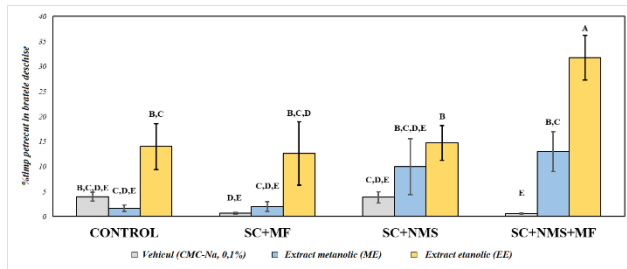


Figura 3.32. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului anxios, așa cum s-a observat în testul labirintului plus înălțat, prin timpul petrecut în brațele deschise,

într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic; A, B, C, D= testul LSD al lui Fisher).

Cu toate acestea, o îmbunătățire semnificativă din punct de vedere statistic a fost observată pentru ambele extracte administrate la grupul de șoareci cel mai expus la stres ( $p_{ME} = 0.013$ ,  $p_{EE} < 0.001$ ), comportamentul asemănător anxietății fiind în continuare semnificativ amplificat pentru aceste grupuri, în comparație cu grupul de control ( $p_{ME} = 0.05$ ,  $p_{EE} = 0.014$ , față control+ extracte)

Deoarece este, de asemenea, un parametru semnificativ pentru evaluarea comportamentului anxios, numărul de intrări în brațele închise ale dispozitivului nu a variat între grupurile experimentale ( $F_{11, 24} = 2.03$ ,  $p = 0.052$ ) (Figura 3.33).

În ciuda acestui fapt, am observat că atât ME ( $p = 0.045$ ) și EE ( $p = 0.049$ ) ar putea manifesta un efect anxiolitic atunci când este administrat grupului SC+NMS.

În mod similar, am observat că efectele negative ale stresului asupra statusului afectiv sunt atenuate semnificativ cu ajutorul extractului din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina în grupurile SC+MF ( $p_{EE} = 0.041$ ), SC+NMS ( $p_{ME} = 0.003$ ,  $p_{EE} = 0.024$ ) și SC+NMS+MF ( $p_{ME} = 0.004$ ), în ciuda faptului că există, de asemenea, sunt semnificativ diferite de grupul de control ( $p_{ME} = 0.04$ ).

Așadar, prin comparație, noi a observat că extractul metanolic a fost mai eficient în scopul atenuării comportamentului anxios în grupul expus stresului de contenție și separării materne neonatale ( $p = 0.01$ ) și în grupul expus celor trei tipuri de stres (SC+NMS+MF) comparativ cu grupul SC+MF ( $p = 0.004$ ).

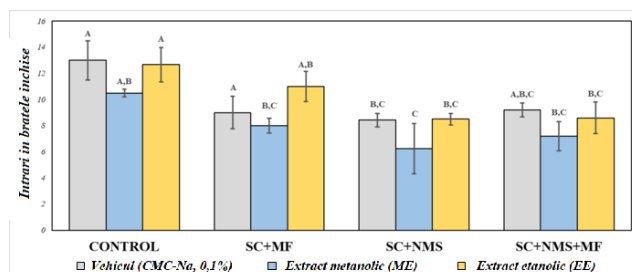


Figura 3.33. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului anxios, așa cum s-a observat în testul labirintului plus înălțat, prin numărul de intrări în brațele închise,

într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic; A, B, C, D= testul LSD al lui Fisher).

În ceea ce privește apariția comportamentului anxios (îngrijirea blăni), nu am observat nicio diferență generală semnificativă între grupuri ( $F_{11, 24} = 0.26, p = 0.988$ ) (Figura 3.34).

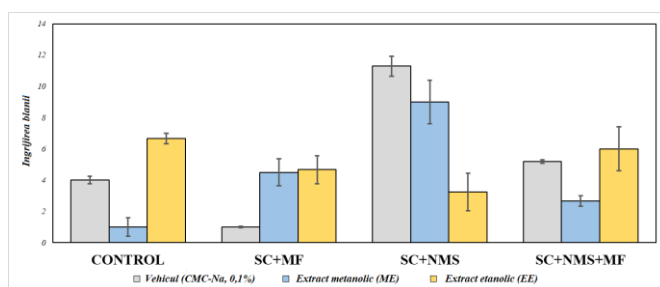


Figura 3.34. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului anxios, așa cum s-a observat în testul labirintului plus înălțat, prin comportamentul de îngrijire a blăni, într-un model animal de

sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M ( $n = 3$  per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic).

### 3.1.2.1.3. Efectul administrării extractului metanolic și etanolic de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului depresiv

În timpul evaluării efectelor celor două extracte de semințe studiate asupra apariției unui comportament asemănător depresiei în modelul experimental de sindrom de colon iritabil la șoarece, am observat modificări generale semnificative ale timpului de înot ( $F_{11, 24} = 2.96, p = 0.006$ ). Mai mult decât atât, am constatat că există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între cele două extracte în timp ce sunt administrate șoarecilor nestresați ( $p = 0.031$ ), asta în timp ce EE a fost considerat mai puțin eficient în împiedicarea apariției comportamentului de tip depresiv ( $p = 0.393$ ). În plus, efectul pozitiv al ME în ceea ce privește potențialul antidepressiv a fost observat și în grupul cel mai expus la stres (SC+NMS+MF) ( $p = 0.05$ ), respectiv SC+NMS ( $p = 0.011$ ) (Figura 3.35).

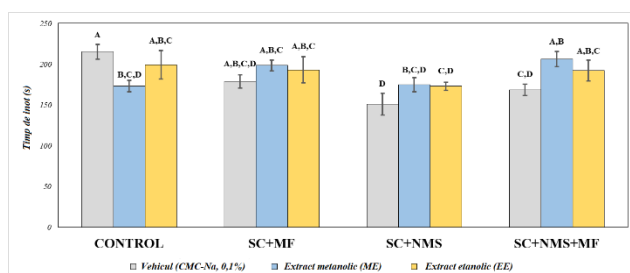


Figura 3.35. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului depresiv, așa cum s-a observat în testul înotului forțat, prin timpul de înot, într-un model animal de sindrom de colon iritabil

la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M ( $n = 3$  per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D= testul LSD al lui Fisher).

Legat de timpul petrecut de animal în imobilitate, nu au fost identificate variații semnificative între grupurile studiate ( $F_{11, 24} = 2.34, p = 0.27$ ). Un efect antidepressiv, vizibil și semnificativ din punct de vedere statistic al extractului metanolic, s-a putut observa în grupul SC+NMS+MF comparativ cu grupul de control ( $p = 0.002$ ) (Figura 3.36).

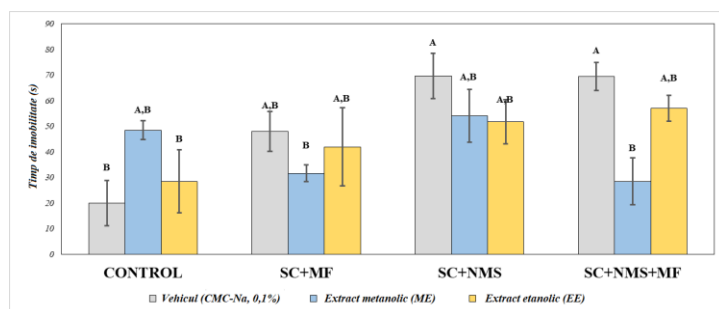


Figura 3.36. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului depresiv, așa cum s-a observat în testul înotului forțat, prin timpul de imobilitate, într-un model animal de sindrom de

colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de conținție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B= testul LSD al lui Fisher).

Comportamentul de zbatere manifestat de animale în timpul bateriei de teste comportamentale a relevat diferențe generale semnificative între grupurile studiate ( $F_{11, 24} = 2.0$ ,  $p = 0.045$ ). În acest sens, am observat că EE a avut un randament mai bun în scăderea comportamentului asemănător depresiei în grupul SC+MF ( $p = 0.049$ ) și grupul SC+NMS+MF ( $p = 0.013$ ), în comparație cu șoarecii din grupul SC+NMS (Figura 3.37).

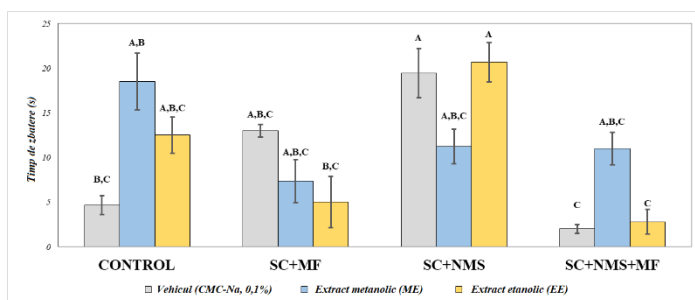


Figura 3.37. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra comportamentului depresiv, așa cum s-a observat în testul înotului forțat, prin timpul de zbatere, într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece.

Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de conținție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C= testul LSD al lui Fisher).

### 3.1.2.2. Efectul extractului metanolic și etanolic din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra statusului oxidativ de la nivelul țesutului cerebral

Studiind activitățile enzimelor implicate în stresul oxidativ de la nivelul creierului și variația acestora în modelul experimental folosit, am observat că ambele extracte utilizate au un efect general semnificativ din punct de vedere al activității SOD, ( $F_{11, 96} = 5.06$ ,  $p = 2.39E^{-06}$ ) dar fără a înregistra efecte modulatorii în timp ce au fost administrate grupurilor care conțineau șoareci nestresați ( $p_{ME} = 0.22$ ,  $p_{EE} = 0.113$ , comparativ cu grupul de control). De asemenea, a devenit evident faptul că cea mai mare diferență în ceea ce privește efectul modulator, a fost obținută după administrarea extractelor în grupurile SC+NMS ( $p < 0.001$ ). Mai mult decât atât, am observat că atât ME, cât și EE a exprimat în mod semnificativ o modulare negativă a activității SOD în timp ce este administrat în grupul SC+MF ( $p_{ME} < 0.001$ ,  $p_{EE} < 0.001$ , în comparație cu grupul de control) și în grupul SC+NMS ( $p_{ME} = 0.013$ ,  $p_{EE} = 0.007$ , comparativ cu grupul de control) (Figura 3.38).



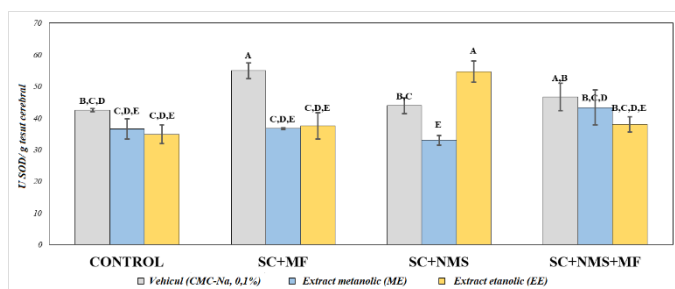


Figura 3.38. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra activității SOD de la nivel cerebral într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS=

separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D, E= testul LSD al lui Fisher).

Analiza efectului extractelor din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra activității specifice a GPx, a relevat diferențe generale semnificative între grupurile studiate ( $F_{11, 96} = 2.62$ ,  $p = 0.005$ ) și diferențe semnificative din punct de vedere statistic între potențialul modulator al ME în timpul administrării la șoarecii nestresați ( $p = 0.048$ ), cu efecte diametral opuse atunci când este administrat șoarecilor din grupul SC+NMS+MF ( $p = 0.007$ ). Capacitatea și efectul antioxidant al extractului etanolic a fost observat cu precădere atunci când a fost administrat grupului expus la toate cele trei tipuri de stres, SC+NMS+MF ( $p_{EE} = 0.034$ ) (Figura 3.39).

Mai mult, s-a observat că activitatea GPx la nivelul țesutului cerebral la șoarecii tratați cu ME și EE din grupurile SC+NMS ( $p_{EE} = 0.043$ ) și SC+NMS+MF ( $p_{ME} = 0.001$ ) ar putea depăși nivelurile prezente în grupul de control.

Cu toate acestea, cel mai mare randament în ceea ce privește modularea activității GPx în țesutul cerebral, îl are extractul metanolic administrat grupului SC+NMS+MF ( $p = 0.05$ ), în timp ce extractul etanolic a fost mai eficient întru modularea activității enzimei GPx în grupul SC+NMS ( $p = 0.008$ ).

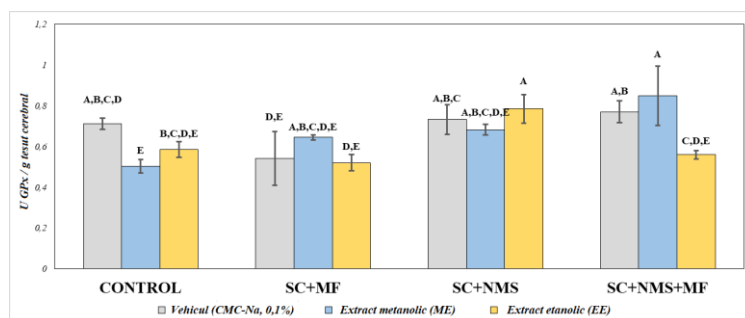


Figura 3.39. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra activității GPx de la nivel cerebral într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M

(n = 3 per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D, E= testul LSD al lui Fisher).

Analiză biochimică a probelor studiate a relevat faptul că extractele obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina au un efect general semnificativ asupra nivelurilor de MDA ( $F_{11, 96} = 17.59$ ,  $p = 1.7749E^{-19}$ ), însă nu a fost observată nicio diferență în ceea ce privește efectul acestora administrate șoarecilor care nu au fost expuși la factorii de stres ( $p_{ME} = 0.199$ ,  $p_{EE} = 0.261$ ).

De asemenea, s-au identificat diferențe notabile, semnificative din punct de vedere statistic, în ceea ce privește efectul acestora asupra nivelurilor de MDA, între cele două tipuri de extracte. Astfel, diferențele au fost observate în grupul expus la stresul de contenție și cel provocat de separarea maternă neonatală, SC+NMS ( $p = 0.015$ ), în grupul expus la stresul de contenție și cel multifactorial, SC+MF ( $p < 0.001$ ), și în grupul expus la toate cele trei tipuri de factori de stres, SC+NMS+MF ( $p < 0.001$ ), având un efect mai vizibil în ultimul grup.

În ceea ce privește eficiența extractelor vis a vis de peroxidarea lipidică la nivel cerebral, ambele extracte, atât cel metanolic cât și cel etanolic, au înregistrat efecte vizibile în grupul SC+MF ( $p_{ME} < 0.001$ ,  $p_{EE} = 0.013$ ). Totodată, am observat că extractul etanolic a sporit semnificativ procesul de peroxidare lipidică la nivelul țesutului cerebral în grupul SC+NMS ( $p = 0.006$ ). Mai mult decât atât, rezultatele noastre au sugerat faptul că extractul metanolic poate manifesta efecte inflamatorii (SC+NMS+MF+ME vs. C+ME,  $p < 0.001$ ; SC+NMS+MF+ME vs. SC+NMS+MF,  $p < 0.001$ ), în special în grupul cel mai expus la stres (Figura 3.40).

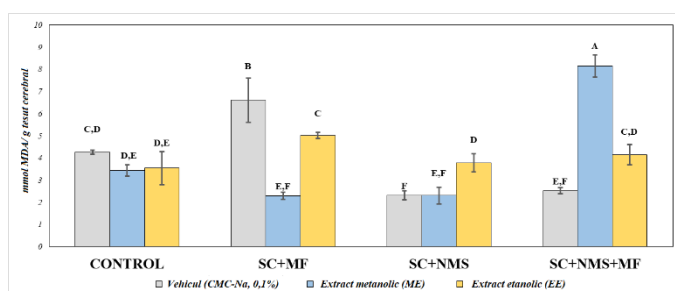


Figura 3.40. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra nivelurilor de MDA din țesutul cerebral într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$

S.E.M ( $n = 3$  per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D, E, F= testul LSD al lui Fisher).

În ceea ce privește nivelurile de proteine totale solubile din țesuturile creierului, când am analizat efectul general al extractelor de *Camelina sativa*, var. Mădălina am găsit diferențe semnificative din punct de vedere statistic între grupuri ( $F_{11, 96} = 3.64$ ,  $p = 0.00021$ ) și diferențe semnificative între extrase atunci când sunt administrate grupului de șoareci expus stresului de contenție și celui multifactorial ( $p = 0.002$ ). Totodată, s-au evidențiat creșteri semnificative ale nivelurilor de proteine totale solubile la nivelul țesutului cerebral după administrarea ambelor tipuri de extracte ( $p_{ME} = 0.037$ ,  $p_{EE} < 0.001$ ) (Figura 3.41).

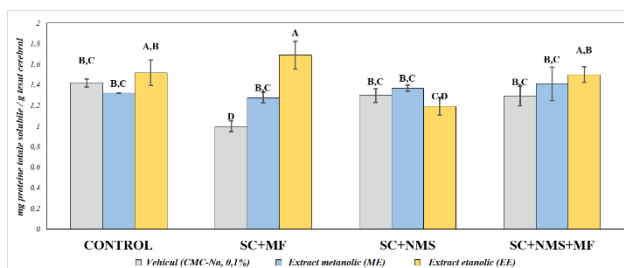


Figura 3.41. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra nivelurilor de proteine totale solubile din țesutul cerebral într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M ( $n = 3$  per grup; C= control; SC= stres de contenție;

NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D, E, F= testul LSD al lui Fisher).

3.1.2.3. *Efectul extractului metanolic și etanolic din semințele de Camelina sativa var. Mădălina asupra statusului oxidativ de la nivelul țesutului colonic*

Studiul nostru a evaluat statusul oxidativ și de la nivelul țesutului intestinal după administrarea celor două tipuri de extracte, metanolic și etanolic, în cadrul modelului animal experimental de sindrom de colon iritabil la șoareci. În acest sens, rezultatele obținute au indicat un efect general semnificativ statistic între grupuri, ale acestor extracte, asupra activității SOD la nivel colonic ( $F_{11, 96} = 5.57$ ,  $p = 5.1E-07$ ).

Comparând efectele celor două extracte, nu am observat diferențe semnificative asupra activității enzimei SOD, când acestea au fost administrate șoarecilor nestresați din grupul de control ( $p_{ME} = 0.385$ ,  $p_{EE} = 0.511$ ). Totuși, în ciuda acestui aspect, rezultatele au relevat diferențe semnificative din punct de vedere statistic în ceea ce privește efectul modulator al extractelor asupra activității enzimatice studiate, în speță, în grupurile SC+NMS ( $p=0.014$ ) și SC+MF ( $0.027$ ), cu un efect modulator mai eficient în grupul din urmă ( $p_{ME} < 0.001$ ,  $p_{EE} = 0.027$ ).

Analizând acest aspect, am constatat că o expunere la stres suplimentară nu are neapărat un efect cumulativ, mai ales că activitatea SOD din țesuturile colonice la animalele din grupul SC+NMS+MF a înregistrat un randament scăzut după administrarea ambelor extracte ( $p_{ME}=0.047$ ,  $p_{EE}=0.02$ ) comparativ cu grupul de control (Figura 3.42).

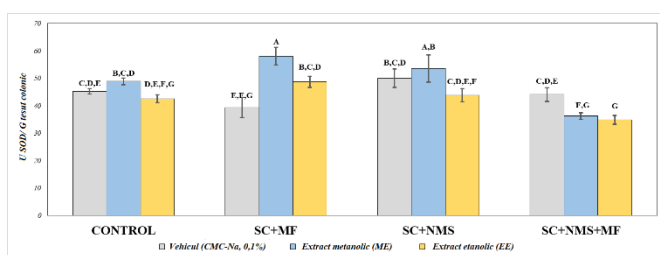


Figura 3.42. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra activității SOD de la nivel colonic într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie ± S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D, E, F, G= testul LSD al lui Fisher).

Potențialul antioxidant al extractelor din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina a fost evaluat și din prisma efectului modulator pe care acestea le manifestă asupra activității specifice a GPx în țesuturile menționate ( $F_{11, 96} = 4.80$ ,  $p = 5.36E-06$ ). Deși nu s-au identificat diferențe din acest punct de vedere, după administrarea extractelor la șoarecii nestresați ( $p_{ME} = 0.377$ ,  $p_{EE} = 0.972$ ), am observat că activitatea GPx a scăzut semnificativ după administrarea extractului etanolic în grupul SC+MF, comparativ cu administrarea extractului etanolic ( $p=0.027$ ). De asemenea, un efect semnificativ din punct de vedere statistic asupra activității enzimei GPx l-a avut atât extractul metanolic ( $p=0.002$ ), cât și cel etanolic ( $p=0.001$ ) în grupul cel mai expus la stres, SC+NMS+MF.

În același timp, un efect semnificativ asupra activității enzimatice a celor două extracte folosite, l-am întâlnit atunci când acestea au fost administrate în grupul SC+NMS ( $p < 0.001$ ) (Figura 3.43).

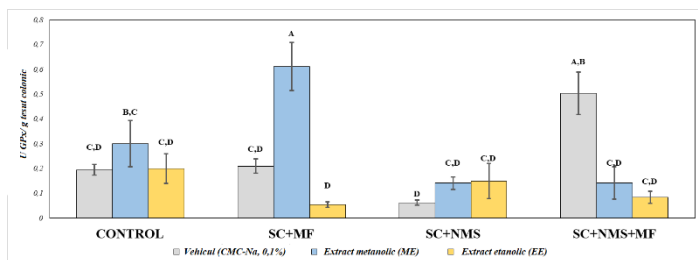


Figura 3.43. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra activității GPx de la nivel colonic într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt exprimate ca

medie  $\pm$  S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de conținție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D= testul LSD al lui Fisher).

Peroxidarea lipidică la nivel colonic a cunoscut variații generale semnificative după administrarea celor două extracte ( $F_{11, 96} = 9.66, p = 7.37E-12$ ). Mai mult decât atât, s-a observat că extractul etanolic folosit în grupul de șoareci nestresați are potențialul de a induce o creștere semnificativă a nivelurilor de MDA ( $p < 0.001$ ).

În plus, există diferențe semnificative ale efectului modulator în ceea ce privește peroxidarea lipidică, efecte induse de cele două extracte, și care diferă între ele atunci când le sunt administrate șoarecilor neexpuși la stres ( $p < 0.001$ ).

În mod similar, ambele extracte manifestă un efect pro-oxidant în țesutul intestinal, prin prisma nivelurilor de MDA evaluate în grupul SC+NMS ( $p_{EE}=0.001$ ) și SC+MF ( $p_{ME}=0.005$ ) (Figura 3.44).

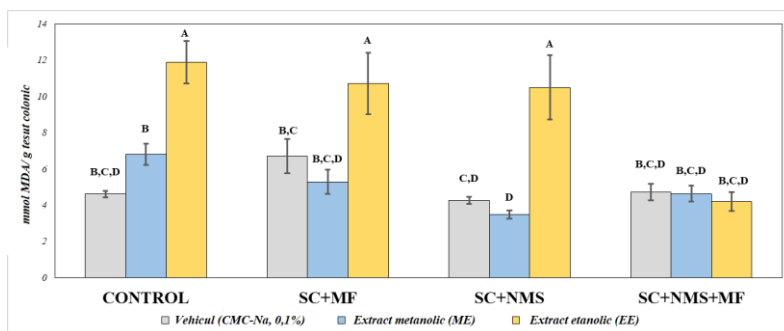


Figura 3.44. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra nivelurilor de MDA din țesutul colonic într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile

sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de conținție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D= testul LSD al lui Fisher).

Totodată, cel mai mare randament obținut pentru inhibarea peroxidării lipidice a fost observat când a fost administrat extractul etanolic în grupul cel mai expus la stres, SC+NMS+MF comparativ cu toate celelalte grupuri care au fost tratate cu același extract ( $p < 0.001$ ).

Proteinele totale solubile au înregistrat variații generale semnificative ( $F_{11, 96} = 7.80, p = 8.03E-10$ ), și un potențial sporit, relevant din punct de vedere statistic, al extractului metanolic de a scădea nivelul proteinelor totale solubile la șoarecii nestresați comparativ cu grupul de control ( $p = 0.02$ ).

Un efect similar a fost constatat și în grupurile SC+NMS ( $p = 0.022$ ) și SC+NMS ( $p = 0.015$ ), care au primit extract etanolic, comparativ cu cel metanolic (Figura 3.45).

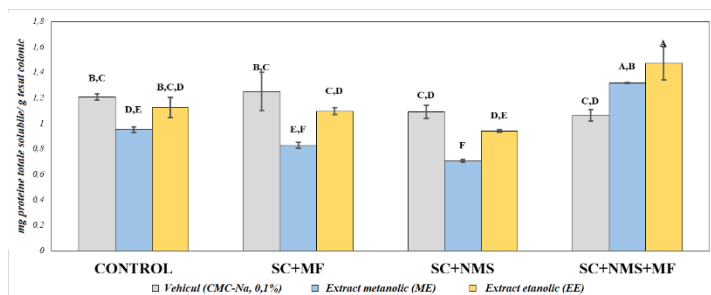


Figura 3.45. Efecte ale extractelor metanolice (ME) și etanolice (EE) obținute din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina asupra nivelurilor de proteine totale solubile din țesutul cerebral într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șoarece. Valorile sunt

exprimate ca medie  $\pm$  S.E.M (n = 3 per grup; C= control; SC= stres de contenție; NMS= separare maternă neonatală; MF=stres multifactorial; ME= extract metanolic; EE= extract etanolic, A, B, C, D, E, F= testul LSD al lui Fisher).

### 3.1.2.5. Evaluarea și examenul citologic colorat al materiilor fecale

În urma evaluării microscopice, s-au putut identifica ușoare variații ale elementelor observate. În grupul de control, levurile sunt frecvente sau prezente în proporții egale. O frecvență similară a fost observată în restul grupurilor.

În ceea ce privește hematiile, acestea au o frecvență mai redusă comparativ cu levurile în toate cele patru grupuri evaluate (prezente sau rare). Celulele inflamatorii (limfocite) s-au întâlnit într-o frecvență redusă (rare și foarte rare). De asemenea, se poate observa prezența florei polimorfe în majoritatea frotiurilor evaluate.

## 3.1.3. Rezultatele obținute în urma aplicării paradigmei stresului multifactorial la șobolani și administrarea extractului de *Chrysanthellum americanum*

### 3.1.3.1 Evaluarea parametrilor comportamentali

#### 3.1.3.1.1. Efectul extractului polifenolic de *Chrysanthellum americanum* asupra memoriei de scurtă durată

Analiza comportamentală utilizând testul labirintului Y a relevat modificări semnificative în ceea ce privește variația generală a procentului de alternări spontane între grupurile de șobolani ( $F_{3, 12} = 5.11$ ,  $p = 0.009$ ). Deși scăderea procentului de alternări spontane înregistrată în grupul șobolanilor cu simptome de sindrom de colon iritabil (grupul IBS) comparativ cu grupul de control nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic ( $F_{1, 9} = 5.73$ ,  $p = 0.31$ ), procentul menționat a fost semnificativ scăzut comparativ cu grupul care a primit doar extract ( $F_{1, 9} = 5.73$ ,  $p < 0.034$ ). Altă scădere semnificativă din punct de vedere statistic între grupurile studiate nu a mai fost identificată (Figura 3.49).

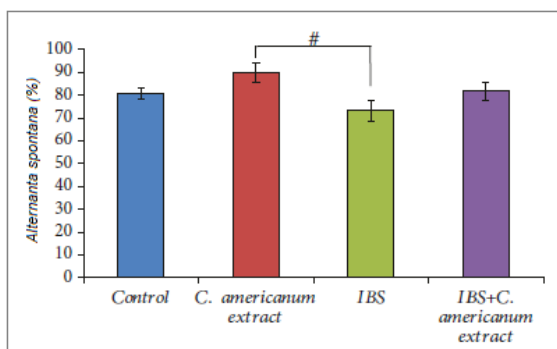


Figura 3.49. Efectul tratamentului cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum* asupra memoriei de scurtă durată într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șobolani în testul labirintului Y, exprimat ca alternanță spontană (%). Valorile sunt exprimate ca medii  $\pm$  S E M (n = 6 per grup; #p = 0,03 pentru grupul tratat cu extractul de *C. americanum* vs. grupul IBS).

### 3.1.3.1.2. Efectul extractului polifenolic de *Chrysanthellum americanum* asupra comportamentului anxios

Evaluarea comportamentului anxios cu ajutorul testului labirintului plus înălțat, în urma administrării extractului polifenolic de *Chrysanthellum americanum*, a relevat faptul că planta manifestă acțiune anxiolitică, prin numărul ridicat de intrări în brațele deschise pe care șobolanii l-au înregistrat în grupul IBS și tratat ulterior cu extract versus grupul IBS ( $F_{1,10} = 3.46$ ,  $p = 0.09$ ).

Același număr ridicat de intrări în brațele deschise s-a regăsit și în grupul de control, respectiv cel cărui i-a fost administrat doar extractul (Figura 3.50). Faptul că nu există o diferență statistică semnificativă, poate fi explicat prin tendința generală a șobolanilor de a face nu mai mult de o intrare în brațele deschise, cu excepția grupului IBS, care a evitat explorarea în brațele deschise.

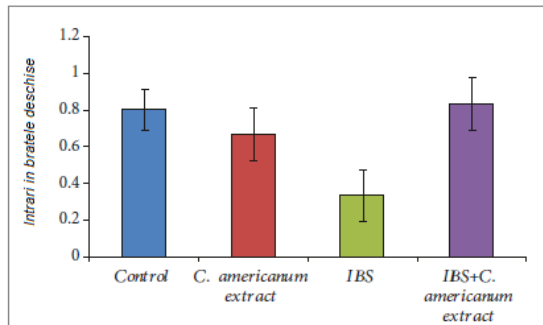


Figura 3.50. Efectul tratamentului cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum* asupra comportamentului anxios într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șobolani în testul labirintului plus înălțat, exprimat ca număr de intrări în brațele deschise. Valorile sunt exprimate ca medii  $\pm$  S E M (n = 6 per grup).

Mai mult decât atât, aceste rezultate au fost confirmate prin analizarea timpului petrecut în brațele deschise ale dispozitivului (Figura 3.51). Testul statistic ANOVA a subliniat faptul că tratamentul cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum* a crescut semnificativ timpul petrecut în brațele deschise în grupul tratat cu extract comparativ cu grupul IBS ( $F_{1,10} = 5.18$ ,  $p < 0.04$ ), și, de asemenea, în grupul IBS care a primit extract comparativ cu grupul IBS ( $F_{1,10} = 5.21$ ,  $p < 0.04$ ).

O scădere semnificativă din punct de vedere statistic a timpului petrecut în brațele deschise a grupului IBS comparativ cu grupul de control ( $F_{1,10} = 8.81$ ,  $p < 0.02$ ) sugerează, de asemenea un nivel de anxietate crescut la șobolanii cărora le-au fost induse simptomele similare sindromului de colon iritabil.

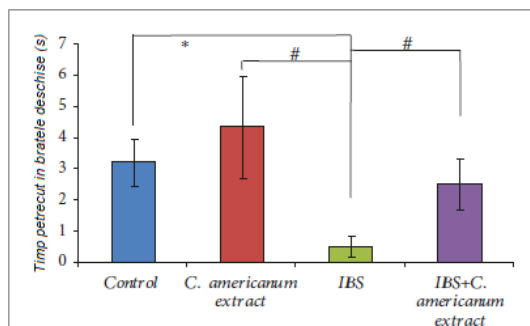


Figura 3.51. Efectul tratamentului cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum* asupra comportamentului anxios într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șobolani, în testul labirintului plus înălțat, exprimat ca timp petrecut în brațele deschise. Valorile sunt exprimate ca medii  $\pm$  S E M (n = 6 per grup \*p = 0.02 pentru grupul IBS vs. grupul de control; #p = 0.04 pentru grupul tratat cu extract, respectiv cel cu IBS și tratat ulterior cu extract de

*Chrysanthellum americanum* vs. grupul cu IBS).

### 3.1.3.1.3. Efectul extractului polifenolic de *Chrysanthellum americanum* asupra comportamentului depresiv

Evaluarea comportamentului depresiv la animalele de experiență s-a făcut cu ajutorul testului înotului forțat care a scos în evidență proprietăți antidepressive ale extractului polifenolic utilizat.

Au fost observate diferențe generale semnificative din punct de vedere statistic între grupurile studiate, atât în ceea ce privește timpul de înot (F 3,20 = 5.86, p < 0.0048) (Figura 3.53), cât și cel petrecut în imobilitate (F 3, 20 = 5.55, p < 0.0061) (Figura 3.54). În timp ce expunerea repetată la factorii de stres a generat un comportament asemănător depresiei în grupul IBS, aspect subliniat printr-un timp de înot semnificativ scăzut (p = 0.01) (Figura 3.53) și o imobilitate crescută (p = 0.035) (Figura 3.54) ambele comparativ cu grupul de control, extractul polifenolic a arătat un efect antidepressiv pentru ambele grupe cărora li s-au administrat (grupul extract și grupul IBS+extract).

Cel mai important aspect însă, este această inversare benefică a efectului extractului care iese în evidență în grupul IBS și tratat cu extract, sugerat prin creșterea semnificativă a timpului de înot (p = 0.03), comparativ cu grupul IBS (Figura 3.53) și reducerea perioadei de imobilitate (p = 0.031992), în comparație cu grupul IBS expus la stres (Figura 3.54).

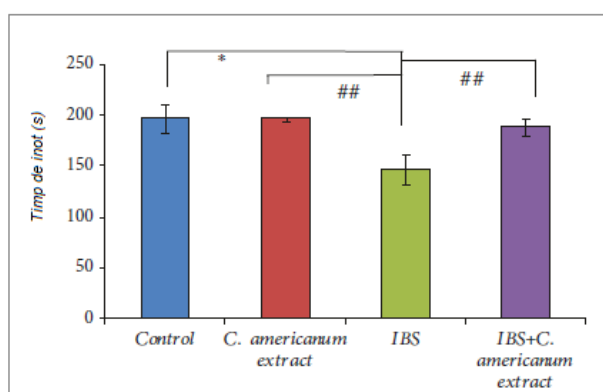


Figura 3.53. Efectul tratamentului cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum* asupra comportamentului depresiv într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șobolani, în testul înotului forțat, exprimat ca timp petrecut înotând. Valorile sunt exprimate ca medii  $\pm$  S E M (n = 6 per grup, \*p = 0.01 pentru grupul IBS vs. grupul de control; ##p < 0.01 pentru grupul tratat cu extract, respectiv cel cu IBS și tratat ulterior cu extract de *Chrysanthellum americanum* vs. grupul cu IBS).

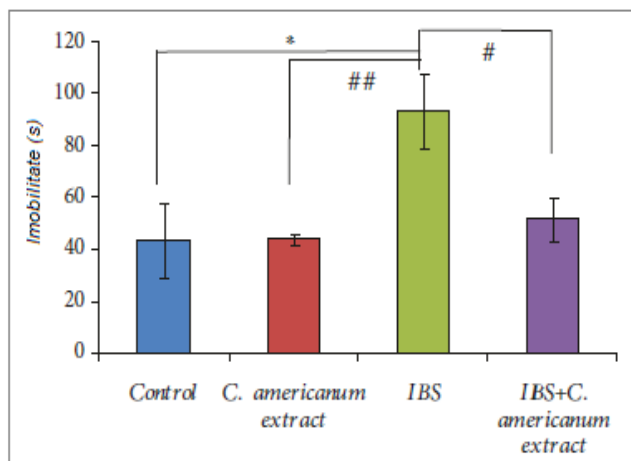


Figura 3.54. Efectul tratamentului cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum* asupra comportamentului depresiv într-un model animal de sindrom de colon iritabil la șobolani, în testul înotului forțat, exprimat ca perioadă de imobilitate. Valorile sunt exprimate ca medii  $\pm$  S E M (n = 6 per grup, \* $p$  = 0.01 pentru grupul cu IBS comparativ cu grupul de control, # $p$   $\leq$  0.05 pentru grupul IBS comparativ cu grupul IBS tratat cu extract de *Chrysanthellum americanum*; ## $p$  < 0.01 pentru grupul tratat cu extract

de *Chrysanthellum americanum* vs. grupul cu IBS).

### 3.1.3.2. Evaluarea biochimică a biomarkerilor de stres oxidativ

După finalizarea protocolului de expunere la stres, activitatea enzimei GPx, măsurată la nivelul lobilor temporali, a înregistrat o scădere semnificativă în grupul IBS comparativ cu grupul de control (F 1, 11 = 12.93,  $p$  = 0.0042).

În mod similar, a fost observată o diferență semnificativă între grupul tratat cu extract și grupul IBS (F 1, 11 = 15.69,  $p$  = 0.0022). Nu au fost observate diferențe semnificative din punct de vedere statistic între grupul IBS și grupul IBS tratat cu extract; în orice caz, activitatea enzimei în grupul din urmă nu s-a deosebit semnificativ de activitatea evaluată în grupul neexpus la stres, ceea ce sugerează o îmbunătățire a activității antioxidantului utilizat (Figura 3.55).

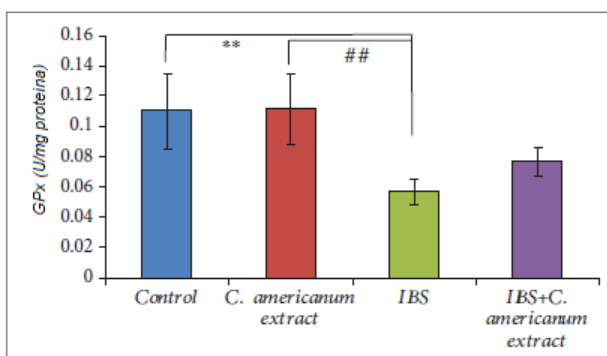


Figura 3.55. Efectul tratamentului cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum*, după expunerea la stres, asupra activității GPx în lobul temporal. Valorile sunt exprimate ca medii  $\pm$  S E M (n = 6 pentru fiecare grup; per total  $p$  = 0.001; \*\* $p$  < 0.01 pentru grupul IBS vs. grupul de control; ## $p$  < 0.01 pentru grupul tratat cu extract de *Chrysanthellum americanum* vs. grupul IBS).

Activitatea enzimei SOD la nivelul țesutului cerebral a înregistrat diferențe generale semnificative între grupurile create în modelul experimental cercetat (F 3, 25 = 6.83,  $p$  = 0.0016). Similar activității GPx, s-a înregistrat o scădere semnificativă a activității SOD în grupul IBS, comparativ atât cu grupul de control (F 1, 11 = 8.73,  $p$  = 0.013) cât și cu grupul care a primit doar extract polifenolic de *Chrysanthellum americanum* (F 1, 14 = 20.46,  $p$  = 0.00047) (Figura 3.56).

Totodată, activitatea enzimei SOD a scăzut semnificativ din punct de vedere statistic în grupul expus la stres și tratat cu extract comparativ cu grupul de control pe de o parte (F 1, 11 = 5.34,  $p$  = 0.04), dar și comparativ cu grupul care a primit doar extract polifenolic (F 1, 13 = 10.44,  $p$  = 0.006) (Figura 3.56).



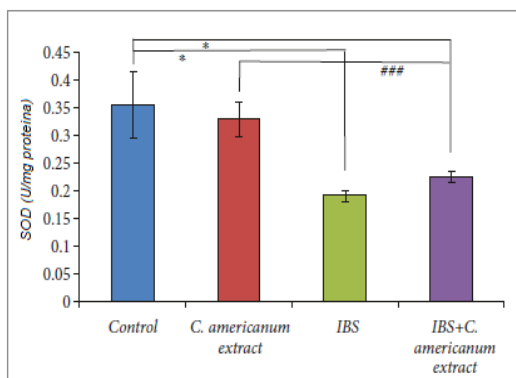


Figura 3.56. Efectul tratamentului cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum*, după expunerea la stres, asupra activității SOD în lobul temporal. Valorile sunt exprimate ca medii  $\pm$  S E M (n = 6 pentru fiecare grup; per total p = 0.001; \*p < 0.05 pentru grupul IBS și grupul IBS tratat ulterior cu extract vs. grupul de control; ###p < 0.01 pentru grupul tratat cu extract de *Chrysanthellum americanum* vs. grupul IBS, respectiv grupul IBS și tratat ulterior cu *Chrysanthellum americanum*).

Evaluarea unuia dintre cei mai importanți biomarkeri ai peroxidării lipidice, MDA, a scos în evidență o creștere distinctă și semnificativă din punct de vedere statistic a nivelurilor acestuia în grupul expus la stres (IBS) comparativ cu celelalte grupuri, astfel: p = 0.003 vs. grupul de control, p=0.011 vs. grupul tratat cu extract și p=0.014 vs. grupul tratat expus la stres și tratat cu extract (Figura 3.57).

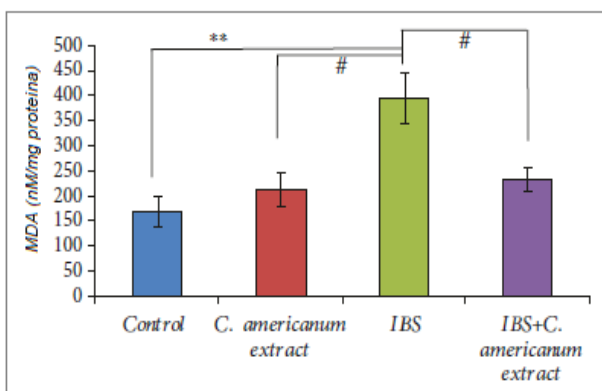


Figura 3.57. Efectul tratamentului cu extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum*, după expunerea la stres, asupra nivelului de MDA în lobul temporal. Valorile sunt exprimate ca medii  $\pm$  S E M (n = 6 pentru fiecare grup; per total p = 0.001; \*\*p < 0.01 pentru grupul IBS expus la stres vs. grupul de control; #p < 0.05 pentru grupul tratat cu extract de *Chrysanthellum americanum*, respectiv cel cu IBS și tratat ulterior cu extract vs. grupul IBS).

## 3.2. Rezultate obținute prin studiul pacienților umani

### 3.2.1. Evaluarea scalei vizuale analogice pentru sindromul de colon iritabil (VAS-IBS)

Scorurile scalei vizuale analogice pentru sindromul de colon iritabil administrate participanților au fost semnificativ mai mari în grupul de pacienți cu IBS, în comparație cu grupul de control de vârstă apropiată și același sex. Rezultatele VAS-IBS pentru fiecare dintre itemi sunt prezentate în Tabelul 3.2. În acest fel, intensitatea simptomelor fizice, cum ar fi durerea abdominală (p < 0.001), diaree (p = 0.021), constipația (p < 0.001) sau balonare/gaze (p < 0.001) au crescut semnificativ lapacienții cu IBS.

Tabelul 3.2.Descrierea demografică și fiziopatologică a grupelor de studiu

	Control (n = 14)	Grupuri de studiu			Valoarea *p
		Total n = 10	IBS (n = 10) IBS – C n = 7	IBS – D n = 3	
Criteriile ROMA IV	-				
Vârsta (media ± SEM, ani)	39,43 ± 4,801 <sup>†</sup>	42,60 ± 6,46 <sup>†</sup>	37,57 ± 8,04	54,33 ± 8,68	<i>p</i> = 0.706
Raport sex (F / M%)	50% M/ 50% F	50% M/ 50% F	57,15% M/ 42,85% F	33,3% M/ 66,6% F	
Pittsburg Sleep Quality Index (PSQI)	1,786 ± 0,28	6,5 ± 1,118 <sup>†</sup>	6,42 ± 1,601	6,66 ± 0,881	<i>p</i> < 0.001
Scala VAS-IBS					
Intensitatea durerii abdominale	1,428 ± 0,17	4,1 ± 0,65*	3,429 ± 0,68	5,67 ± 1,2	<i>p</i> < 0.001
Diaree	1*	2,9 ± 0,91*	1,143 ± 0,142	7 ± 0,57	<i>p</i> = 0.021
Constipație	1,5 ± 0,35*	6,4 ± 0,93*	7,857 ± 0,34	3 ± 1,99	<i>p</i> < 0.001
Balonare/ gaze	1,28 ± 0,12*	4 ± 0,76*	3,143 ± 0,50	6 ± 1,99	<i>p</i> < 0.001
Greață/ stare de vomă	1*	1,8 ± 0,46*	1,714 ± 0,56	2 ± 0,99	<i>p</i> = 0.053
Percepția psihologică a stării de bine (status emoțional)	8,64 ± 0,57*	4,3 ± 0,7*	4,429 ± 0,84	4 ± 1,52	<i>p</i> < 0.001
Influența problemelor gastrointestinale asupra vieții de zi cu zi (calitatea vieții)	1,07 ± 0,07*	4,20 ± 0,48*	3,714 ± 0,60	5,333 ± 0,33	<i>p</i> < 0.001

\*†.Analiza de covarianță

În timp ce am analizat rezultatele scorurilor itemilor VAS-IBS prin stratificare la subtipul IBS, am observat că frecvența și intensitatea durerii abdominale au fost semnificativ mai mari la pacienții cu subtipul IBS-D în comparație cu pacienții cu subtipul IBS-C ( $p < 0.05$ ) și martorii sănătoși potriviți din privința vârstei și sexului ( $p < 0.001$ ). În plus, simptomele de balonare și eliminarea gazelor au fost semnificativ mai intense la pacienții cu subtipul IBS-D ( $p < 0.01$ ).

Nu au fost observate diferențe semnificative în ceea ce privește starea emoțională (elementul 4) și calitatea vieții (elementul 5) între subtipurile IBS (Figura 3.59), în comparație cu martorii sănătoși potriviți în funcție de vârstă și sex ( $p < 0.00$ ).

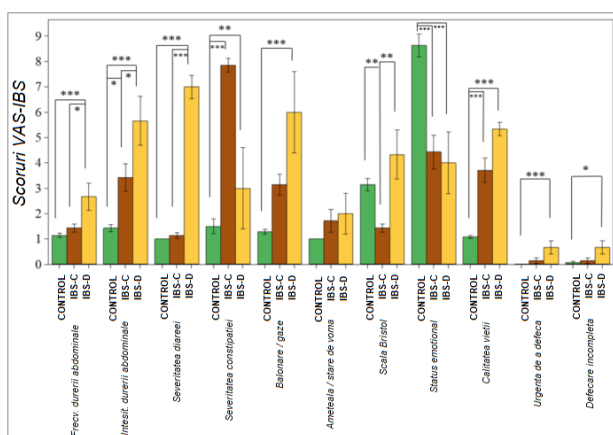


Figura 3.59. Scorurile parametrilor scalei VAS – IBS la pacienții cu IBS, stratificate după subtipul IBS. Rezultatele sunt exprimate ca scoruri medii ale scalei VAS (care variază de la 1 la 10, în corelație directă cu severitate) ± SEM (n = 14 pentru control, 10 pentru IBS, 7 pentru IBS-C și 3 pentru IBS-D, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

Comparând rezultatele scorurilor parametrilor scalei VAS-IBS în funcție de sexul participanților și diagnostic, am observat că nu există diferențe semnificative între scorurile itemilor VAS-IBS la bărbații și femeile din grupul de control, în timp ce femeile cu IBS au experimentat mai frecvent greață și vărsături (p = 0.065), diaree (p = 0.055) și senzație incompletă de defecare (p = 0.05) (Figura 3.60). Nu au fost observate diferențe semnificative în ceea ce privește starea emoțională (punctul 4) și calitatea vieții (punctul 5) între bărbați și femei.

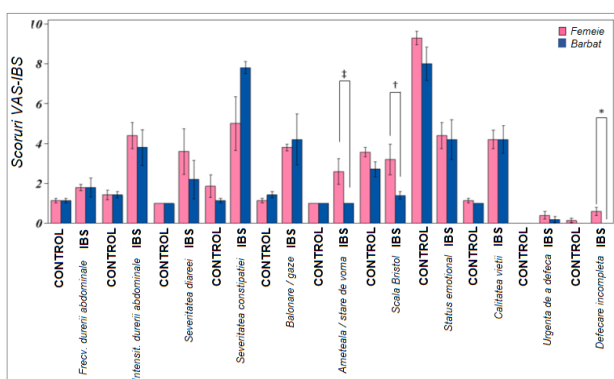


Figura 3.60. Scorurile parametrilor scalei VAS – IBS la pacienții cu IBS și voluntari sănătoși, potrivite în funcție de vârstă și sex, stratificat după sex. Rezultatele sunt exprimate ca scor mediu al scalei VAS (care variază de la 1 la 10, în corelație directă cu severitatea) ± SEM (n = 14 pentru control, 10 pentru IBS, 7 pentru IBS-C, și 3 pentru IBS-D, \*p < 0.05, †p = 0.055, ‡p = 0.065).

Diferențele dintre grupurile comparate pentru parametrii cu valori numerice și cei cu valori logice indică faptul că, deși afectarea este evidentă, aceasta nu este percepută într-o manieră drastică. Cu toate acestea, aceste diferențe se pot observa mai bine prin compararea rezultatelor obținute pentru subtipurile de IBS (Figura 3.61).

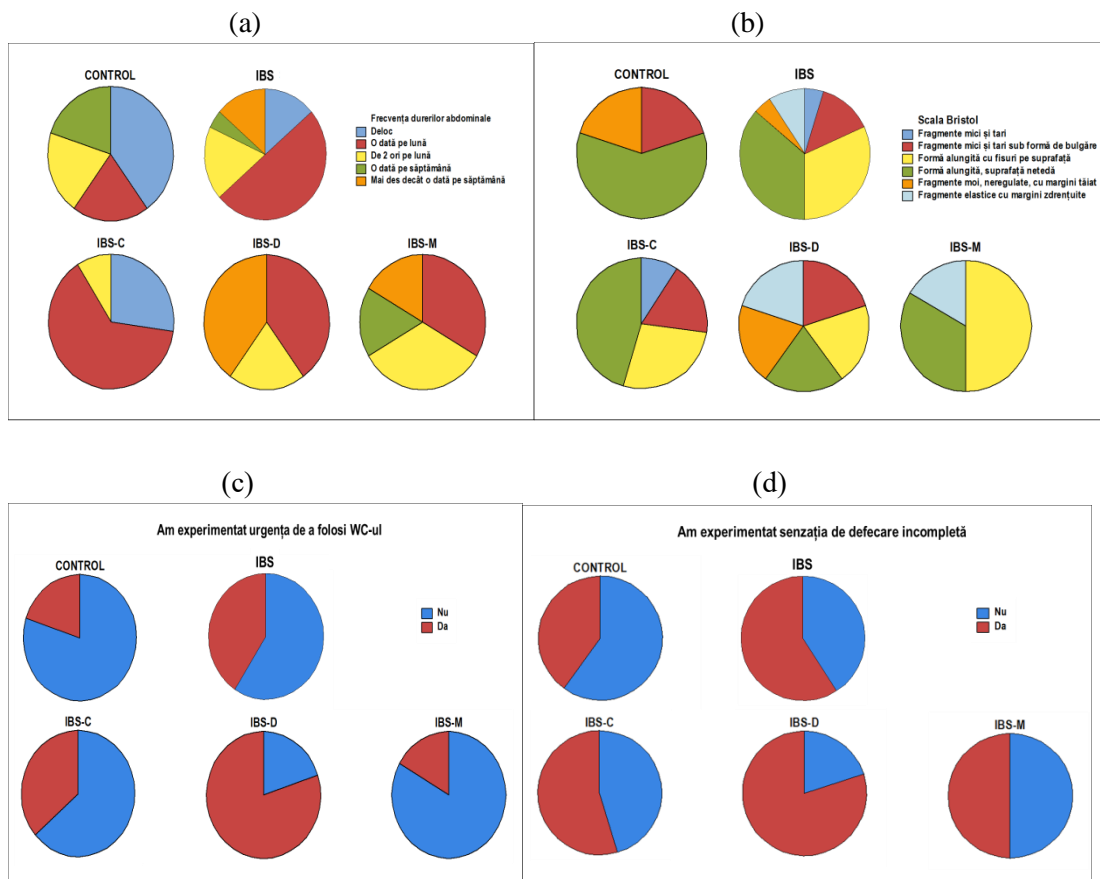


Figura 3.61. Variația parametrilor evaluați prin itemii cu valori logice ai scalei VAS-IBS și stratificarea rezultatelor în funcție de tipul de IBS: (a) frecvența durerilor abdominale; (b) scala Bristol; (c) urgența de a defeca; (d) senzația de defecare incompletă.

### 3.2.2. Rezultatele evaluării tulburărilor de somn

În ceea ce privește chestionarul Pittsburgh de evaluare a calității somnului (PSQI), nu au fost observate diferențe semnificative legate de vârsta și sexul participanților. Evaluarea PSQI între 0 și 5 sugerează o calitate normală a somnului, în timp ce un indice mai mare de 5, cu siguranță caracterizează un adormit slab. În studiul nostru, am obținut un indice de calitate medie normală a somnului pentru grupul de control și PSQI crescut pentru grupul IBS, care este semnificativ diferit de primul grup ( $p < 0.001$ ) (Tabelul 3.2).

Stratificarea subtipului IBS a rezultatelor a relevat un indice al PSQI semnificativ crescut în ambele subgrupuri IBS-C și IBS-D, în comparație cu grupul de control ( $p < 0.001$ ). Cu toate acestea, nu s-a observat o diferență semnificativă între indicii PSQ atunci când s-a comparat IBS-C cu IBS-D (Figura 3.62). Stratificarea combinată a grupurilor în ceea ce privește sexul și subtipul IBS a evidențiat diferențe semnificative între bărbați și femei în funcție de subtipul IBS (Figura 3.63).

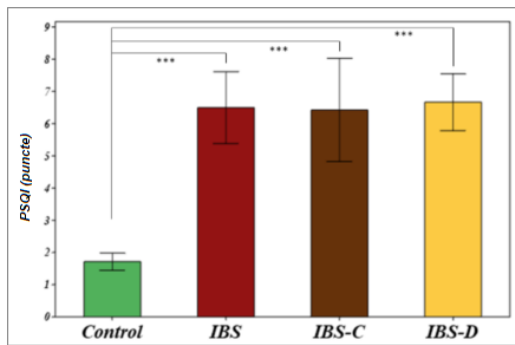


Figura 3.62. Indicele calității somnului evaluat cu ajutorul chestionarului Pittsburg (PSQI) la pacienții cu IBS, în comparație cu voluntarii de sănătoși și de același sex. Rezultatele sunt exprimate ca scor mediu al PSQI  $\pm$  SEM ( $n = 14$  pentru Control, 10 pentru IBS, \*\*\* $p < 0.001$ ).

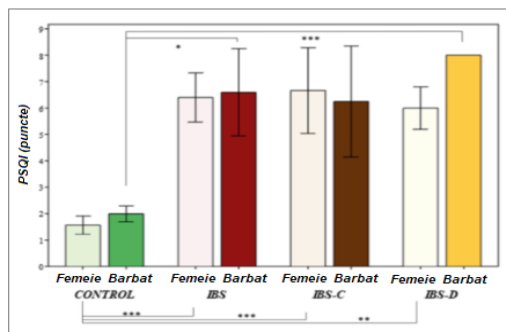


Figura 3.63. Indicele calității somnului evaluat cu ajutorul chestionarului Pittsburg (PSQI) la pacienții cu IBS, stratificat în funcție de sexul pacienților și subtipurile IBS. Rezultatele sunt exprimate ca medii  $\pm$  SEM ( $n = 14$  pentru control, 10 pentru IBS, 7 pentru IBS-C și 3 pentru IBS-D, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Având în vedere analiza itemilor privind obiceiurile de culcare (punctele 1-4), am observat că pacienții cu IBS se trezesc considerabil mai devreme, în comparație cu grupul de control ( $p = 0,022$ ) și, de asemenea, petrec mai mult timp încercând să adoarmă ( $p = 0.026$ ). Deși nu există diferențe semnificative cu privire la ora de culcare, pacienții IBS au declarat ca dorm, în medie, mult mai puțin timp comparativ cu persoanele din grupul de control, potrivite din privința vârstei și sexului ( $p = 0.02$ ).

### 3.2.3. Rezultatele obținute în urma analizelor biochimice din lacrimi

Analizele biochimice ale probelor de lacrimi nu au arătat diferențe semnificative între cei doi ochi ai participanților. De asemenea, nu s-au obținut diferențe semnificative din punct de vedere statistic între probele de lacrimi recoltate de la femei și bărbați.

În ceea ce privește diferențele care apar între cele două grupuri primare, am observat că în grupul IBS, activitatea enzimei SOD a pacienților [ $F(1, 46) = 5.84, p = 0.020$ ], nivelurile MDA ( $F(1, 46) = 7.85, p = 0.007$ ), și nivelurile de proteine totale solubile ( $F(1, 46) = 5.94, p = 0.019$ ) au înregistrat creșteri semnificative din punct de vedere statistic comparativ cu participanții la studiu sănătoși de același sex și vârstă (Figura 3.64). Nu au existat diferențe semnificative pentru activitatea GPx prin compararea grupului de pacienți cu IBS cu grupul de control ( $F(1, 46) = 0.36, p = 0.55$ ).

Analiza rezultatelor după stratificarea în funcție de subtipul IBS, nu a indicat nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic în nivelurile markerilor de stres oxidativ între probele pacienților cu IBS-C și IBS-D. Analiza rezultatelor după stratificarea în funcție de sexul și grupul participanților a arătat câteva diferențe care pot fi observate în figura 3.65.

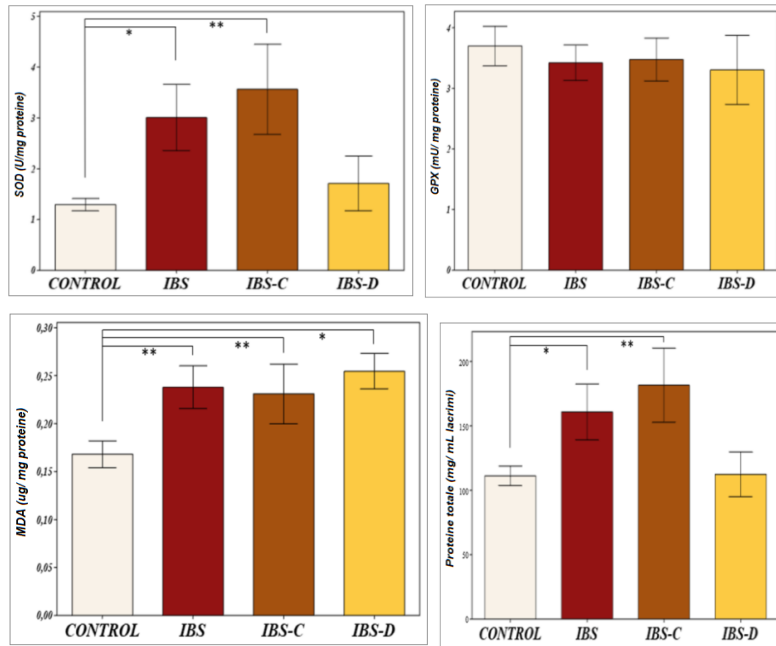


Figura 3.64. Markerii stresului oxidativ măsurați din lacrimi la pacienții cu IBS (IBS = toți pacienții; IBS-C, IBS-D = grupurile de pacienți cu IBS stratificat după subtipul acestuia) și controale sănătoase de aceeași vârstă și sex: a. Activitatea superoxid dismutazei (U/mg proteine); b. Activitatea glutation peroxidazei (U/mg proteine); c. Concentrația de malondialdehidă ( $\mu\text{g}$  MDA/mg proteine); d. Proteine totale solubile (mg/ml lacrimi). Rezultatele sunt exprimate ca medii  $\pm$  SEM (n = 14 pentru Control, 10 pentru IBS, 7 pentru IBS-C și 3 pentru IBS-D, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

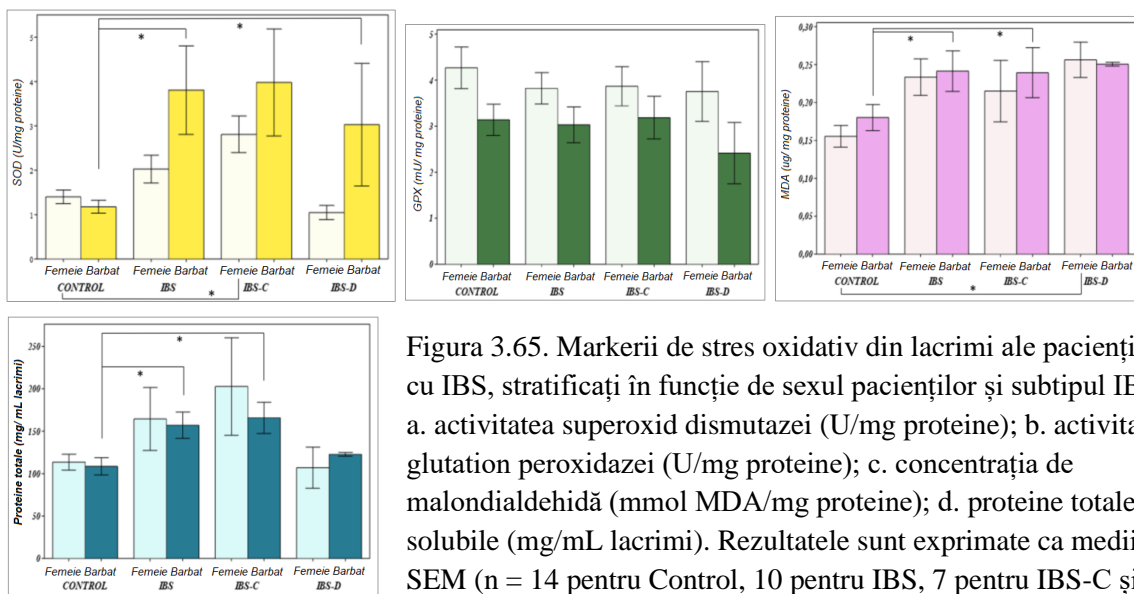


Figura 3.65. Markerii de stres oxidativ din lacrimi ale pacienților cu IBS, stratificați în funcție de sexul pacienților și subtipul IBS: a. activitatea superoxid dismutazei (U/mg proteine); b. activitatea glutation peroxidazei (U/mg proteine); c. concentrația de malondialdehidă (mmol MDA/mg proteine); d. proteine totale solubile (mg/mL lacrimi). Rezultatele sunt exprimate ca medii  $\pm$  SEM (n = 14 pentru Control, 10 pentru IBS, 7 pentru IBS-C și 3 pentru IBS-D, \* p < 0.05).

### 3.2.5. Rezultate obținute în urma analizelor biochimice și imunologice din ser, urină și materii fecale

Analiza biochimică și imunologică a markerilor relevanți obținuți din ser sanguin, urină și materii fecale, în studiul sindromului de colon iritabil, a evidențiat variații dependente de produsul biologic și de grupul studiat.

În ser, au fost observate diferențe semnificative în cazul activității enzimatică a GPx ( $p < 0.001$ , prin comparația IBS versus Control și IBS-D, IBS-C, IBS-M versus Control), dar și în cazul activității enzimatică a xantinoxidazei ( $p < 0.05$ , prin comparație IBS-D, IBS-C, IBS-M versus Control). Totodată, variații semnificative din punct de vedere statistic s-au înregistrat și în cazul concentrației de MDA ( $p < 0,05$ , prin comparația IBS-D, IBS-C, IBS-M versus Control).

În urină, diferențe semnificative au fost observate pentru activitatea enzimatică a GPx ( $p < 0,05$ , prin comparația IBS versus Control), dar și pentru concentrația de echivalenți ai oxidului nitric ( $\mu\text{M}$  nitrat) ( $p < 0,05$ , prin comparația IBS versus Control). Diferențe statistic semnificative au fost observate și la analiza biochimică a fecalelor pentru SOD ( $p < 0.01$ , prin comparația IBS-D, IBS-C, IBS-M versus Control), MDA ( $p < 0.01$ , prin comparația IBS-D, IBS-C, IBS-M versus Control) și oxid nitric ( $p < 0,05$ , prin comparația IBS-D, IBS-C, IBS-M versus Control) (Figura 3.66).

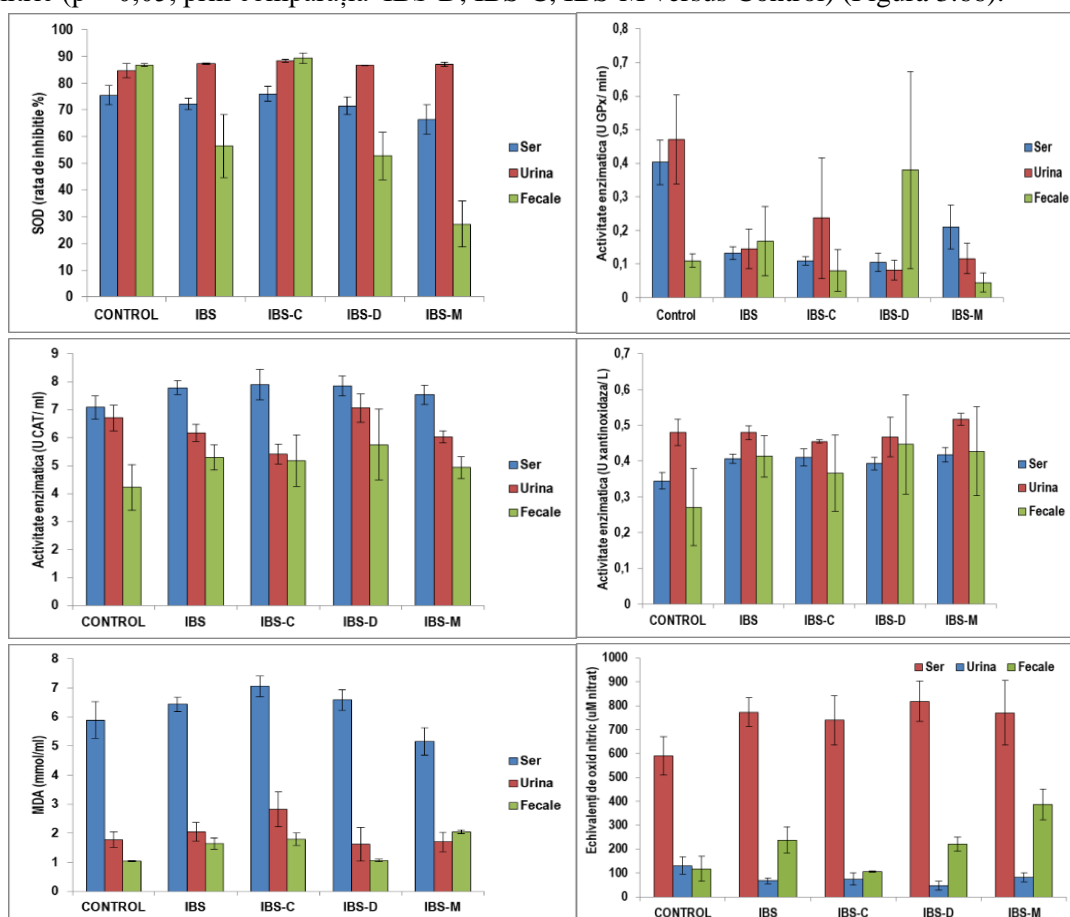


Figura 3.66. Variația parametrilor biochimici prin stratificarea rezultatelor în funcție de subtipul de IBS, ser, urină și materii fecale: a. activitatea SOD, b. activitatea GPx, c. activitatea catalazei, d. activitatea xantinoxidazei, e. concentrația de MDA, f. echivalenți de oxid nitric. Rezultatele sunt exprimate ca medii ± SEM (n = 15 pentru Control, 15 pentru IBS-M, 15 pentru IBS-C și 15 pentru IBS-D)

În mod similar, analiza parametrilor inflamatori și neuroendocrini arată diferențe semnificative în funcție de materialul biologic utilizat și grupul de studiu: din ser pentru IL6 ( $p < 0.05$ , prin comparația IBS versus Control și IBS-D versus IBS-C versus IBS-M) și IL8 ( $p < 0.001$ , prin comparația IBS versus Control și IBS-D, IBS-C, IBS-M versus Control și comparând subtipurile între ele), iar din urină pentru serotonină ( $p < 0.001$ , prin comparația IBS-D, IBS-C, IBS-M versus Control și comparând subtipurile între ele) (Figura 3.67).

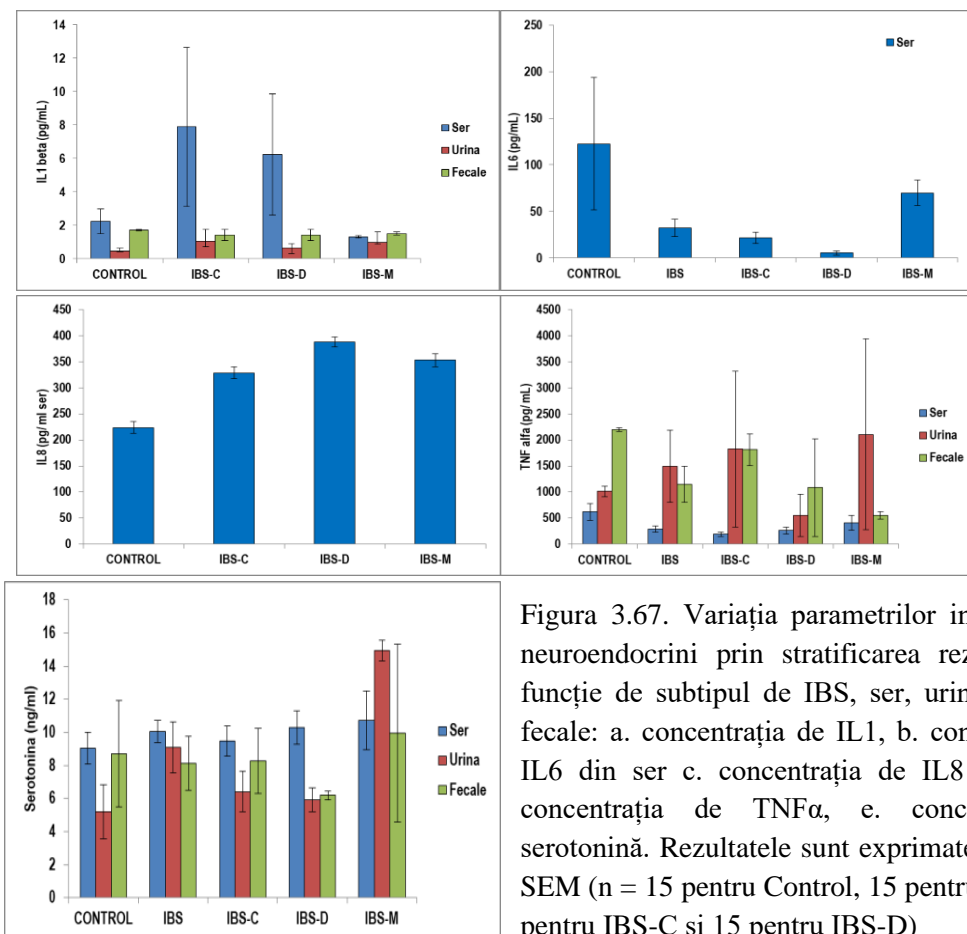


Figura 3.67. Variația parametrilor inflamatori și neuroendocrini prin stratificarea rezultatelor în funcție de subtipul de IBS, ser, urină și materii fecale: a. concentrația de IL1, b. concentrația de IL6 din ser c. concentrația de IL8 din ser, d. concentrația de TNF $\alpha$ , e. concentrația de serotonină. Rezultatele sunt exprimate ca medii  $\pm$  SEM ( $n = 15$  pentru Control, 15 pentru IBS-M, 15 pentru Control, 15 pentru IBS-C și 15 pentru IBS-D)

Evaluarea datelor în funcție de sexul participanților la studiu, în contextul subtipurilor sindromului de colon iritabil, nu a relevat variații semnificative din punct de vedere statistic pentru parametrii biochimici (Figura 3.68). În schimb, s-au înregistrat unele creșteri evidente ale nivelurilor de IL1 în grupul IBS-C, serotonină în grupul IBS-M, respectiv TNF $\alpha$  în grupul IBS-M la bărbați comparativ cu femeile din același grup (Figura 3.69).



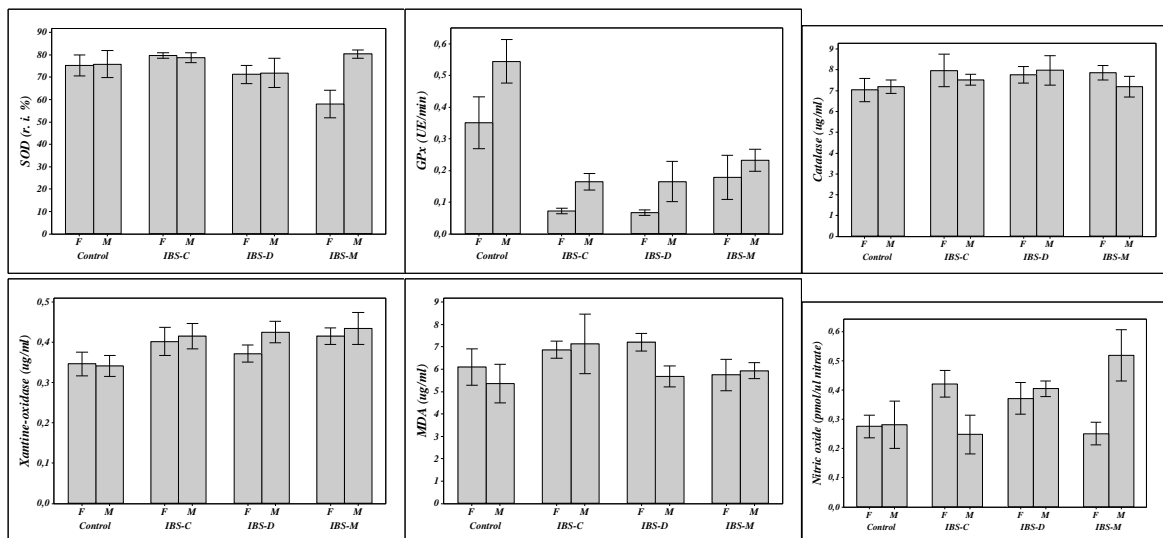


Figura 3.68. Variația parametrilor biochimici serici prin stratificarea rezultatelor în funcție de subtipul de IBS și sex: a. activitatea SOD, b. activitatea GPx, c. activitatea catalazei, d. activitatea xantinoxidazei, e. concentrația de MDA, f. echivalenți de oxid nitric. Rezultatele sunt exprimate ca medii  $\pm$  SEM (n = 15 pentru Control, 15 pentru IBS-M, 15 pentru IBS-C și 15 pentru IBS-D)

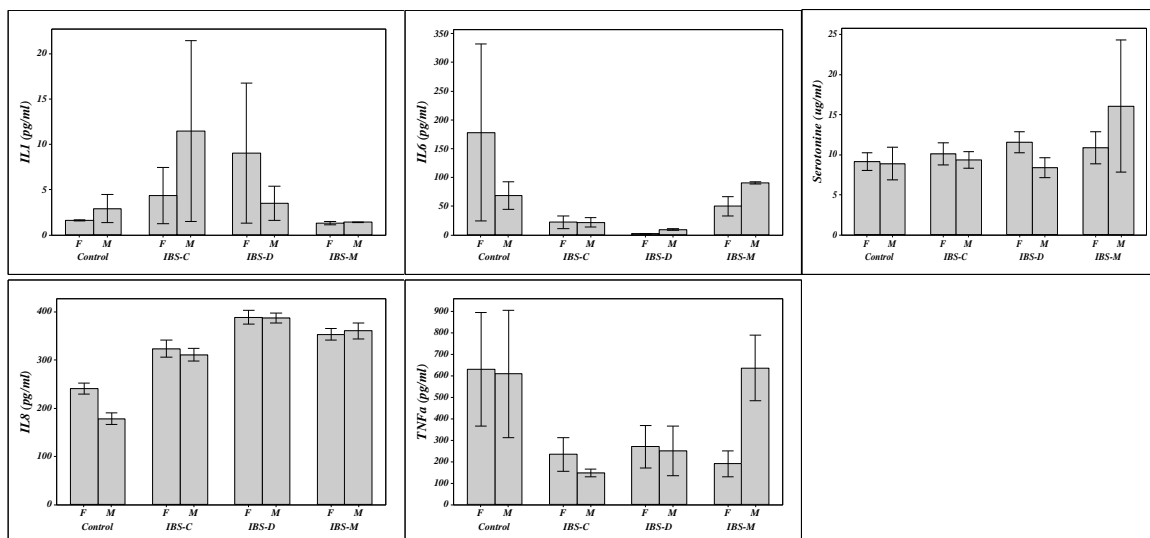


Figura 3.69. Variația parametrilor inflamatori și neuroendocrini serici prin stratificarea rezultatelor în funcție de subtipul de IBS și sex: a. concentrația de IL1, b. concentrația de IL6 din ser c. concentrația de IL8 din ser, d. concentrația de TNF $\alpha$ , e. concentrația de serotonină. Rezultatele sunt exprimate ca medii  $\pm$  SEM (n = 15 pentru Control, 15 pentru IBS-M, 15 pentru IBS-C și 15 pentru IBS-D)

## CONCLUZII GENERALE

În urma desfășurării experimentelor care fac obiectul acestei teze, concluziile deductibile în acest punct al cercetării sunt următoarele:

1. Sindromul de colon este o afecțiune gastrointestinală din ce în ce mai frecvent întâlnită în practica clinică cu o etiopatogeneză insuficient cunoscută și înțeleasă, cel mai probabil multifactorială, având o serie de mecanisme interconectate care sunt în strânsă legătură cu declanșarea acestui sindrom.

2. Caracterul multifactorial scoate în evidență necesitatea evaluării acestui sindrom din perspective diferite, atât printr-o abordare a manifestărilor comportamentale cât și a biomarkerilor biochimici și imunologici.

3. Studiul, urmând trei direcții distincte, aduce dovezi cu privire la legătura dintre sindromul de colon iritabil, deficiențe de natură cognitivă și din sfera psiho-emoțională și variațiile statusului oxidativ, atât la modele experimentale animale cât și la pacienți umani.

4. Experimentul care vizează modelul animal de sindrom de colon iritabil prin expunerea șoarecilor la stres multifactorial aduce dovezi suplimentare cu privire la efectul expunerii la stres asupra tractului gastro-intestinal și starea neurologică. Combinația dintre expunerea la stresul de separare maternă neonatală și stresul cronic, întâlnit în viața adultă, poate duce la comportamente depresive și de anxietate, însoțite de modificări ale tranzitului intestinal.

5. Expunerea la factori variați de stres ar putea da naștere unui răspuns central cu un efect imediat, comparativ cu cel provocat de stresul de la începutul vieții, dar, în general, combinația celor două tipuri de factori de stres a indicat cu mai multă precizie simptome viscerale și specifice sindromului de colon iritabil, pledând pentru necesitatea unui model IBS la șoareci cu o precizie mai ridicată.

6. Studiul privind efectele terapeutice ale extractelor metanolice și etanolice din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina a indicat o direcție benefică asupra aspectelor comportamentale și a statusului oxidativ la nivel cerebral și colonic la șoareci, într-un model de sindrom de colon iritabil bazat pe expunerea la stres.

7. În ciuda micilor diferențe de compoziție chimică a extractelor metanolice și etanolice, rezultatele obținute au sugerat faptul că extractele obținute din semințele plantei *Camelina sativa* var. Mădălina ar putea inversa tulburările de memorie pe termen scurt cauzate de expunerea la stres. Totodată, ar putea scădea intensitatea și frecvența stărilor de anxietate și comportamentele asemănătoare depresiei observate în modele animale expuse la stres ale sindromului de colon iritabil.

8. Extractele obținute din semințe de *Camelina sativa* var. Mădălina au prezentat un efect semnificativ asupra markerilor de stres oxidativ din creier și țesuturile intestinale la șoarecii expuși paradigmei stresului multifactorial, prin scăderea activității superoxid dismutazei și creșterea

activității glutation peroxidazei. Cu toate acestea, rezultatele sugerează că extractele ar putea crește și peroxidarea lipidelor în țesuturile intestinale.

9. În urma evaluării microscopice ale materiilor fecale, cele mai constante elemente identificate sunt reprezentate de levuri (frecvente în grupul de control), în toate grupurile evaluate (prezente sau rare). Hematiile au avut o frecvență redusă, la fel și celulele inflamatorii (limfocite) (rare și foarte rare). De asemenea, flora polimorfă s-a întâlnit în majoritatea frotiurilor evaluate. Așadar, s-au putut identifica ușoare variații ale elementelor observate, însă ne semnificative.

10. Acest studiu oferă dovezi suplimentare că administrarea extractelor alcoolice din semințele de *Camelina sativa* var. Mădălina ar putea îmbunătăți performanțele cognitive și starea de spirit, prezentând capacitate antioxidantă în atât creier cât și țesuturile intestinale.

11. Studiul care are la bază extractul polifenolic de *Chrysanthellum americanum* utilizat într-un model animal indus de stres al sindromului de colon iritabil, a indicat influența acestuia, de asemenea, asupra statusului oxidativ pe de o parte, și ușoara îmbunătățire a memoriei alături de o scădere semnificativă a stării de anxietate și a comportamentului asemănător depresiei.

12. Evaluările markerilor de stres oxidativ au indicat o scădere semnificativă a activității superoxid dismutazei și glutation peroxidazei din lobii temporali la șobolanii implicați în modelul animal de sindrom de colon iritabil obținut prin expunere la stres. Administrarea pe termen scurt a extractului polifenolic a atenuat semnificativ nivelurile crescute ale malondialdehidei și activității specifice a glutation peroxidazei. De asemenea, s-au stabilit corelații Pearson semnificative între biomarkerii stresului oxidativ și indicatorii comportamentali.

13. Administrarea extractului polifenolic de *Chrysanthellum americanum* poate atenua dispoziția și tulburările cognitive legate de sindromul de colon iritabil indus de stres, prin atenuarea stresului oxidativ la nivel cerebral.

14. Forma finală a scalei românești VAS-IBS poate fi considerată un instrument de încredere în măsurarea severității percepute a simptomelor gastrointestinale, care pot fi clasificate de ROME IV ca simptome ale sindromului de colon iritabil.

15. Studiul care a implicat pacienții umani a oferit dovezi suplimentare ale implicației stresului oxidativ în patologia sindromului de colon iritabil. Așadar am identificat modificări semnificative ale activității superoxid dismutazei, malondialdehidei din mostrele de lacrimi ale pacienților cu IBS, în comparație cu voluntarii sănătoși participanți la studiu. Cu toate acestea, nu au fost observate diferențe semnificative pentru activitatea glutation peroxidazei.

16. Statusul oxidativ modificat în probele de lacrimi nu a fost corelat cu tulburările de somn care apar la pacienții cu IBS, cu excepția tulburărilor de somn care apar din cauza evenimentelor dureroase, dar a fost corelat într-o manieră semnificativă cu simptomatologia gastrointestinală.

17. Evaluarea calității somnului utilizând chestionarul Pittsburgh (PSQI) nu a relevat diferențe semnificative în ceea ce privește vârsta și sexul participanților, obținând un indice de calitate medie

normală a somnului pentru voluntarii sănătoși și un indice crescut, semnificativ din punct de vedere statistic, pentru grupul IBS. De asemenea, deși a existat o diferență semnificativă între subgrupurile IBS-C și IBS-D comparativ cu grupul de control, nu s-a observat o diferență între indicii PSQI când cele două subgrupuri IBS au fost comparate.

18. Pacienții cu IBS se trezesc mult mai devreme decât voluntarii sănătoși și petrec mai mult timp încercând să adoarmă, dormind, în medie, mai puțin decât participanții din grupul de control. Identificarea tulburărilor de somn la pacienții cu IBS prin evaluarea chestionarelor PSQI, aduce dovezi suplimentare legate de relația cauzală dintre tulburările apărute și simptomatologia IBS.

19. Există diferențe semnificative între bărbați și femei în ceea ce privește dinamica markerilor stresului oxidativ, în sensul că femeile, deși mai predispuse să dezvolte simptome mai agresive ale sindromului, înregistrează îmbunătățiri ale statusului oxidativ datorate unei apărări antioxidante mai bună.

*Contribuții personale:* desfășurarea majorității experimentelor privind comportamentul animalelor, realizarea determinărilor biochimice și imunologice din produsele biologice (ser, lacrimi, urină, materii fecale) obținute de la pacienți și voluntari sănătoși cât și cele obținute de la animale de experiență, realizarea și evaluarea frotiurilor obținute din materiile fecale ale animalelor de experiență (coprocitograme), realizarea chestionarelor PSQI și a scalei VAS-IBS, realizare și interpretare statistică a datelor obținute (participare parțială).

*Limitările studiului:*

În ceea ce privește limitările studiilor noastre, trebuie să menționăm faptul că modelul animal folosit are la bază un model animal validat în prealabil, protocoale anterioare, pe care le-am adaptat pentru a obține efectul pe care stresul îl provoacă.

O altă limitare a studiului este dată de numărul mic de animale testate și absența tratamentelor cu medicamente pentru un lot de control pozitiv. Fiind vorba de modele animale, rezultatele trebuie tratate cu atenție și precauție, datorită faptului că acestea nu reproduc decât unele aspecte ale patologiei, astfel că se impune evaluarea lor ca fiind primii pași de observare a fenomenelor caracteristice sindromului de colon iritabil în contextul unei vaste patologii psihiatrice.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Asadi-Shahmirzadi, A. *et al.* (2012) 'Benefit of Aloe vera and Matricaria recutita mixture in rat irritable bowel syndrome: Combination of antioxidant and spasmolytic effects.', *Chinese journal of integrative medicine*. China. doi: 10.1007/s11655-012-1027-9.
- Balmus, I.-M. *et al.* (2020) 'Oxidative stress markers dynamics in keratoconus patients' tears before and after corneal collagen crosslinking procedure.', *Experimental eye research*. England, 190, p. 107897. doi: 10.1016/j.exer.2019.107897.
- Basnayake, C. (2018) 'Treatment of irritable bowel syndrome', *Australian prescriber*. 2018/10/01. NPS MedicineWise, 41(5), pp. 145–149. doi: 10.18773/austprescr.2018.044.
- Bengtsson, M. *et al.* (2011) 'Evaluation of gastrointestinal symptoms in different patient groups using the visual analogue scale for irritable bowel syndrome (VAS-IBS).', *BMC gastroenterology*, 11, p. 122. doi: 10.1186/1471-230X-11-122.
- Bengtsson, M. *et al.* (2013) 'Further validation of the visual analogue scale for irritable bowel syndrome after use in clinical practice.', *Gastroenterology nursing : the official journal of the Society of Gastroenterology Nurses and Associates*. United States, 36(3), pp. 188–198. doi: 10.1097/SGA.0b013e3182945881.
- Buccafusco, J. J. (ed.) (2009) *No Title*. Boca Raton (FL).
- Camilleri, M. and Boeckxstaens, G. (2017) 'Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS.', *Gut*. England, 66(5), pp. 966–974. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313425.
- Canavan, C., West, J. and Card, T. (2014) 'The epidemiology of irritable bowel syndrome.', *Clinical epidemiology*. New Zealand, 6, pp. 71–80. doi: 10.2147/CLEP.S40245.
- Chey, W. D. (2017) 'SYMPOSIUM REPORT: An Evidence-Based Approach to IBS and CIC: Applying New Advances to Daily Practice: A Review of an Adjunct Clinical Symposium of the American College of Gastroenterology Meeting October 16, 2016 \* Las Vegas, Nevada.', *Gastroenterology & hepatology*. United States, 13(2 Suppl 1), pp. 1–16.
- Choghakhori, R. *et al.* (2017) 'Inflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers in irritable bowel syndrome: Association with digestive symptoms and quality of life', *Cytokine*, 93. doi: 10.1016/j.cyto.2017.05.005.
- Clark, A. (1859) 'LONDON HOSPITAL.: CLINICAL ILLUSTRATIONS OF MUCOUS DISEASE OF THE COLON, FROM NOTES OF VARIOUS CASES', *The Lancet*.

Elsevier, 74(1894), pp. 614–615.

Da Costa, J. M. (1871) ‘ART. I.--Membranous Enteritis.’, *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*. American Periodicals Series II, (124), p. 321.

Cumming, W. (1849) ‘Electro-galvanism in a peculiar affliction of the mucous membrane of the bowels’, *London Med Gazette*, pp. 969–973.

Dolatabadi, F. *et al.* (2018) ‘The Protective Effect of *Melissa officinalis* L. in Visceral Hypersensitivity in Rat Using 2 Models of Acid-induced Colitis and Stress-induced Irritable Bowel Syndrome: A Possible Role of Nitric Oxide Pathway.’, *Journal of neurogastroenterology and motility*. Korea (South), 24(3), pp. 490–501. doi: 10.5056/jnm17035.

Drossman, D. A. (2016) ‘Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features and Rome IV.’, *Gastroenterology*. United States. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.032.

Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) ‘Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.’, *Nature*. England, 408(6809), pp. 239–247. doi: 10.1038/35041687.

Ford, Alexander C *et al.* (2014) ‘Effect of antidepressants and psychological therapies, including hypnotherapy, in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis.’, *The American journal of gastroenterology*. United States, 109(9), pp. 1350–65; quiz 1366. doi: 10.1038/ajg.2014.148.

Ford, Alexander C. *et al.* (2014) ‘Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis’, *The American journal of gastroenterology*. doi: 10.1038/ajg.2014.202.

Gilkin Jr, R. J. (2005) ‘The spectrum of irritable bowel syndrome: A clinical review’, *Clinical Therapeutics*. Elsevier, 27(11), pp. 1696–1709. doi: 10.1016/j.clinthera.2005.11.012.

Grenham, S. *et al.* (2011) ‘Brain-gut-microbe communication in health and disease.’, *Frontiers in physiology*. Switzerland, 2, p. 94. doi: 10.3389/fphys.2011.00094.

LEFTER, Radu, CIOBICA, Alin, TIMOFTE, Daniel, ABABEI, Daniela, DOBRIN Dobrin, LUCA, Andrei, TRIFAN, Anca, STANCIU, Carol, SFARTI, Catalin, R. (2018) ‘A new biological approach in generating an irritable bowel syndrome rat model -focusing on depression in sucrose splash test and body weight change’, *Romanian Biotechnological Letters*, 2018(208), pp. 1–6.

- Lembo, A. and Bollom, A. (2015) ‘Complementary and Alternative Medicine in Gastroenterology’, *Yamada’s Textbook of Gastroenterology*. (Wiley Online Books), pp. 2521–2532. doi: doi:10.1002/9781118512074.ch130.
- Li, S. *et al.* (2016) ‘Changes in Enteric Neurons of Small Intestine in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea’, *Journal of neurogastroenterology and motility*, 22(2), p. 310—320. doi: 10.5056/jnm15082.
- Longstreth, G. F. *et al.* (2006) ‘Functional bowel disorders.’, *Gastroenterology*. United States, 130(5), pp. 1480–1491. doi: 10.1053/j.gastro.2005.11.061.
- Lü, H. *et al.* (2009) ‘[The establishment of an animal model of gut-brain interaction in irritable bowel syndrome for the evaluation of visceral sensation, motility and psychological behavior.]’, *Zhonghua nei ke za zhi*. China, 48(12), pp. 1035–1039.
- Mayer, E. A. *et al.* (2015) ‘Towards a systems view of IBS.’, *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12(10), pp. 592–605. doi: 10.1038/nrgastro.2015.121.
- Mesika, R. and Reichmann, D. (2019) ‘When safeguarding goes wrong: Impact of oxidative stress on protein homeostasis in health and neurodegenerative disorders.’, *Advances in protein chemistry and structural biology*. Netherlands, 114, pp. 221–264. doi: 10.1016/bs.apcsb.2018.11.001.
- Mete, R. *et al.* (2013) ‘The role of oxidants and reactive nitrogen species in irritable bowel syndrome: a potential etiological explanation.’, *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. United States, 19, pp. 762–766. doi: 10.12659/MSM.889068.
- Mozaffari, S. *et al.* (2011) ‘Effects of Hypericum perforatum extract on rat irritable bowel syndrome.’, *Pharmacognosy magazine*. India, 7(27), pp. 213–223. doi: 10.4103/0973-1296.84235.
- Mujagic, Z. *et al.* (2016) ‘A novel biomarker panel for irritable bowel syndrome and the application in the general population’, *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 6, p. 26420. doi: 10.1038/srep26420.
- Pimentel, M. *et al.* (2011) ‘Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation.’, *The New England journal of medicine*. United States, 364(1), pp. 22–32. doi: 10.1056/NEJMoa1004409.
- Powell, R. (1818) ‘On certain painful afflictions of the intestinal canal’, *Med Trans Royal Coll Phys*, 6, pp. 106–117.

- Ruepert, L. *et al.* (2011) 'Bulking agents, antispasmodics and antidepressants for the treatment of irritable bowel syndrome.', *The Cochrane database of systematic reviews*. England, (8), p. CD003460. doi: 10.1002/14651858.CD003460.pub3.
- Schmulson, M. J. and Drossman, D. A. (2017) 'What Is New in Rome IV.', *Journal of neurogastroenterology and motility*. Korea (South), 23(2), pp. 151–163. doi: 10.5056/jnm16214.
- Schwartz, M. D., Repine, J. E. and Abraham, E. (1995) 'Xanthine oxidase-derived oxygen radicals increase lung cytokine expression in mice subjected to hemorrhagic shock.', *American journal of respiratory cell and molecular biology*. United States, 12(4), pp. 434–440. doi: 10.1165/ajrcmb.12.4.7695923.
- Spiller, R. *et al.* (2007) 'Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management.', *Gut*. England, 56(12), pp. 1770–1798. doi: 10.1136/gut.2007.119446.
- Stuchell, R. N. *et al.* (1984) 'The effect of collection technique on tear composition.', *Investigative ophthalmology & visual science*. United States, 25(3), pp. 374–377.
- Sullivan, A. and Nord, C. E. (2005) 'Probiotics and gastrointestinal diseases.', *Journal of internal medicine*. England, 257(1), pp. 78–92. doi: 10.1111/j.1365-2796.2004.01410.x.
- Vidlock, E. J. and Chang, L. (2015) 'Irritable Bowel Syndrome', *Yamada's Textbook of Gastroenterology*. (Wiley Online Books), pp. 1495–1521. doi: doi:10.1002/9781118512074.ch75.
- Wang, Y. *et al.* (2017) 'Rodent Model of Irritable Bowel Syndrome', *International Journal of Gastroenterology Disorders & Therapy*, 4. doi: 10.15344/2393-8498/2017/131.
- White, W. H. (1905) 'A study of 60 cases of membranous colitis', *Lancet*, 2(29), pp. 1229–1235.
- Yang, P.-C. *et al.* (2006) 'Chronic psychological stress in rats induces intestinal sensitization to luminal antigens.', *The American journal of pathology*, 168(1), pp. 104–14; quiz 363. doi: 10.2353/ajpath.2006.050575.



## LISTA LUCRĂRILOR PROPRII

### I. Articole ISI publicate

1. **Roxana Cojocariu**, Alin Ciobica , Ioana-Miruna Balmus, Samson Guenne, Anca Trifan , Carol Stanciu, Luminita Hrițcu, and Radu Lefter, 2019, Antioxidant Capacity and Behavioral Relevance of a Polyphenolic Extract of *Chrysanthellum americanum* in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome, *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2019, Article ID 3492767, 13 pages <https://doi.org/10.1155/2019/3492767>).
2. **Roxana O Cojocariu**, Ioana-Miruna Balmus, Radu Lefter, Luminita Hritcu, Daniela C Ababei, Alin Ciobica, Simona Copaci, Silvia E L Mot, Lucian Copolovici, Dana M Copolovici, Stefana Jurcoane, “*Camelina sativa* Methanolic and Ethanolic Extract Potential in Alleviating Oxidative Stress, Memory Deficits, and Affective Impairments in Stress Exposure-Based Irritable Bowel Syndrome Mouse Models”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020 Dec 23; 2020:9510305. doi:10.1155/2020/9510305. eCollection.
3. Balmus Ioana – Miruna, Ilie Ovidiu, Ciobica Alin, **Cojocariu Roxana – Oana**, Stanciu Carol, Trifan Anca, Cimpeanu Mirela, Cimpeanu Cristian, Gorgan Lucian ,, Irritable bowel syndrome between molecular approach and clinical expertise – searching for gapfillers in the oxidative way of thinking”, *Medicina*, 2020, 56(1), 38; <https://doi.org/10.3390/medicina56010038>
4. 4. Ioana-Miruna Balmus, **Roxana-Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Stefan Strungaru, Roxana Strungaru-Jijie, Alina Cantemir, Catalina Galatanu, Lucian Gorgan “Preliminary Study on the Tears Oxidative Stress Status and Sleep Disturbances in Irritable Bowel Syndrome Patients” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 23 mai 2020; doi:10.1155/2020/4690713. E Collection 2020.
5. Radu Lefter, **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Ioana-Miruna Balmus, Ioannis Mavroudis, Anna Kis, “Interactions between Sleep and Emotions in Humans and Animal Models” *Medicina (Kaunas)*, 2022 Feb 11; 58(2):274. doi: 10.3390/medicina58020274.
6. **Roxana Cojocariu**, Ioana Balmus, Radu Lefter, Luminita Hritcu, Dana Ababei, Alin Ciobica, Simona Copaci, Lucian Copolovici, Dana Copolovici, Stefana Jurcoane, „Beneficial effects of *Camelina sativa* oil on behavioural (memory, anxiety, depression and social-related) manifestations and oxidative stress parameters in a

mice model of irritable bowel syndrome” Rom Biotechnol Lett. 10 aprilie2020; 25(3): 1532-1540doi: 10.25083/rbl/25.3/1532.1540

7. Ovidiu-Dumitru Ilie, **Roxana-Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Sergiu-Ioan Timofte and Bogdan Doroftei “Forecasting the spreading of COVID-19 across nine countries from Europe, Asia, and the American continent using the ARIMA models – literature overview regarding the involvement of the gastrointestinal microflora” *Microorganisms*, 30 iulie 2020, vol.8, issue 8, doi10.3390/microorganisms8081158.
8. Bogdan Doroftei, Ovidiu-Dumitru Ilie, **Roxana-Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Radu Maftai, Delia Grab, Emil Anton, Jack McKenna, Nitasha Dhunna and Gabriela Simionescu “Minireview Exploring the Biological Cycle of Vitamin B3 and Its Influence on Oxidative Stress: Further Molecular and Clinical Aspects” *Molecules*, iulie 2020, 22;25(15):3323. doi: 10.3390/molecules25153323.
9. Ilie Ovidiu-Dumitru; Bolos Alexandra; Nita Ilinca-Bianca; **Cojocariu Roxana-Oana**; Balmus Ioana-Miruna; Ciobica Alin; Trus Constantin; Doroftei Bogdan “Preliminary Data on Gastrointestinal Deficiencies Incidence and the Prevalence of Anxiety During the COVID-19 Pandemic Among the Medical Workers”, *Journal of Nervous Mental Diseases*; 2 nov. 2021, ID: covidwho-1504110.
10. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Ioana – Miruna Balmus, Lucian Gorgan, Manuela Padurariu, Carol Stanciu and Anca Trifan, 2019, *EHB*, „Some mechanistical and computational aspects on the correlations that might exist between irritable bowel syndrome versus sleep patterns and disturbances”, DOI: [10.1109/EHB47216.2019.8969977](https://doi.org/10.1109/EHB47216.2019.8969977)
11. Ioana-Miruna Balmus, Alin Ciobica, **Roxana Oana Cojocariu**, Lucian Gorgan, Carol Stanciu and Anca Trifan, 2019, *EHB*, „Correlative Studies on the Biorelevance of Smoking in Gastrointestinal Irritable Bowel Syndrome-like Symptoms”, DOI: [10.1109/EHB47216.2019.8970036](https://doi.org/10.1109/EHB47216.2019.8970036)
12. Ioana-Miruna Balmus, Alin Ciobica, **Roxana Oana Cojocariu**, Lucian Gorgan, Carol Stanciu and Anca Trifan, 2019, *EHB*, “The Possible Biorelevance of Alcohol Consumption in some Gastrointestinal IBS-Like Symptoms - Correlative Studies Based on Surveying” DOI: [10.1109/EHB47216.2019.8969914](https://doi.org/10.1109/EHB47216.2019.8969914)

13. Radu Lefter, **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Ioana-Miruna Balmus, Ioannis Mavroudis, Anna Kis, *Medicina*, Feb. 2022, „Interactions between Sleep and Emotions in Humans and Animal Models”, DOI: [10.3390/medicina58020274](https://doi.org/10.3390/medicina58020274)

## II. Articole BDI publicate

1. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Daniel Timofte, 2018, „The current state of knowledge on the link between human microbiome and some neuropsychiatric disorders”, *Bulletin of Integrative Psychiatry*, Nr. 2 (77).
2. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Daniel Timofte, 2018, „The relevance of somenewbiomarkers (e.g. oxidative stress) in psychiatry as evidencedby non-invasive methods in saliva, tears, urine or feaces”, *Bulletin of Integrative Psychiatry*, Nr. 2 (77).
3. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Radu Lefter, Heba El- Lethy, Dumitru Cojocar, Daniel Timofte, 2018, „Current Biomarkers in Irritable Bowel Syndrome”, *Academy of Romanian Scientists Annals Series on Biological Sciences*, Volume 7, No. 2, pp. 27 - 47 ISSN 2285 – 4177.
4. **Roxana Oana Cojocariu**, Mihaela Gontea, Irina Dobrin, Daniel Timofte, 2018, „The possible metabolic and psychiatric relevance for a comparative analysis of transaminases in patients with well and poorly controlled type 2 diabetes”, *Bulletin of Integrative Psychiatry*, Nr. 4 (79).
5. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, 2019, „General Lines to Be Followed in the Ethics of Animal Models Studies for the Neuropsychiatric Disorders and Associated Manifestations”, *Academy of Romanian Scientists Annals Series on Biological Sciences Volume 8, No. 1*, pp. 45 - 52 ISSN 2285 – 4177
6. **Roxana Oana Cojocariu**, Ioana Miruna Balmus, Radu Lefter, Alin Ciobica „Further Studies on the Neurological Component of Irritable Bowel Syndrome. The Connections Between Parkinson’s Disease Pathology and Irritable Bowel Syndrome Manifestations”) *Annals Series on BIOLOGICAL SCIENCES volume 8 2019 Number 2* ISSN 2285 – 416
7. Ioana-MirunaBalmus, **Roxana Cojocariu**, Alin Ciobică, Alina Cantemir, CătălinaGălățanu, Carol Stanciu, Anca Trifan, Lucian Gorgan, Daniel Timofte „Validation of romanian version of visual analogue scale for irritable bowel syndrome questionnaire (VAS-IBS)”, *Bulletin of Integrative Psychiatry*, March 2020, DOI: [10.36219/BPI.2020.1.08](https://doi.org/10.36219/BPI.2020.1.08)

8. Alexandrina Curpan, Stefan Strungaru, Alexandra Savuca, Ovidiu Ilie, Ciobica Alin, Daniel Timofte, **Roxana Cojocariu**, Gabriel Plavan, Mircea Nicoara, „A current perspective on the relevance of nano and microplastics in neurodevelopmental disorders: further relevance for metabolic, gastrointestinal, oxidative stress-related and zebrafish studies” Bulletin of Integrative psychiatry, sept.2020, nr.3(86), doi:10.36219/BPI.2020.3.01

### III. Participări la manifestări științifice internaționale

1. **Roxana Oana Cojocariu**, Radu Lefter, Daniela Ababei, Alin Ciobica, prezentare orala cu titlul „The relevance of cognitive deficit in an adapted animal model of IBS in mice”, 27 th European Congress of Psychiatry, Varsovia, Polonia, 6-9 aprilie, 2019
2. **Roxana Oana Cojocariu**, Miruna Balmus, Alin Ciobica, Radu Lefter, Daniela Ababei, Luminita Diana Hritcu, poster cu titlul „A synthesis on behavioural disorders in irritable bowel syndrome”, 48th Meeting of the European Brain and Behaviour Society, Praga, 21-24 septembrie 2019
3. Miruna Balmus, **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Radu Lefter, Daniela Ababei, Luminita Diana Hritcu, poster cu titlul „Depressive and anxious behaviours evaluation in adapted mice model of irritable bowel syndrome”, 48th Meeting of the European Brain and Behaviour Society, Praga, 21-24 septembrie 2019.

### IV. Participări la manifestări științifice naționale

1. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, poster cu titlul ”O sinteză privind posibila legătura dintre boala Alzheimer și sindromul colonului iritabil, Cea de IX-a ediție a Conferinței Naționale Alzheimer cu participare internațională, București, 20 – 23 februarie 2019.
2. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Daniela Ababei, Miruna Balmus, Radu Lefter, prezentare orala cu titlul „Preliminary Data on Some Facilitatory Effects of Camelina Extracts on Two Different Mice Model of Irritable Bowel Syndrome on Mice”, Conferinta Stiintifica a Academiei Oamenilor de Stiinta din Romania, Bucuresti, 4-6 aprilie 2019
3. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica , Ioana-Miruna Balmus, Samson Guenne, Anca Trifan, Carol Stanciu, Luminita Hrițcu, and Radu Lefter, prezentare orala cu titlul „Antioxidant Capacity and Behavioral Relevance of a Polyphenolic Extract of Chrysanthellum americanum in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome”, Zilele medicamentului, Iasi, 10-12 octombrie 2019.

4. **Roxana Oana Cojocariu**, Miruna Balmus, Alin Ciobica, Radu Lefter, Daniela Ababei, Luminita Diana Hritcu, prezentare orală cu titlul „Date preliminare privind eficiența separării neomaterne, stresul de conținție și expunere cronică la o combinație de factori stresori ușori și impredictibili într-un model complex de sindrom de colon iritabil la șoareci - evaluarea stresului oxidativ Conferința Națională Științifică Academia Oamenilor De Știință din România, Brasov, 20 - 21 septembrie 2019
  
5. **Roxana Oana Cojocariu**, Alin Ciobica, Ioana – Miruna Balmus, Lucian Gorgan, Manuela Padurariu, Carol Stanciu and Anca Trifan, 2019, EHB, „Some mechanistical and computational aspects on the correlations that might exist between irritable bowel syndrome versus sleep patterns and disturbances” EHB 2019 paper 47.pdf
  
6. Ioana-Miruna Balmus, Alin Ciobica, **Roxana Oana Cojocariu**, Lucian Gorgan, Carol Stanciu and Anca Trifan, 2019, EHB, „Correlative Studies on the Biorelevance of Smoking in Gastrointestinal Irritable Bowel Syndrome-likeSymptoms” EHB 2019 paper 43.pdf 44
  
7. Ioana-Miruna Balmus, Alin Ciobica, **Roxana Oana Cojocariu**, Lucian Gorgan, Carol Stanciu and Anca Trifan, 2019, EHB, ” The Possible Biorelevance of Alcohol Consumption in some Gastrointestinal IBS-LikeSymptoms - Correlative Studies Based on Surveying” EHB\_2019\_paper\_44.pdf 47
  
8. **Roxana Cojocariu**, Ioana-Miruna Balmuș, Radu Lefter, Daniela Ababei, Alin Ciobică, Luminița Hrițcu, prezentare orală cu titlul „Studierea deficiențelor cognitive într-un model animal pentru sindromul colonului iritabil obținut prin expunerea la stres multifactorial”, Conferința Națională a Școlilor Doctorale din Consorțiul Universitaria, Ediția a II-a, 11 noiembrie - 14 noiembrie 2019, Timișoara.
  
9. **Roxana Oana Cojocariu**, Ioana Miruna Balmuș, Radu Lefter, Alin Ciobica, prezentare orală cu titlul „General Aspects to Be Followed in the Ethics of Animal Models Studies for the Neuropsychiatric Disorders”, Conferința cu participare internațională Etica Cercetării și Publicării Științifice, UMF Iași, 4-5 decembrie 2019.