

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “IULIU  
HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**Rezumatul  
TEZEI DE DOCTORAT**

**Implicațiile speciilor reactive ale oxigenului și  
azotului în adaptarea organismului la condiții  
extreme (altitudine)**

**Conducător de doctorat  
Prof. Univ. Dr. Adriana Mureșan**

**Doctorand  
Anca Dumitrovici**



**CLUJ-NAPOCA**

**2014**

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Stresul oxinitrozativ</b>	17
1.1. Stresul oxinitrozativ. Definiție	17
1.2. Speciile reactive ale oxigenului și azotului	17
1.2.1. Definiția speciilor reactive ale oxigenului și azotului	17
1.2.2. Clasificarea speciilor reactive ale oxigenului și azotului	18
1.2.3. Generarea speciilor reactive ale oxigenului și azotului	18
1.2.4. Efectele generale ale speciilor reactive ale oxigenului și azotului	21
<b>2. Sistemele antioxidante</b>	22
2.1. Clasificarea sistemelor antioxidante	22
2.2. Sistemele antioxidante enzimatic	23
2.3. Sistemele antioxidante neenzimatic	25
2.4. Antioxidanți naturali din surse exogene	28
<b>3. Implicațiile speciilor reactive ale oxigenului și azotului în adaptarea organismului la condiții extreme (altitudine)</b>	32
3.1. Intervenția stresului oxinitrozativ în adaptarea organismului la condiții extreme	34
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	43
<b>2. Metodologie generală</b>	43
2.1. Distribuția animalelor utilizate pe loturi	44
2.2. Administrarea antioxidantilor naturali	46
2.3. Metode utilizate	47
2.3.1. Metode biochimice de dozare a indicatorilor balanței O/AO	47
2.3.2. Morfometria și examenul histopatologic	50
2.4. Prelucrarea statistică	51
<b>3. Studiul 1. Efectul administrării unor antioxidanți naturali asupra balanței oxidanți/antioxidanți la șobolani Wistar expuși la hipoxie hipobară continuă acută și cronică</b>	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteza de lucru	53
3.3. Material și metodă	53
3.4. Rezultate	55
3.4.1. Indicatorii serici ai balanței O/AO neenzimatici	55
3.5. Discuții	61
3.6. Concluzii	65
<b>4. Studiul 2. Efectele neuroprotectoare și cardioprotectoare ale administrării unor antioxidanți naturali asupra stresului</b>	66

<b>oxidativ indus de expunerea șobolanilor Wistar la hipoxie hipobară continuă acută și cronică</b>	
4.1. Introducere	66
4.2. Ipoteza de lucru	66
4.3. Material și metodă	67
4.4. Rezultate	67
4.4.1. Rezultate de laborator	67
4.4.1.1. Indicatorii cerebrali ai balanței O/AO neenzimatici	68
4.4.1.2. Indicatorii AO enzimatici din omogenatele cerebrale	71
4.4.1.3. Indicatorii cardiaci ai balanței O/AO neenzimatici	74
4.4.1.4. Indicatorii AO enzimatici din omogenatele cardiace	78
4.4.2. Rezultate histopatologice	80
4.4.2.1. Rezultate obținute la morfometria și examenul histopatologic cardiac	80
4.4.2.2. Rezultate obținute la morfometria și examenul histopatologic cerebral	84
4.5. Discuții	87
4.6. Concluzii	94
<b>5. Studiul 3. Efectul administrării unor antioxidanți naturali asupra stresului oxinitrozativ indus de expunerea șobolanilor Wistar la hipoxie hipobară intermitentă de scurtă și respectiv, de lungă durată</b>	95
5.1. Introducere	95
5.2. Ipoteza de lucru	95
5.3. Material și metodă	95
5.4. Rezultate	97
5.4.1. Rezultate de laborator	97
5.4.1.1. Indicatorii serici ai balanței O/AO neenzimatici	97
5.4.1.2. Indicatorii serici ai stresului nitrozativ	101
5.5. Discuții	102
5.6. Concluzii	107
<b>6. Studiul 4. Efectele cardioprotectoare și neuroprotectoare ale administrării unor antioxidanți naturali asupra stresului oxidativ indus de expunerea șobolanilor Wistar la hipoxie hipobară intermitentă de scurtă și respectiv, de lungă durată. Aspecte histopatologice.</b>	108
6.1. Introducere	108
6.2. Ipoteza de lucru	108
6.3. Material și metodă	109
6.4. Rezultate	109
6.4.1. Rezultate histopatologice	109
6.4.1.1. Rezultate obținute la morfometria și examenul histopatologic cardiac	109
6.4.1.1.1. Modificări cardiace la șobolanii expuși la HHI de scurtă durată versus HHI de lungă durată	109
6.4.1.1.2. Rezultate obținute la morfometria cardiacă la șobolanii expuși la HHI de scurtă durată versus HHI de lungă durată	111
6.4.1.1.3. Rezultate obținute la examenul histopatologic cardiac la șobolanii expuși la HHI de scurtă durată versus HHI de lungă durată	112

6.4.1.2. Rezultate obținute la morfometria și examenul histopatologic cerebral	113
6.4.1.2.1. Rezultate obținute la morfometria cerebrală la șobolanii expuși la HHI de scurtă durată versus HHI de lungă durată	113
6.4.1.2.2. Rezultate obținute la examenul histopatologic cerebral la șobolanii expuși la HHI de scurtă durată versus HHI de lungă durată	115
6.5. Discuții	116
6.6. Concluzii	118
<b>7. Concluzii generale (sinteză)</b>	119
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	120
<b>REFERINȚE</b>	121

**Cuvinte cheie:** hipoxie hipobară, balanța oxidanți/antioxidanți, neuroprotecție, cardioprotecție, stres oxinitrozativ.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### 1. Ipoteza de lucru/obiective

Cercetările personale experimentale au avut în vedere următoarele obiective:

1. Realizarea unui model experimental pe șobolani masculi, rasa Wistar similar expunerii la altitudine înaltă acută și cronică pe care să se poată studia modificările balanței O/AO.
2. Studiul efectului expunerii continue la HH acută și la HH cronică asupra parametrilor SO.
3. Studiul efectului expunerii intermitente la HH de scurtă și lungă durată asupra parametrilor SO și SON.
4. Investigarea eficienței suplimentării cu AO naturali: Quercetin, extract de LBG și Chitosan asupra parametrilor SO și SON indus de expunerea la HH.

### 2. Metodologie generală

#### Studiul experimental

Studiul experimental s-a desfășurat în Centrul de Cercetare al Disciplinei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, România, după ce, în prealabil, a fost verificat și aprobat de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca și conform cu Ghidul de Bune Practici. Studiul s-a efectuat în perioada 2011-2013, fiind un studiu prospectiv, cu durată de 14 zile și respectiv, 4 săptămâni. Sacrificarea animalelor s-a făcut prin metode conforme legislației în vigoare. Experimentele au primit avizul favorabil al Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

#### 2.1. Distribuția animalelor utilizate pe loturi

Experimentele s-au realizat pe 19 de loturi de animale, fiecare lot fiind alcătuit din 10 șobolani (n=10 animale/lot). Împărțirea pe loturi s-a făcut după cum urmează.

##### *Pentru studiile 1 și 2:*

**Lotul I (martor, HHA+SF)** format din șobolani expuși la hipoxie hipobară acută (HHA) și tratați cu ser fiziologic (SF), animalele fiind sacrificate la readucerea la normoxie.

**Lotul II (HHA+Que)** format din șobolani expuși la HHA și tratați cu Quercetin, animalele fiind sacrificate la readucerea la normoxie.

**Lotul III (HHA+LBG)** format din șobolani expuși la HHA și tratați cu extract de LBG, animalele fiind sacrificate la readucerea la normoxie.

**Lotul IV (HHA+Chi)** format din șobolani expuși la HHA și tratați cu Chitosan, animalele fiind sacrificate la readucerea la normoxie.

**Lotul V (martor, Nx+SF)** format din șobolani menținuți în condiții de normoxie normobară (760 mmHg, 21% O<sub>2</sub> și 79% N<sub>2</sub>) timp de 14 zile consecutive și tratați cu SF, animalele fiind sacrificate după 14 zile.

**Lotul VI (HHC+LBG)** format din șobolani expuși la HH cronică (HHC) și tratați cu extract de LBG, animalele fiind sacrificate după 14 zile.

**Lotul VII (HHC+Que)** format din șobolani expuși la HHC și tratați cu Quercetin, animalele fiind sacrificate după 14 zile de expunere la HH în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul VIII (HHC+Chi)** format din șobolani expuși la HHC și tratați cu Chitosan, animalele fiind sacrificate după 14 zile de expunere la HH în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul IX (martor, HHC+SF)** format din șobolani expuși la HHC și tratați cu SF, animalele fiind sacrificate după 14 zile de expunere la HH în momentul readucerii la normoxie.

Animalele din loturile I-IV și respectiv VI-IX au fost expuse la altitudine simulată (380 mmHg, 12% O<sub>2</sub> și 88% N<sub>2</sub>) de 5500 m în barocameră unde s-a menținut temperatura la 28°C și umiditatea la 55-60% pentru o zi (hipoxie hipobară acută) și respectiv timp de 14 zile consecutiv (hipoxie hipobară cronică), timp de 23 ore/zi.

Animalele au fost scoase din barocameră o dată pe zi timp de o oră pentru igienă, hrană, hidratare și administrarea tratamentului.

#### ***Pentru studiile 3 și 4:***

**Lotul I (martor, NxSD+SF)** format din șobolani menținuți în condiții de normoxie normobară (760 mmHg, 21% O<sub>2</sub> și 79% N<sub>2</sub>) timp de 2 zile consecutive și tratați cu SF, animalele fiind sacrificate după 2 zile.

**Lotul II (martor, HHISD+SF)** format din șobolani expuși la HH intermitentă (HHI) de scurtă durată și tratați cu SF, animalele fiind sacrificate după 2 zile de expunere la HHI, în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul III (HHISD+Que)** format din șobolani expuși la HHI de scurtă durată și tratați cu Quercetin, animalele fiind sacrificate după 2 zile de expunere la HHI, în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul IV (HHISD+BG)** format din șobolani expuși la HHI de scurtă durată și tratați cu extract de LBG, animalele fiind sacrificate după 2 zile de expunere la HHI, în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul V (HHISD+Chi)** format din șobolani expuși la HHI de scurtă durată și tratați cu Chitosan, animalele fiind sacrificate după 2 zile de expunere la HHI, în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul VI (martor, NxLD+SF)** format din șobolani menținuți în condiții de normoxie normobară (760 mmHg, 21% O<sub>2</sub> și 79% N<sub>2</sub>) timp de 4 săptămâni consecutive și tratați cu SF, animalele fiind sacrificate după 4 săptămâni.

**Lotul VII (martor, HHILD+SF)** format din șobolani expuși la HHI de lungă durată și tratați cu ser fiziologic, animalele fiind sacrificate după 4 săptămâni de expunere la HHI, în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul VIII (HHILD+Que)** format din șobolani expuși la HHI de lungă durată și tratați cu Quercetin, animalele fiind sacrificate după 4 săptămâni de expunere la HHI, în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul IX (HHILD+LBG)** format din șobolani expuși la HHI de lungă durată și tratați cu extract de LBG, animalele fiind sacrificate după 4 săptămâni de expunere la HHI, în momentul readucerii la normoxie.

**Lotul X (HHILD+Chi)** format din șobolani expuși la HHI de lungă durată și tratați cu Chitosan, animalele fiind sacrificate după 4 săptămâni de expunere la HHI în momentul readucerii la normoxie.

Animalele din loturile II-V și respectiv VII-X au fost expuse la altitudine simulată (380 mmHg, 12% O<sub>2</sub> și 88% N<sub>2</sub>) de 5500 m în barocameră unde s-a menținut temperatura la 28°C și umiditatea la 55-60% pentru 2 zile (hipoxie hipobară intermitentă de scurtă durată, 8 ore/zi) și respectiv, timp de 4 săptămâni consecutiv (hipoxie hipobară intermitentă de lungă durată, 8 ore/zi, 5 zile/săptămână). Animalele au fost scoase din barocameră o dată pe zi, după fiecare 8 ore de expunere la HH, pentru igienă, hrană, hidratare și administrarea tratamentului.

## **2.2. Administrarea antioxidantilor naturali**

Antioxidanții naturali utilizați în studiul experimental au fost: Quercetinul, extractul de *Lycium barbarum* (LBG) și Chitosanul. Quercetinul și extractul de LBG (LBG-ul a fost extras din fructele goji) au fost preparate, dozate și încapsulate la Centrul de biotehnologii vegetale aplicate Proplanta Cluj-Napoca.

Tratamentul (suplimentul AO: Quercetinul și extractul de LBG și respectiv serul fiziologic) a fost administrat prin tehnica gavajului buco-faringian (0.6 ml/șobolan), iar Chitosanul a fost administrat intraperitoneal. AO au fost dizolvați în ser fiziologic.

Administrarea tratamentului AO s-a realizat după cum urmează.

### ***Pentru studiile 1 și 2:***

O parte din șobolani au fost tratați cu Quercetin (30 mg/kg/zi) și respectiv, extract de LBG (30 mg/kg/zi) administrate prin tehnica gavajului buco-faringian sau cu Chitosan (0,30-0,35 microg/animal/zi) administrat intraperitoneal, timp de o zi sau respectiv, 14 zile consecutiv înaintea începerii expunerii la HH și cu 30 de minute înaintea fiecărei expuneri la HH.

### ***Pentru studiile 3 și 4:***

O parte din șobolani au fost tratați cu Quercetin (30 mg/kg/zi) și respectiv, extract de LBG (30 mg/kg/zi) administrate prin tehnica gavajului buco-faringian sau Chitosan (0,30-0,35 microg/animal/zi) administrat intraperitoneal, timp de 2 zile sau respectiv, 4 săptămâni consecutiv cu 30 de minute înaintea fiecărei expuneri la HHI.

## **2.3. Metode utilizate**

La sfârșitul experimentului, după sedare și inhalare de eter etilic, la toate animalele luate în studiu s-a recoltat sânge pe anticoagulant (EDTA) prin puncția sinusului retroorbital, pentru determinarea indicatorilor balanței O/AO

### **2.3.1. Metode biochimice de dozare a indicatorilor balanței oxidanți/antioxidanți**

Stresul oxidativ, consecință a dezechilibrului balanței O/AO, s-a explorat dozându-se din plasmă sau din omogenatele tisulare radicalii liberi ai oxigenului rezultați din peroxidarea lipidelor: malondialdehida totală (nmol/ml)<sup>102</sup> și carbonilarea proteinelor: proteinele carbonilate (nmol/mg proteină)<sup>103</sup> și capacitatea antioxidantă sanguină sau tisulară prin măsurarea: statusului non-enzimatic plasmatic sau tisular estimat prin măsurarea glutatationului seric redus (nmol/ml)<sup>104</sup> și a activității enzimelor antioxidante: superoxid dismutaza (U/mg proteină)<sup>106</sup> și catalaza (U/mg proteină)<sup>107</sup> din hemolizatul eritocitar sau din omogenat tisular.

### **2.3.2. Morfometria și examenul histopatologic**

Prelucrarea eșantioanelor de țesut cardiac și nervos, morfometria și examenul histopatologic au fost efectuate în Laboratorul de la Disciplina de Anatomie patologică de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca.

La sfârșitul experimentului, în urma sacrificării animalelor, au fost recoltate probe de miocard și creier de la toate animalele luate în studiu.

Preparatele histopatologice au fost examinate și fotografiate utilizând un sistem calibrat de prelucrare și preluare a imaginilor Olympus, respectiv programul de achiziție și prelucrare de imagini Cell B (Olympus). Au fost efectuate măsurători multiple și s-a făcut media pentru a obține o singură valoare pentru fiecare animal, respectiv pentru fiecare lot.

Pentru morfometria cerebrală, fiecare probă a fost examinată în vederea stabilirii numărului de neuroni în necroză/apoptoză. Pentru aceasta s-au folosit criteriile morfologice de apreciere a injuriei neuronale ireversibile stabilite de Farber și col.<sup>80</sup> și Trump și col.<sup>109</sup>.

Din fiecare zonă au fost examinate 5 câmpuri microscopice cu obiectivul 20x, stabilindu-se numărul de neuroni în necroză, număr care apoi s-a raportat la numărul total de neuroni de pe fiecare câmp, obținându-se procentul de neuroni în necroză pentru cele două zone luate în studiu.

## **2.4. Prelucrarea statistică**

În analiza datelor s-au utilizat pachetele software SPSS 17.0, GraphPad 6 și Microsoft Excel. Metodele statistice utilizate în partea de histologie și toate datele morfologice au fost realizate utilizând testul Shapiro-Wilk și testul t-Student, cu software R' (R Development Core Team, 2010).

### **Studiu 1. Efectul administrării unor antioxidanți naturali asupra balanței oxidanți/antioxidanți la șobolani Wistar expuși la hipoxie hipobară continuă acută și cronică**

#### **Rezultate și concluzii**

1. Expunerea continuă a șobolanilor la HHA și HHC produce modificări semnificative ale balanței O/AO caracterizate prin creșterea nivelului seric al MDA și PC și scăderea activității GSH seric și activității eritrocitare a SOD și CAT.

2. Expunerea la HHA este însoțită de o creștere mai accentuată a stresului oxidativ comparativ cu expunerea la HHC.

3. Administrarea de AO, în doza utilizată, are un efect AO puternic, protejând lipidele împotriva peroxidării și proteinele împotriva carbonilării. Efectul cel mai eficient în scăderea nivelului seric al MDA avându-l Quercetinul atât în urma expunerii la HHA cât și în urma expunerii la HHC, iar extractul de LBG în urma expunerii la HHA. Asupra scăderii nivelului seric al PC un efect benefic major a avut mai ales extractul de LBG în urma expunerii la HHC și Quercetinul în urma expunerii la HHA.

4. Activitatea SOD eritrocitare a crescut mai ales la șobolanii expuși la HHA și tratați cu extract de LBG sau Chitosan, iar la șobolanii expuși la HHC mai ales după tratament cu Quercetin.

5. Activitatea CAT eritrocitare a crescut semnificativ atât la șobolanii expuși la HHA cât și la cei expuși la HHC după tratament cu extract de LBG sau Quercetin.

### **Studiu 2. Efectele neuroprotectoare și cardioprotectoare ale administrării unor antioxidanți naturali asupra stresului oxidativ indus de expunerea șobolanilor Wistar la hipoxie hipobară continuă acută și cronică.**

#### **Rezultate și concluzii**

1. Expunerea continuă a șobolanilor la HH acută și cronică produce modificări semnificative ale balanței O/AO la nivelul creierului și inimii caracterizate prin creșterea nivelului MDA și PC și scăderea activității GSH, SOD și CAT în omogenatele cerebrale și cardiace.

2. Expunerea la HHC este însoțită de o creștere mai accentuată a stresului oxidativ la nivel cerebral și cardiac comparativ cu expunerea la HHA.

3. Administrarea de AO naturali: Quercetin, extract de LBG și respectiv Chitosan, în doza utilizată, după expunerea la HH acută sau cronică a avut efect neuroprotector și cardioprotector evidențiat atât biochimic prin studiul balanței O/AO în omogenatele tisulare cât și prin rezultatele obținute la examenul histopatologic cerebral și cardiac. Aceste efecte ar putea influența benefic patologia cerebrală și cardiacă care se circumscrie expunerii la altitudine înaltă de scurtă și lungă durată.

### **Studiu 3. Efectul administrării unor antioxidanți naturali asupra stresului oxinitrozativ indus de expunerea șobolanilor Wistar la hipoxie hipobară intermitentă de scurtă și respectiv, de lungă durată**

#### **Rezultate și concluzii**

1. Expunerea șobolanilor la HHI de scurtă durată și respectiv, de lungă durată produce modificări semnificative ale balanței serice O/AO neenzimatici caracterizate prin creșterea nivelului seric al MDA și PC și scăderea activității GSH seric.

2. Expunerea la HHI de lungă durată este însoțită de o creștere mai accentuată a stresului oxidativ comparativ cu expunerea la HHI de scurtă durată.

3. Administrarea de antioxidanți naturali, în doza utilizată, are un efect antioxidant puternic, protejând lipidele împotriva peroxidării și proteinele împotriva carbonilării.

4. Activitatea serică a GSH a crescut mai ales la șobolanii tratați cu extract de LBG și expuși la HHI de scurtă durată, iar în expunerea șobolanilor la HHI de lungă durată toți cei trei antioxidanți naturali au crescut activitatea GSH în ser.

5. Activitatea iNOS a crescut semnificativ atât la șobolanii expuși la HHI de scurtă durată cât și la cei expuși la HHI de lungă durată, creșterile fiind mai semnificative statistic după expunerea la HHI de scurtă durată. După tratament cu extract de LBG și respectiv, Quercetin nivelul seric al iNOS a scăzut semnificativ atât după expunerea la HHI de scurtă durată, cât și după expunerea la HHI de lungă durată. Tratamentul cu Chitosan a scăzut semnificativ statistic nivelul iNOS numai după expunerea la HHI de scurtă durată.

#### **Studiu 4. Efectele cardioprotectoare și neuroprotectoare ale administrării unor antioxidanți naturali asupra stresului oxidativ indus de expunerea șobolanilor Wistar la hipoxie hipobară intermitentă de scurtă și respectiv, de lungă durată. Aspecte histopatologice.**

##### **Rezultate și concluzii**

1. Expunerea la HHILD este însoțită de o creștere mai accentuată a hipertrofiei cardiace și a deteriorării arhitecturii miocardice comparativ cu expunerea la HHISD.

2. Expunerea la HHISD a exercitat efecte cardioprotectoare.

3. Expunerea la HHISD este însoțită de o creștere mai accentuată a procentului de neuroni în necroză și a deteriorării arhitecturii cerebrale comparativ cu expunerea la HHILD.

4. Administrarea de AO naturali: Quercetin, extract de LBG și respectiv Chitosan, în doza utilizată, în expunerea la HHISD și respectiv la HHILD a avut efecte cardioprotectoare și neuroprotectoare evidențiate prin rezultatele obținute la morfometria și examenul histopatologic cardiac și cerebral. Quercetinul a exercitat cel mai benefic efect cardioprotector atât în expunerea la HHISD, cât și în expunerea la HHILD, iar Chitosanul a exercitat cel mai benefic efect neuroprotector atât în expunerea la HHISD, cât și în expunerea la HHILD.

5. Efectele cardioprotectoare și neuroprotectoare ale celor trei AO naturali luați în studiu ar putea influența benefic patologia cardiacă și cerebrală care se circumscrie expunerii intermitente la altitudine înaltă de scurtă și de lungă durată.

##### **Concluzii generale**

1. Expunerea la HHA este însoțită de o creștere accentuată a stresului oxidativ comparativ cu expunerea la HHC.

2. Administrarea de AO, în doza utilizată, are un efect AO puternic, protejând lipidele împotriva peroxidării și proteinele împotriva carbonilării

3. Quercetinul scade nivelul seric al MDA în urma expunerii la HHA și la HHC.

4. Expunerea continuă a șobolanilor la HHA și HHC produce modificări semnificative ale balanței O/AO la nivelul creierului și inimii caracterizate prin creșterea nivelului MDA și PC și scăderea activității GSH, SOD și CAT în omogeneratele cerebrale și cardiace.

5. Administrarea de AO naturali: Quercetin, extract de LBG și respectiv Chitosan, în doza utilizată, după expunerea la HHA sau HHC a avut efect neuroprotector și cardioprotector evidențiat biochimic în omogeneratele tisulare cât și prin rezultatele obținute la examenul histopatologic.

6. Activitatea iNOS a crescut semnificativ atât la șobolanii expuși la HHISD cât și la cei expuși la HHILD, creșterile fiind mai semnificative statistic după expunerea la HHISD.

7. După administrarea extractului de LBG și respectiv, Quercetinului nivelul seric al iNOS a scăzut semnificativ atât după expunerea la HHISD, cât și după expunerea la HHILD. Tratamentul cu Chitosan a scăzut semnificativ statistic nivelul iNOS numai după expunerea la HHISD.

8. Expunerea la HHISD este însoțită de o creștere mai accentuată a procentului de neuroni în necroză și a deteriorării arhitecturii cerebrale comparativ cu expunerea la HHILD.



9. Administrarea de AO naturali în expunerea la HHISD și respectiv la HHILD a avut efecte cardioprotectoare și neuroprotectoare evidențiate prin rezultatele obținute la morfometria și examenul histopatologic cardiac și cerebral.

10. Efectele cardioprotectoare și neuroprotectoare ale celor trei AO naturali luați în studiu influențaza benefic patologia cardiacă și cerebrală care se circumscrie expunerii intermitente la altitudine înaltă de scurtă și de lungă durată.

## 8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Cercetarea experimentală a pornit de la multiplele observații clinice și/sau experimentale care arată că hipoxia și ischemia acută sau de durată este urmată deseori de reperfuzie "perfuzie de lux" cu apariția suplimentară de oxigen care va induce creșterea producției de SRON. S-a realizat un model experimental de inducere a hipoxiei hipobare simulată în barocameră, model care a permis studierea stresului oxinitrozativ, precum și efectul unor antioxidanți naturali. Studiul experimental "in vivo" pe model animal expus la altitudine simulată în barocameră aduce date obiective biochimice și morfologice asupra leziunilor apărute în hipoxia hipobară asociată cu un număr mare de afecțiuni. Rezultatele și concluziile studiului nostru pot fi utile, nu numai în observația și practica clinică, dar și în unele profesii la care este expus personalul aeronavigant, alpinistii, aducând argumente noi asupra unor mecanisme patologice implicate în efectele altitudinii înalte și presiunii scăzute a oxigenului asupra organismului. Studiul experimental aduce argumente favorabile în direcția utilizării unor antioxidanți naturali: Quercetin, extract de LBG și Chitosan în scopul reducerii leziunilor tisulare neuronale și miocardice induse de expunerea la hipoxie hipobară. Deși studiul s-a efectuat în exclusivitate pe animal de laborator, considerăm că observațiile asupra modificării raportului O/AO în ser și țesuturi precum și cele histopatologice ar putea fi utile și în patologia umană în afecțiuni care se circumscriu hipoxiei tisulare.

## Bibliografie selectivă

1. Mureșan A, Orășan R, Tache S. Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice. Editura Toderco, Cluj-Napoca 2006.
2. Tache S. Speciile reactive ale oxigenului și ale azotului: formarea și consecințe (cap.1). Stresul oxidativ (cap.2). În: Stresul oxidativ în bolile interne. Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca 2000;15-136.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> ed. London, Oxford University Press 1999.
4. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In Oxidative Stress, ed. SIES H. Academic Press, London 1985;1-8.
5. Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. J. Pharm. Pharmacol. 2009;61(10):1365-1374.
6. Jeong SM, Kang MJ, Choi HN, Kim JH, Kim JI. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. Nutr Res Pract. 2012;6(3):201-207.
7. Kim JH, Kang MJ, Choi HN, Jeong SM, Lee YM, Kim JI. Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. Nutr Res Pract. 2011;5(2):107-111.
8. Bakhshaeshi M, Khaki A, Fathiazad F, Khaki AA, Ghadamkheir E. Anti-oxidative role of quercetin derived from *Allium cepa* on aldehyde oxidase (OX-LDL) and hepatocytes apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat. Asian Pac J Trop Biomed. 2012;2(7):528-531.

**”IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA  
FACULTY OF MEDICINE**

**Abstract of the  
DOCTORAL THESIS**

**Implications of oxidative stress and nitrogen in  
the adaptation of the body in extreme  
conditions (altitude)**

**Scientific Director  
Prof. Univ. Dr. Adriana Mureșan**

**Doctoral candidate  
Anca Dumitrovici**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

**CLUJ-NAPOCA**

**2014**

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Oxinitrosative stress</b>	17
1.1. Oxinitrosative stress. Definition	17
1.2. Reactive oxygen and nitrogen species	17
1.2.1. Definition of reactive oxygen and nitrogen species	17
1.2.2. Classification of reactive oxygen and nitrogen species	18
1.2.3. Generation of reactive oxygen and nitrogen species	18
1.2.4. General effects of reactive oxygen and nitrogen species	21
<b>2. Antioxidant systems</b>	22
2.1. Classification of antioxidant systems	22
2.2. Enzymatic antioxidant systems	23
2.3. Non-enzymatic antioxidant systems	25
2.4. Exogenous sources of natural antioxidants	28
<b>3. Implications of reactive oxygen and nitrogen species in the adaptation of body to extreme conditions (altitude)</b>	32
3.1. Intervention of Oxinitrosative stress in adapting the body to extreme conditions	34
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Objectives</b>	43
<b>2. General methodology</b>	43
2.1. Distribution of test animals by groups	44
2.2. Administration of natural antioxidants	46
2.3. Methods used	47
2.3.1. Biochemical methods for the measurement of the O/AO balance indicators	47
2.3.2. Morphometry and histopathological exam	50
2.4. Statistical processing	51
<b>3. Study 1. Effect of the administration of natural antioxidants on oxidant/antioxidant balance in Wistar rats exposed to continuous acute and chronic hypobaric hypoxia</b>	53
3.1. Introduction	53
3.2. Objectives	53
3.3. Material and method	53
3.4. Results	55
3.4.1. Serum O/AO indicators of non-enzymatic balance	55
3.5. Discussion	61
3.6. Conclusions	65
<b>4. Study 2. Neuroprotective and cardioprotective effects of the administration of natural antioxidants on oxidative stress</b>	66

<b>induced by exposure of Wistar rats to continuous acute and chronic hypobaric hypoxia</b>	
4.1. Introduction	66
4.2. Objectives	66
4.3. Material and method	67
4.4. Results	67
4.4.1. Laboratory results	67
4.4.1.1. Cerebral indicators of non-enzymatic O/AO balance	68
4.4.1.2. AO enzymatic Indicators from cerebral homogenates	71
4.4.1.3. Cardiac indicators of O/AO non-enzymatic balance	74
4.4.1.4. AO enzymatic indicators from cardiac homogenates	78
4.4.2. Histopathological results	80
4.4.2.1. Results obtained in cardiac morphometry and histopathology	80
4.4.2.2. Results obtained in cerebral morphometry and histopathology	84
4.5. Discussion	87
4.6. Conclusions	94
<b>5. Study 3. Effect of the administration of natural antioxidants on oxinitrosative stress induced by exposing Wistar rats to short-term intermittent hypobaric hypoxia, long-term, respectively</b>	95
5.1. Introduction	95
5.2. Objectives	95
5.3. Material and method	95
5.4. Results	97
5.4.1. Laboratory results	97
5.4.1.1. Serum indicators indicators of non-enzymatic O/AO balance	97
5.4.1.2. Serum indicators of oxinitrosative stress	101
5.5. Discussion	102
5.6. Conclusions	107
<b>6. Study 4. Cardioprotective and neuroprotective effects of the administration of natural antioxidants on oxidative stress induced by exposing Wistar rats to short-term intermittent hypobaric hypoxia, long-term, respectively. Histopathological aspects.</b>	108
6.1. Introduction	108
6.2. Objectives	108
6.3. Material and method	109
6.4. Results	109
6.4.1. Histopathological results	109
6.4.1.1. Results obtained in cardiac morphometry and histopathological exam	109
6.4.1.1.1. Cardiac modifications in rats exposed to short-term HHI versus long-term HHI	109
6.4.1.1.2. Results obtained from heart morphometry in rats exposed to short-term HHI versus long-term HHI	111
6.4.1.1.3. Results obtained from cardiac histopathological exam in rats exposed to short-term HHI versus long-term HHI	112
6.4.1.2. Results obtained from cerebral morphometry and histopathological exam	113

6.4.1.2.1. Results obtained from cerebral morphometry in rats exposed to short-term HHI versus long-term HHI	113
6.4.1.2.2. Results obtained from cerebral histopathological exam in rats exposed to short-term HHI versus long-term HHI	115
6.5. Discussion	116
6.6. Conclusions	118
<b>7. General conclusions</b>	119
<b>8. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	120
<b>REFERENCES</b>	121

**Key words:** hypobaric hypoxia, oxidant / antioxidant balance, neuroprotection, cardioprotection, Oxinitrosative stress.

## PERSONAL CONTRIBUTION

### 1. Objectives

The objectives of the studies were the following :

1. Making an experimental model on male Wistar rats similar to acute and chronic exposure to high altitude upon which O/AO balance modification can be studied.
2. Study of the effect of continuous exposure to acute HH and chronic HH on the OS parameters.
3. Study of the effect of intermittent exposure to short and long term HH on OS and NOS parameters.
4. Investigating the effectiveness of natural AO supplementation: Quercetin, LBG and Chitosan extract on the OS and SON parameters induced by exposure to HH.

### 2. General methodology

#### Experimental study

The experimental study was conducted in the Research Center of the Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, Romania, having previously been inspected and approved by the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca and according to Best Practices guide . The study was conducted between 2011-2013, being a prospective study, lasting 14 days, respectively, four weeks. Slaughtering was done by the method of legislation. Experiments have received the favorable opinion of the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. .

#### 2.1. Distribution of animals by groups

The experiments were carried out on groups of 19 animals, each group consisting of 10 rats (n = 10 animals / group). Subdivision of lots was done as following:

##### *For studies 1 and 2:*

**Group I (control, AHH+SS)** formed from rats exposed to acute hypobaric hypoxia (AHH) and treated with saline solution (SS), animals being sacrificed at restored normoxia.

**Group II (AHH +Que)** formed from rats exposed to AHH and treated with Quercetin, animals being sacrificed at restored normoxia.

**Group III (AHH+LBG)** formed from rats exposed to AHH and treated with LBG extract, animals being sacrificed at restored normoxia.

**Group IV (AHH+Chi)** formed from rats exposed to AHH and treated with Chitosan, animals being sacrificed at restored normoxia.

**Group V (control, Nx+SS)** formed from rats maintained under normobaric normoxia (760 mmHg, 21% O<sub>2</sub> și 79% N<sub>2</sub>) for 14 consecutive days and treated with SS, animals were sacrificed after 14 days.

**Group VI (CHH+LBG)** formed from rats exposed to chronic HH (CHH) and treated with LBG extract, animals were sacrificed after 14 days.

**Group VII (CHH+Que)** formed from rats exposed to CHH and treated with Quercetin, animals were sacrificed after 14 days from exposure to HH in the moment of normoxia restoration.

**Group VIII (CHH+Chi)** formed from rats exposed to CHH and treated with Chitosan, animals were sacrificed after 14 days from exposure to HH in the moment of normoxia restoration.

**Group IX (control, CHH+SS)** formed from rats exposed to CHH and treated with SS, animals were sacrificed after 14 days from exposure to HH in the moment of normoxia restoration.

Animals in groups I-IV and VI-IX were respectively exposed to simulated altitude (380 mmHg, 12% O<sub>2</sub> și 88% N<sub>2</sub>) of 5500 m in barochamber where the temperature was maintained at 28°C and humidity at 55-60% for a day (acute hypobaric hypoxia) respectively for 14 consecutive days (chronic hypobaric hypoxia), for 23 hours/day.

The animals were removed from the barochamber once daily for one hour hygiene, food, moisture and treatment.

#### ***For studies 3 și 4:***

**Group I (control, NxSD+SS)** formed from rats maintained in conditions of normobaric normoxia (760 mmHg, 21% O<sub>2</sub> and 79% N<sub>2</sub>) for 2 consecutive days, and treated with SS, animals were sacrificed after 2 days.

**Group II (control, STIHH+SS)** formed from rats exposed to short-term intermittent HH (IHH) and treated with SS, animals were sacrificed after 2 days from exposure to IHH, in the moment of normoxia restoration

**Group III (STIHH+Que)** formed from rats exposed to short-term IHH and treated with Quercetin, animals were sacrificed after 2 days from exposure to IHH, in the moment of normoxia restoration.

**Group IV (STIHH+BG)** formed from rats exposed to short-term IHH and treated with LBG extract, animals were sacrificed after 2 days from exposure to IHH, in the moment of normoxia restoration.

**Group V (STIHH+Chi)** formed from rats exposed to short-term IHH and treated with Chitosan, animals were sacrificed after 2 days from exposure to IHH, in the moment of normoxia restoration.

**Group VI (control, NxLD+SS)** formed from rats maintained in conditions of normobaric normoxia (760 mmHg, 21% O<sub>2</sub> și 79% N<sub>2</sub>) for 4 consecutive weeks and treated with SS, animals were sacrificed after 4 weeks.

**Group VII (control, LTIHH+SS)** formed from rats exposed to long-term IHH and treated with SS, animals were sacrificed after 4 weeks of exposure to IHH, in the moment of normoxia restoration.

**Group VIII (LTIHH+Que)** formed from rats exposed to long-term IHH and treated with Quercetin, animals were sacrificed after 4 weeks of exposure to IHH, in the moment of normoxia restoration.

**Group IX (LTIHH+LBG)** formed from rats exposed to long-term IHH and treated with LBG extract, animals were sacrificed after 4 weeks of exposure to IHH, in the moment of normoxia restoration.

**Group X (LTIHH+Chi)** formed from rats exposed to long-term IHH and treated with Chitosan, animals were sacrificed after 4 weeks of exposure to IHH, in the moment of normoxia restoration.

The animals of groups II-V and VII-X were exposed to simulated altitude (380 mmHg, 12% O<sub>2</sub> and 88% N<sub>2</sub>) of 5500 m in barochamber where the temperature was maintained at 28°C and humidity at 55-60% for 2 days (short-term intermittent hypobaric hypoxia, 8 hours/day) and respectively, for 4 consecutive weeks (long-term intermittent hypobaric hypoxia, 8 hours/day, 5 days/week). The animals were removed from the barochamber once daily, after every 8 hours of exposure to HH for hygiene, nutrition, hydration and treatment.

## **2.2. Administration of natural antioxidants**

The natural antioxidants used in the experimental study were: Quercetin, Lycium barbarum extract (LBG) and Chitosan. Quercetin and LBG extract (LBG was extracted from the goji berries) were prepared and encapsulated dosage Applied Plant Biotechnology Center Proplanta Cluj-Napoca.

Treatment (AO Supplement: Quercetin and LBG extract, respectively saline solution) was administered via an intragastric tube (0.6 ml / rat), and Chitosan was administered intraperitoneally. AO was dissolved in physiological saline.

Administration of AO treatment was performed as follows.

***For studies 1 and 2:***

Some of the rats treated with quercetin (30 mg / kg / day) and LBG extract (30 mg / kg / day) administered via an intragastric tube or Chitosan (0.30-0.35 microg / animal / day) administered intraperitoneally for one day or 14 consecutive days respectively before the beginning of exposure to HH and 30 minutes before each exposure to HH.

***For studies 3 and 4:***

Some of the rats received Quercetin (30 mg/kg/day, dissolved in saline solution) or LBG extract (30 mg/kg/day, dissolved in saline solution) via an intragastric tube or Chitosan (0.30-0.35 microg / animal / day) administered intraperitoneally, for 2 days or 4 weeks consecutively with 30 minutes before each IHH exposure.

## **2.3. Methods used**

At the end of the experiment, after sedation and inhalation of diethyl ether, venous blood samples were collected with an anticoagulant (EDTA) from the rats' retro-orbital sinuses to determine indicators of the O / AO balance.

### **2.3.1. Biochemical methods of oxidants/antioxidants balance indicators**

Oxidative stress which is a result of imbalance in the O / AO, was estimated by measuring of free radical production in serum or tissue homogenates resulting from lipid peroxidation: total malondialdehyde (nmol/ml)<sup>102</sup> and proteins carbonylation: Carbonylated proteins (nmol/mg protein)<sup>103</sup> and Antioxidant capacity of the blood or tissue by measuring : non-enzymatic status of serum or tissues estimated by measurement reduced serum glutathione (nmol/ml)<sup>104</sup> and of antioxidants enzymes activities: superoxide dismutase(U/mg protein)<sup>106</sup> and catalyze (U/mg protein)<sup>107</sup> from erythrocyte hemolysate or tissue homogenate.

### **2.3.2. Morphometry histopatological exam**

Processing of cardiac and nervous tissue samples , morphometry and histopathological exam were performed in the Laboratory of the Department of Pathology at the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca.

At the end of the experiment, after sacrificing the animals , myocardial and brain samples were taken from of all animals studied.

Histological preparations were examined and photographed using a calibrated image processing and retrieval Olympus, respectively a program of image acquisition processing Cell B (Olympus). Multiple measurements were made and were averaged to obtain a single value for each animal, respectively for each group.

For brain morphometry, each sample was examined to determine the number of neurons in necrosis/apoptosis. For this we used morphological criteria for assessing irreversible stable neuronal injury established by Farber and col.<sup>80</sup> and Trump col.<sup>109</sup>.

For each zone 5 microscopic fields were examined with 20x objective, establishing the number of neurons in the necrosis, a number which was reported on the total number of neurons in each field to obtain the percentage necrosis of neurons in the two studied zones.

## **2.4. Statistical analysis**

For data analysis software SPSS 17.0 package was used, GraphPad 6 and Microsoft Excel. Used statistical methods in histology and all morphological data were realised using Shapiro-Wilk and t-Student tests, with software R' (R Development Core Team, 2010).

### **Study 1. Effect of natural antioxidant treatment on oxidant/antioxidant balance in Wistar rats exposed to acute and chronic intermittent hypobaric hypoxia**

#### **Results and conclusions**

1. Continuous exposure of the rats to AHH and CHH produces significant modifications in O/AO balance characterised by increasing serum MDA and PC levels and decreasing serum GSH activities and erythrocyte SOD and CAT activities.

2. Exposure to AHH is accompanied by a more marked increase in oxidative stress compared with exposure to CHH.

3. AO administration, in the used dose, has a strong AO effect, protecting lipids from peroxidation and proteins against carbonylation. Quercetin had the most efficient effect in lowering serum MDA not only after exposure to AHH but also after CHH exposure, and LBG extract after AHH exposure. LBG extract had the most beneficial effect in lowering serum PC level after CHH exposure and Quercetin after AHH exposure.

4. Erythrocyte SOD activity increased especially in rats exposed to AHH and treated with LBG extract or Chitosan, and in rats exposed to CHH especially after Quercetin treatment.

5. Erythrocyte CAT activity increased significantly in rats exposed to AHH and CHH after treatment with LBG extract or Quercetin.

### **Study 2. Neuroprotective and cardioprotective effects of natural antioxidant treatment on oxidative stress induced by exposing Wistar rats to acute and chronic intermittent hypobaric hypoxia.**

#### **Results and conclusions**

1. Continuous exposure of the rats to acute and chronic HH produces significant modifications in O/AO balance at the level of the heart and brain characterised by increasing MDA and PC levels and decreasing GSH, SOD and CAT activities in cerebral and cardiac homogenates.

2. Exposure to CHH is accompanied by a more marked increase in oxidative stress compared with exposure to AHH.

3. AO administration: Quercetin, LBG extract and Chitosan, in the used dose, after exposure to acute and chronic HH had a neuroprotective and cardioprotective effect, revealed both biochemically by the study of O/AO balance in homogenate tissue and through results obtained from the cerebral and cardiac histopathological exam. These beneficial effects may influence brain and cardiac pathology which circumscribes the exposure to short-term and long-term high altitude.

### **Study 3. Effect of natural antioxidant treatment on oxinitrosative stress induced by exposing Wistar rats to short-term, respectively, long-term intermittent hypobaric hypoxia .**

#### **Results and conclusions**

1. Exposing the rats to short-term, respectively, long-term IHH, produces significant modifications in serum non-enzymatic O/AO balance characterised by increasing serum MDA and PC levels and decreasing serum GSH activities.

2. Exposure to long term IHH is accompanied by a more marked increase in oxidative stress compared with exposure to exposure to short-term IHH.



3. AO administration, in the used dose, has a strong AO effect, protecting lipids from peroxidation and proteins against carbonylation.

4. Serum GSH activity increased especially in rats treated with LBG extract and exposed to short-term IHH, and in exposed rats to long-term IHH all three natural antioxidants increased serum GSH activity.

5. iNOS activity increased significantly in rats exposed to short-term IHH and those exposed to long-term IHH, increases being statistically significant after short-term exposure to IHH. After treatment with LBG extract and with Quercetin, respectively, serum iNOS level significantly, not only after short-term IHH exposure but also after long-term IHH exposure. Chitosan treatment significantly decreased the iNOS only after short-term exposure to IHH.

#### **Study 4. Cardioprotective and neuroprotective effects of natural antioxidant treatment on oxidative stress induced by exposing Wistar rats to short-term, respectively, long-term intermittent hypobaric hypoxia . Histopathological aspects.**

##### **Results and conclusions**

1. Exposure to LTIHH is accompanied by a higher growth of cardiac hypertrophy and architectural myocardial damage compared with STIHH exposure.

2. Exposure to STIHH exerted cardioprotective effects.

3. Exposure to STIHH is accompanied by a more marked increase in the percentage of neuronal necrosis and deterioration in the brain architecture compared with exposure to LTIHH.

4. AO administration: Quercetin, LBG extract and Chitosan, in the used dose, at exposure to STIHH respectively, had cardioprotective and neuroprotective proved by results obtained from cardiac and cerebral morphometry and histopathological exam. Quercetin exerted the most beneficial cardioprotective effect in exposure to STIHH and to exposure to LTIHH, and Chitosan exerted the most beneficial neuroprotective effect at exposure to STIHH and LTIHH.

5. Cardioprotective and neuroprotective effects of the three natural AO used in the study could beneficially influence cardiac and cerebral pathology that circumscribes intermittent exposure to high altitude for short and long term.

##### **General conclusions**

1. Exposure to AHH is accompanied by a sharp increase in oxidative stress compared to exposure to HHC.

2. AO administration, in the used dose, has a strong AO effect, protecting lipids from peroxidation and proteins against carbonylation.

3. Quercetin decreased serum MDA level following exposure to AHH and CHH.

4. Continuous exposure of rats to AHH and CHH produces significant modifications of A/AO balance at the level of the brain and heart characterized by increasing serum MDA and PC levels and decreasing serum GSH, SOD and CAT activities in cerebral and cardiac homogenates.

5. AO administration: Quercetin, LBG extract and Chitosan, in the used dose, after exposure to AHH or CHH had neuroprotective and cardioprotective effects proved biochemically in tissue homogenates and through results obtained from histopathological exam.

6. iNOS activity increased significantly in rats exposed to STIHH and those exposed to LTIHH, increases being statistically significant after STIHH exposure.

7. After administration of LBG extract and quercetin, serum levels of iNOS decreased significantly after exposure to both STIHH and after exposure to LTIHH. Chitosan treatment significantly decreased the iNOS only after exposure to STIHH.

8. Exposure to STIHH is accompanied by a more marked increase in the percentage of neuronal necrosis and deterioration in the brain architecture compared with exposure to LTIHH.

9. AO administration at exposure to STIHH and respectively to LTIHH had cardioprotective and neuroprotective effects proved through results obtained at cerebral and cardiac morphometry and histopathological exam.

10. Cardioprotective and neuroprotective effects of the three natural AO used in the study could beneficially influence cardiac and cerebral pathology that circumscribes intermittent exposure to high altitude for short and long term.

## 8. Originality and innovative contributions of the thesis

The experimental research has turned to many clinical observations and /or experimental showing that acute or chronic hypoxia, ischemia is often followed by reperfusion "luxury perfusion" with the appearance of additional oxygen to induce increased production of SRON. An experimental model of induced hypobaric hypoxia simulated in a barochamber was performed, which allowed the study of nitrosative stress, and the effect of natural antioxidants. The experimental study "*in vivo*" on animal model exposed to simulated altitude in a barochamber brings objective biochemical and morphological data on the lesions appearing in hypobaric hypoxia associated with a high number of lesions. Results and conclusions of our study can be useful, not only in observation and in clinical practice but in some professions in which the aeronautical employees are exposed, climbers, bringing new arguments on some pathological mechanisms implicated in the effects of high altitude and low oxygen pressure on the organism. The experimental study brings favorable arguments in the directions of using some natural antioxidants: Quercetin, LBG extract and Chitosan with the purpose of reducing of neuronal and myocardial tissue lesions induced by exposure to hypobaric hypoxia. Although the study was performed exclusively on laboratory animals, we believe that the observations on the changed ratio of O / AO in serum and tissues as well as histopathology may be useful in human pathology in conditions which circumscribed tissue hypoxia.

## References

1. Mureșan A, Orășan R, Tache S. Stresul oxidativ în procese fiziologice și patologice. Editura Todesco, Cluj-Napoca 2006.
2. Tache S. Speciile reactive ale oxigenului și ale azotului: formarea și consecințe (cap.1). Stresul oxidativ (cap.2). În: Stresul oxidativ în bolile interne. Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca 2000;15-136.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> ed. London, Oxford University Press 1999.
4. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In Oxidative Stress, ed. SIES H. Academic Press, London 1985;1-8.
5. Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. J. Pharm. Pharmacol. 2009;61(10):1365-1374.
6. Jeong SM, Kang MJ, Choi HN, Kim JH, Kim JI. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. Nutr Res Pract. 2012;6(3):201-207.
7. Kim JH, Kang MJ, Choi HN, Jeong SM, Lee YM, Kim JI. Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. Nutr Res Pract. 2011;5(2):107-111.
8. Bakhshaeshi M, Khaki A, Fathiazad F, Khaki AA, Ghadamkheir E. Anti-oxidative role of quercetin derived from *Allium cepa* on aldehyde oxidase (OX-LDL) and hepatocytes apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat. Asian Pac J Trop Biomed. 2012;2(7):528-531.