

REZUMAT

Medicamentele uzuale au devenit insuficiente pentru tratarea peștilor. Nanoconjugatele polimerice hidrofobe și hidrofile au fost dezvoltate pentru administrarea terapeutică în scopul depășirii dezavantajelor terapiei convenționale.

Totodată, noconjugatele polimerice oferă un tratament mai eficient, iar efectele adverse ale acestora sunt reduse. Ciclodextrinele sunt polimeri naturali mai favorabili pentru a prepara sisteme conjugate de eliberare a nanoparticulelor datorită proprietăților lor fizice și chimice. Celelalte avantaje ale ciclodextrinelor sunt: pentru a spori biodisponibilitatea și stabilitatea moleculelor de medicament și a le proteja de factorii fizici, inclusiv pH-ul, temperatura și unele enzime. Acești polimeri unici au capacitatea de a forma nanoconjugate în mediu apos, în mod spontan.

Teza de doctorat intitulată “Nanoconjugate utilizate în profilaxia și tratamentul unor boli ale peștilor”, conform normelor în vigoare, este structurată în două părți, ce conține un număr de 152 pagini: partea I, sub denumirea de “Stadiul actual al cunoașterii” cuprinde un număr de 35 pagini în care sunt prezentate pe de o parte date sintetizate despre diferite patologii ale peștilor, iar apoi pe de altă parte date actuale despre ciclodextrine și emulsii și partea a II-a intitulată “Contribuții personale” în care sunt prezentate rezultatele ce s-au obținut pe parcursul perioadei doctorale.

Prima parte, “Stadiul actual al cunoașterii” este desfășurată în patru capitole și subcapitolele asociate și sunt cuprinse principalele grupe de paraziți care prezintă motive de îngrijorare atât pentru vertebrate, cât și pentru nevertebrate și indică cele mai importante publicații pentru aceste grupuri; ulterior sunt prezentate date din literatura internațională de specialitate cu privire la nanoconjugate ale ciclodextrinelor, cum se formează, structura lor și cel mai important cum formează compuși de incluziune cu anumiți principii activi. Apoi urmează descrierea metodelor de complexare cu aceste ciclodextrine precum și câteva exemple de produse farmaceutice ce conțin acești polimeri. Proiectarea creării unui nanosistem (nanoconjugat) cu ciclodextrine eficient pentru ținta administrării pe cale orală se bazează în mare măsură pe cunoașterea cerințelor clinice și a parametrilor biochimici care modifică profilul farmacocinetic al medicamentului de interes și permite o manipulare deductivă a proprietăților sale fizico-chimice pentru o livrare eficientă și o interacțiune biochimică *in vivo*. Dimensiunile particulelor, proprietățile suprafeței, greutatea moleculară, hidrofobicitatea și încărcătura particulelor au fost toate demonstrate ca proprietăți fizico-chimice importante și reglabile pentru manipularea aplicabilității clinice a nanoconjugatelor administrate pe cale orală.

În capitolul al IV-lea, care este denumit: “Tehnici și metode de studiere a caracteristicilor funcționale ale sistemelor de emulsie” se descriu noțiuni generale despre emulsii precum date actuale despre stabilitatea emulsiei, despre aspectul și morfologia emulsiei, iar în final sunt evidențiate câteva concluzii.

Partea a doua a tezei de doctorat denumită “Cercetări proprii” se desfășoară pe parcursul a opt capitole (V-XII), capitolul V este atribuit descrierii scopului, obiectivelor și activităților studiului propus, urmat de trei capitole în care sunt expuse detaliat toate părțile componente ale fiecărui studiu făcut, iar în final ultimul capitol este desigur pentru concluziile finale în care sunt redate remarcile făcute prin analiza tuturor rezultatelor obținute.

Capitolul al V-lea - “Scopul și obiectivele cercetării”. Argumentarea ce privește importanța cercetărilor ce s-au efectuat vizează câteva aspecte: găsirea unui medicament complexabil cu o ciclodextrină, obținerea unui efect terapeutic asupra unei boli parazitare ale peștilor și anume ihtioftirioza, iar în final realizarea unei compoziții emulsionate pe bază de praziquantel și florfenicol cu proprietăți antibacteriene și antiparazitare pentru tratarea peștilor bolnavi.

În România, infestațiile cu paraziți la pești au descrise într-un număr de studii preponderent în zona Deltei Dunării și mai rar în celelalte zone ale țării. Scopul acestei teze a fost cel de a evalua potențialul terapeutic al unei compoziții medicamentoase pentru ihtioftirioza ciprinidelor crescute în sistem de acvacultură în România, prin cercetări menite să contribuie la îmbunătățirea profilaxiei și combaterii infestației cu *I. multifiliis*. În acest sens, obiectivele propuse au constat în: 1) selecția unui polimer capabil să asigure transportul unui medicament antiprotozoaric; 2) alegerea principiului activ ce urmează să fie complexat cu polimerul; 3) caracterizarea complexului, 4) evaluarea unui studiu *in vitro* la diferite concentrații, și 5) stabilirea eficacității prin testare *in vivo*. Pentru aceasta, au fost realizate activități corespunzătoare obiectivelor propuse și unele cu caracter preliminar sau secundar acestora, într-o ordine logică. Activitățile îndeplinite au vizat serii de analize fizico-chimice, precum și de analize statistice.

În capitolul VI: “Patologia ihtiofaunei din sistemele de creștere intensivă” sunt descriși principalii factori care duc la apariția bolii din acvacultură, iar apoi sunt realizate două studii asupra câtorva boli parazitare de o importanță deosebită din țara noastră.

Un studiu realizat de noi s-a bazat pe diagnosticul de laborator al bolilor parazitare ale ciprinidelor (*Cyprinus carpio*) dintr-un sistem de creștere în policultură din județul Iași, pe o perioadă de șase luni. Acest studiu este o interpretare a coinfecțiilor parazitare la crap crescut în bazine de pământ, înregistrată în iarnă și primăvară (decembrie 2014 până în mai 2015) în sistem de policultură semiintensivă. S-au colectat un total de 55 crapi și s-au detectat stadiile paraziților care rezistă pe timpul iernii. Peștii au fost examinați clinic, zilnic. Diagnosticul parazitologic a fost efectuat prin examinarea microscopică a branhiilor și a raclatului dermic, de la peștii vii și proaspăt morți. Investigațiile noastre au condus la identificarea unui protozoar - *Ichthyophthirius multifiliis*, două trematode monogene - *Gyrodactylus spp.*, *Dactylogyrus spp.* și un copepod *Lernaea cyprinacea*, cu intensitate diferită în funcție de temperatura apei. A mai fost realizat un studiu de caz în care a fost descris un episod de ihtioftirioză la păstrăvul fântânel (*Salvelinus fontinalis*) crescut în bazine de ciment într-o fermă din județul Neamț. Folosind microscopia optică, paraziții au fost identificați la 100% din păstrăvii examinați, la o intensivitate de 13 trofonți/pește. Apariția acestei boli a fost o

surpriză pentru noi, deoarece apa care alimentează rezervorul provine dintr-o sursă subterană și este considerată liberă de entități parazitare. Informațiile anamnezice arată că sursa elementelor invazive (tomitele de *Ichthyophthirius multifiliis*) a fost reprezentată de pești din familia ciprinidelor (*Alburnus alburnus*) introduși ca hrană vie pentru pești.

În capitolul VII - "Sinteza și caracterizarea complexului de incluziune al β -ciclodextrinei cu diminazen aceturat" este analizat compusul complexat o ciclodextrină. Ciclodextrinele - sunt biopolimeri macrociclici cu aplicații potențiale în livrarea țintită a unor principii active micro/macro-moleculare cu efect terapeutic. În ciuda proprietății de includere puternică gazdă-oaspete, lipsa capacității de legare celulară are aplicații limitate în livrarea de medicamente. În acest demers științific s-a ales β -ciclodextrina (β -CD) pentru a forma un compus de incluziune cu diminazen aceturat (DA), care sunt niște molecule bioactive, responsabile pentru activitatea antiprotozoară. Complexul de incluziune al diminazenului aceturat cu β -ciclodextrina a fost realizat și apoi confirmat prin tehnici texturale, termogravimetrice, calorimetrice (DSC), spectroscopice (FT-IR) și microscopice (TEM-microscopie electronică cu transmisie și AFM-microscopie de forță atomică). Pe lângă aceste analize s-au mai realizat și niște analize teoretice și de modelare moleculară cu ajutorul software-ului Material Studio 4.0. Astfel, sistemul propus de incluziune β -Ciclodextrina-Diminazen Aceturat ar putea fi utilizat ca un "carrier" medicamentului specific zonei de distribuție. Acest nanoconjugat a fost obținut prin metoda liofilizării în raport echimolar de 1:1. Apoi s-au realizat o serie de caracterizări ale complexului format (nanoconjugatului), iar destinația lui a vizat studiul efectului antiparazitar asupra protozoarului *I. multifiliis* la crapul de crescătorie.

În capitolul VIII intitulat - "Studiul *in vitro* al diminazenului complexat cu β -ciclodextrina pentru *Ichthyophthirius multifiliis*" - s-a testat efectul *in vitro* al compusului complexat asupra protozoarului. Diminazenul aceturat (DA) este componentul activ a unor medicamente tripanocide utilizate pentru tratamentul animalelor infectate cu tripanosomiază și babesioză. Acesta a fost selectat pentru a forma complexul de incluziune cu β -ciclodextrină pentru a stabili efectul asupra protozoarului *I. multifiliis*. S-au stabilit pașii pentru testare, iar rezultatele au fost promițătoare.

S-au efectuat testele în apă filtrată pentru a permite excluderea automată a posibilității de inactivare parțială sau totală a substanței testate în condițiile date. Această substanță a fost considerată a fi eficientă *in vitro* prin această procedură, și mai departe s-a ajuns la concluzia că este eficient în administrarea băii sau în furajul medicamento pentru peștii infestați. S-au determinat dozele finale care au fost testate: 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5 și 0.8 ppm (mg/l) pentru substanța diminazen aceturat administrată ca atare și pentru complexul β -ciclodextrină-diminazen aceturat.

În capitolul IX, denumit "Studiile *in vivo* privind investigarea complexului beta-ciclodextrină-diminazen aceturat utilizat în tratamentul ciliatozelor".

Administrarea orală a multor agenți chimici terapeutici rămâne provocatoare datorită insolubilității gastrice și/sau disoluției slabe, permeabilității intestinale

ineficiente și inactivării pre-sistemice. Aceste probleme limitează avantajele confortului tratamentelor obișnuite pe care le oferă medicația obișnuită.

Această parte a tezei se concentrează asupra unor progrese recente și încurajatoare în aplicarea nanoconjugatelor cu β -ciclodextrina pentru administrarea orală a unor medicamente pentru ihtiofizioza peștilor. Este realizată o prezentare generală a ciclodextrinelor și nanotehnologiei farmaceutice în sistemele de administrare orală. Sunt, de asemenea, ilustrate unele strategii fiind exploatate pentru sinteza nanoconjugate puse în aplicare, precum și potențialul de navigare inteligentă a tractului gastro-intestinal (TGI) al peștelui pentru biodisponibilitatea și biodistribuția optimă.

Sunt discutate, de asemenea, perspective pentru utilizarea acestor nanoconjugate din formulările eficiente în medicamente utile din punct de vedere clinic pentru pești.

Pentru testare s-au folosit 3 loturi a câte 7 pești din specia *Cyprinus carpio*. Un lot de control, un lot căruia i s-a dat furaj medicament simplu, un lot cu furaj medicamentat cu complexul diminazen- β -ciclodextrină (DM- β -CD). Rezultatul a fost unul îmbucurător din punct de vedere terapeutic, în sensul că s-a obținut o reducere a numărului de trofonți la finalul celor 10 zile de tratament. După testare s-au realizat un set de analize biochimice la 3 pești din fiecare lot, cu diferențe nesemnificative.

Capitolul X este intitulat "Condiționarea praziquantelului și florfenicolului pentru unele coinfecții heterologice la crapul de crescătorie" și pune în discuție un nou sistem farmaceutic de emulsii cu principii activi frecvent folosiți și anume praziquantelul și florfenicolul. A fost focusată atenția către un sistem care să trateze coinfecțiile la pești deoarece mulți cercetători își îndreaptă atenția doar asupra unui singur agent patogen. O emulsie poate fi definită ca un sistem bifazic format din două lichide nemiscibile, dintre care una este dispersată fin și uniform ca globule prin cea de-a doua fază. Deoarece emulsiile sunt sisteme instabile termodinamic, un al treilea agent, emulgatorul este adăugat pentru a stabiliza sistemul. Dimensiunile lor mici conduc la proprietăți utile, cum ar fi suprafața mare pe unitate de volum, stabilitatea robustă, aspectul transparent și reologia (comportamentul fluidelor non-newtoniene) reglabilă. Emulsiile se găsesc în diverse domenii, cum ar fi livrarea de medicamente, alimente, cosmetice, farmaceutice și sinteza materialelor. În plus, ele servesc ca sisteme model pentru a înțelege dispersiile coloidale nanometrice. Metodele de înaltă și joasă energie sunt utilizate pentru a prepara emulsii, inclusiv omogenizarea la presiune înaltă, ultrasonizarea, temperatura de inversare a fazelor și punctul de inversiune a emulsiei, precum și abordările recent dezvoltate. În acest studiu, rezumăm metodele de preparare a emulsiei, teoriile pentru a prezice dimensiunea picăturilor și aditivii chimici care afectează stabilitatea picăturilor și aplicațiile recente în domeniul bolilor peștilor. S-au preparat emulsii pentru fiecare din cele două medicamente, iar ținta pentru care au fost formate acestea a fost aceea de a obține o eliberare controlată a fiecăruia din cele două principii active. Pentru caracterizare s-a efectuat metoda dynamic light scattering (DLS) care constă în

Realizarea acestor emulsii duble a dus la crearea unei propuneri pentru brevetare.

Capitolul XI denumit “Rezultate și discuții” – rezumă coroborarea tuturor observațiilor și rezultatelor din capitolele enumerate.

Ultimul capitol, capitolul XII, - “Concluzii finale” sunt selectate 13 observații concludente ale cercetărilor ce reies din teză și sunt elaborate câteva remarci după o analiză de ansamblu a datelor prezentate în capitolele anterioare. Rezultatele acestui studiu oferă unele date noi cu privire la tratamentele folosite în acvacultură, prin introducerea de noi formulări cu nanoconjugate. Observațiile făcute pe parcursul acestui studiu semnalează posibilitatea tratamentelor prin implementarea unei noi tehnici de prevenire și control al infestațiilor cu *I. multifiliis* la crapul de crescătorie (*Cyprinus carpio*).