

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„IULIU HAȚIEGANU”
CLUJ-NAPOCA
CATEDRA DE FIZIOPATOLOGIE

BĂRĂCAN C. ADRIAN

**IMPLICAȚIILE SISTEMULUI
L-ARGININĂ – OXID NITRIC ÎN PATOGENEZA
DEZECHILIBRELOR METABOLICE DIN
REAȚIA POSTAGRESIVĂ ȘI ȘOC**

REZUMATUL

TEZEI PENTRU OBȚINEREA TITLULUI DE

DOCTOR ÎN ȘTIINȚE MEDICALE

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

PROF.UNIV.DR. LUMINIȚA PLEȘCA-MANEA

- 2009 -

CUPRINS

Lista de abrevieri/ 3

Introducere/ 4

Partea I – Stadiul actual al cunoașterii/ 7

Capitolul 1. Fiziopatologia generală a reacțiilor sistemice postagresive/ 8

1.1. Componenta neuroendocrină/ 9

1.2. Componenta inflamatorie sistemică/ 10

1.2.1. Definiția sindromului de răspuns inflamator sistemic/ 10

1.2.2. Etiopatogenia generală a sindromului de răspuns inflamator sistemic/ 10

1.2.2.1. Rolul patogen al agentului infecțios/ 13

1.2.2.2. Rolul proteinelor Toll-like și activarea macrofagului/ 14

1.2.2.3. Răspunsul citokinic/ 16

1.2.2.4. Rolul polimorfismului genetic și heterogenitatea evoluției clinice/ 18

Capitolul 2. Acțiunile radicalilor liberi ai oxigenului și azotului în reacția sistemică postagresivă/ 19

2.1. Radicalii liberi ai oxigenului/ 19

2.1.1. Radicalii liberi. Formarea și acțiunile superoxidului/ 19

2.1.2. Sursele radicalilor liberi ai oxigenului/ 21

2.1.3. Acțiunea moleculară a radicalilor liberi ai oxigenului/ 23

2.1.4. Mecanisme antioxidante/ 23

2.2. Implicația oxidului nitric/ 25

2.2.1. Date generale asupra oxidului nitric/ 25

2.2.2. Sinteza oxidului nitric/ 25

2.2.3. Reactivitatea oxidului nitric/ 28

2.2.3.1. Oxidul nitric endotelial/ 29

2.2.3.2. Oxidul nitric neuronal/ 29

2.2.3.3. Oxidul nitric produs în sistem inductibil/ 30

2.3. Acțiunea radicalilor liberi de oxigen și azot în patogeneza disfuncției și a insuficienței multiorganice din cadrul sepsisului/ șocului septic/ 31

2.3.1. Disfuncția endotelială și hipercoagulopatia/ 34

2.3.2. Disfuncția mitocondrială în sepsis-mecanism central în patogeneza insuficienței multiorganice/ 34

2.3.3. Disfuncția respiratorie/ 36

2.3.4. Disfuncția miocardică/ 36

2.3.5. Disfuncția renală/ 37

Capitolul 3. Răspunsul metabolic în reacțiile sistemice postagresive/ 39

3.1. Mediatorii răspunsului metabolic/ 39

3.2. Factorii care influențează răspunsul metabolic în stres/ 39

3.2.1. Balanța energetică și oferta tisulară de oxigen/ 39

3.2.2. Rolul polimorfismului genetic/ 40

3.2.3. Statusul nutrițional anterior agresiunii sistemice majore/ 40

3.2.4. Rolul intervențiilor chirurgicale și al anesteziei/ 40

3.2.5. Agresiunea secundară iatrogenă/ 41

3.3. Semnificația fiziopatologică a răspunsului metabolic/ 41

3.4. Modificări ale metabolismului celular și intermediar/ 42

3.4.1. Modificări ale metabolismului celular/ 42

3.4.1.1. Sinteza proteinelor de șoc termic/ 42

3.4.1.2. Activarea apoptozei/ 42

3.4.1.3. Disfuncția mitocondrială/ 43

3.4.2. Sinteza proteinelor de fază acută/ 45

3.4.3. Modificări ale metabolismului intermediar/ 46

3.4.3.1. Metabolismul glucidic/ 47

3.4.3.2. Metabolismul lipidic/ 47

3.4.3.3. Metabolismul proteic/ 48

3.4.4. Strategii de corectare ale metabolismului de stres/ 48

Partea a II-a: Cercetări personale/ 49

Capitolul 4. Materiale și metode/ 50

- 4.1. Determinările biochimice/ 50
- 4.2. Determinarea numărului de leucocite/ 57
- 4.3. Teste de hemostază/ 58
- 4.4. Investigațiile histopatologice/ 59

Capitolul 5. Corelația stres nitro-oxidativ – dezechilibre metabolice – insuficiență multiorganică în reacția sistemică postagresivă prin agresiune chimică cu tetraclorură de carbon/ 61

- 5.1. Ipoteza de lucru/ 61
- 5.2. Materiale și metode/ 63
- 5.3. Rezultate/ 64
- 5.4. Discuții/ 73
- 5.5. Concluzii/ 79

Capitolul 6. Corelația stres nitro-oxidativ – dezechilibre metabolice – insuficiență multiorganică în reacția sistemică postagresivă prin arsură termică experimentală/ 81

- 6.1. Ipoteza de lucru/ 81
- 6.2. Materiale și metode/ 83
- 6.3. Rezultate/ 86
- 6.4. Discuții/ 110
- 6.5. Concluzii/ 117

Capitolul 7. Corelația stres nitro-oxidativ – dezechilibre metabolice – insuficiență multiorganică în reacția sistemică postagresivă din șocul endotoxinic/ 119

- 7.1. Ipoteza de lucru/ 119
- 7.2. Materiale și metode/ 121
- 7.3. Rezultate/ 122
- 7.4. Discuții/ 177
- 7.5. Concluzii/ 183

Capitolul 8. Concluzii generale/ 185

Bibliografie/ 189

LISTA DE ABREVIERI

L-arg – NO – calea metabolică L-arginină – oxid nitric
ARDS – sindrom de detresă respiratorie acută
CARS - sindrom de răspuns compensator antiinflamator
CCl₄ – tetraclorură de carbon
H-E – colorație hematoxină-eozină
LPS – lipopolizaharid (endotoxină)
MDA – malondialdehidă
N-ACC – N-acetilcisteină
NO – oxid nitric
ROS – radicali liberi de oxigen
RSPA – reacția sistemică postagresivă
SIRS – sindrom de răspuns inflamator sistemic

INTRODUCERE

Teoria reacției sistemice postagresive și a șocului este extrem de complexă, construindu-se pe concepte din întreaga fiziologie și fiziopatologie, de la înțelegerea funcțiilor, reglărilor și leziunilor celulare, la ansamblul funcțiilor și dezechilibrelor organelor, a sistemelor funcționale și a interacțiunilor patologice reciproce, având ca rezultat final instalarea insuficiențelor multiorganice.

Reacția sistemică postagresivă este principial monotonă, nespecifică, având un set comun de caracteristici fiziopatologice, modelate de proprietățile specifice ale agentului agresor. La acestea se asociază condițiile funcționale preexistente ale organismului victimă: rezerva funcțională a sistemelor funcționale și, din ce în ce mai bine înțeles, factorul genetic.

Reacția sistemică postagresivă cuprinde componenta neuroendocrină și inflamatorie sistemică, cu impact funcțional asupra tuturor organelor.

Componenta infecțioasă acționează fie primar, fiind trigger-ul reacției sistemice postagresive sau complică evoluția unui răspuns inflamator sistemic de origine noninfecțioasă. Astfel, infecția acționează ca o „a doua lovitură” patogenă asupra bolnavului critic traumatizat, ars, cu insuficiență hepatică acută fulminantă, pancreatită acută, ca rezultat al infecției plăgilor, căilor respiratorii în condițiile protezării acestora și a ventilației mecanice, translocației bacteriene de la nivelul tractului digestiv cu barieră mucoasă compromisă.

Aduc mulțumirile mele Conducerii Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, care mi-a permis formarea ca medic, cercetător și rezident în specialitatea ATI.

Cuvinte de mulțumire deosebite conducătorului științific, prof.dr. Luminița Pleșca-Manea, cu care avem o activitate comună de cercetare încă din anul 1999. Mulțumesc întregului colectiv al colegilor mei din Catedra de Fiziopatologie.

CAPITOLUL 1. FIZIOPATOLOGIA GENERALĂ A REACȚIILOR SISTEMICE POSTAGRESIVE

Reacția sistemică postagresivă (răspunsul organismului la stres) presupune modificări neuroendocrine și imunoinflamatorii sistemice cu impact metabolic asupra tuturor organelor. Este nespecifică, fiind declanșată de factori agresogeni extrem de diverși: trauma, arsura, infecția severă, agresiunea chirurgicală, etc. Cel mai bine a fost studiată în relație cu agresiunea chirurgicală.

Conferința de consens asupra SIRS a American College of Chest Physicians (ACCP) și a Society of Critical Care Medicine (SCCM) din anul 1991 a standardizat definițiile pentru SIRS și sepsis, în scopul încadrării riguroase în cercetare și clinică. Astfel, SIRS este o reacție inflamatorie generalizată de etiologie infecțioasă și neinfecțioasă. Se formulează diagnosticul de SIRS dacă sunt îndeplinite cel puțin două dintre următoarele patru criterii: febră ($> 38^{\circ}\text{C}$) sau hipotermie ($< 36^{\circ}\text{C}$), tahicardie (frecvența cardiacă $> 90/\text{minut}$), tahipnee (frecvența respiratorie $> 20/\text{minut}$ sau $p_{\text{aCO}_2} < 32 \text{ mmHg}$), reacția leucocitară ($> 12000/\text{mm}^3$ sau $< 4000/\text{mm}^3$ sau $> 10\%$ elemente nesegmentate).

Disbalanța dintre citokine dictează evoluția fiziopatologică : excedentul de citokine proinflamatorii generează un SIRS excesiv – patologic, iar excedentul de citokine antiinflamatorii un status de inhibiție inflamatorie – CARS.

CAPITOLUL 2. ACȚIUNILE RADICALILOR LIBERI AI OXIGENULUI ȘI AZOTULUI ÎN REACȚIA SISTEMICĂ POSTAGRESIVĂ

Oxidul nitric reacționează cu fierul feros al grupărilor hem din structura moleculelor proteice, rezultatul fiind activarea sau inactivarea funcției acestor proteine. O țintă foarte

importantă este guanilateciclaza solubilă. În urma fixării NO pe această enzimă rezultă mesagerul secund intracelular cGMP, care inițiază lanțul de evenimente moleculare al vasorelaxării NO-dependente. O altă țintă importantă o reprezintă citocrom c oxidaza (complexul IV) a lanțului transportor de electroni mitocondrial, asupra căreia exercită efect inhibitor. NO acționează limitativ asupra propriei sinteze, inhibând nitricoxidsintetazele.

Concentrațiile fiziologice ale NO sunt de ordinul nM, în aceste condiții fiind relativ slab reactiv. În cursul proceselor inflamatorii, concentrațiile NO ating valori de ordinul microM, fiind înalt reactiv. În urma reacției cu radicalii liberi ai oxigenului rezultă NO₂, N₂O₂, peroxinitritul (ONOO⁻). Acești compuși modifică structura proteinelor și lipidelor prin nitrare și nitrozilare. Reacția cu grupele tiolice conduce la formarea nitrozotiolilor.

Peroxinitritul intră în reacție cu enzimele mitocondriale, catalaza, canalele ionice, receptori și proteine de semnalizare celulară, factori de transcripție. În urma reacției cu radicalii peroxil, NO limitează peroxidarea lipidelor. Peroxinitritul inițiază direct peroxidarea lipidelor și modificarea lipoproteinelor cu densitate mică.

Există o diferență semnificativă a raportului aport/ consum de oxigen la nivel celular/ mitocondrial între șocul septic și șocurile hipovolemice și cardiogene. În șocul septic în fază hiperdinamică, aportul de oxigen la nivel tisular este crescut, dar utilizarea celulară este limitată. Această condiție fiziopatologică de incapacitate mitocondrială de utilizare a oxigenului este denumită „hipoxie citopatică”. În patogeneza hipoxiei citopatice sunt implicate: inhibarea piruvatdehidrogenazei, inhibarea citocromoxidazei sub acțiunea oxidului nitric, inhibarea enzimelor mitocondriale sub acțiunea peroxinitritului, modificarea activității enzimei PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase family, member 1) nucleare.

CAPITOLUL 3. RĂSPUNSUL METABOLIC ÎN REACȚIILE SISTEMICE POSTAGRESIVE

Modificările metabolice în cadrul fiziopatologiei agresiunilor severe sunt rezultatul restructurării funcționale celulare, secundare interacțiunilor citokinelor, hormonilor și a mediatorilor chimici ai sistemului vegetativ cu receptorii de suprafață celulară. În sepsis, un rol patogenetic major joacă interacțiunea componentelor bacteriene și a altor agenți infecțioși cu celulele sistemului monocit/ macrofag prin intermediul sistemului receptorial al proteinelor Toll. Rezultă activarea căii factorului nuclear kB (NF-kB) și inducția genelor citokinelor proinflamatorii.

Modificările hormonale și acțiunea citokinelor induc o serie de modificări ale metabolismului intermediar stadializate astfel: *faza de „ebb”* (reflux/ diminuare) – cu durată scurtă – primele 12-24 ore, caracterizată prin răspuns hipometabolic și hipotermie; hormonal se caracterizează prin insulinodeficiență asociată cu creșterea secreției hormonilor de contrareglare glicemică; *faza de „flow”* (flux) –cu durată lungă; este o etapă hipermetabolică; hormonal se caracterizează prin secreție insulinică normală sau crescută, asociată cu un nivel persistent crescut al hormonilor de contrareglare, ceea ce conduce la status catabolic. În evoluție, conduce la epuizarea stocurilor de substrat metabolic prin: creșterea degradării proteinelor structurale, lipoliză, glicogenoliză și gluconeogeneză. Creșterea fluxului hepatic de glucoză, asociată cu scăderea utilizării periferice conduce la hiperglicemie. Lipidele endogene reprezintă principalul substrat metabolic al metabolismului de stres. Catabolismul intens al proteinelor structurale conduce la un bilanț azotat negativ; *faza de recuperare* – caracterizată prin normalizarea glicemiei, normalizarea nivelurilor hormonilor de contrareglare, reabsorbția excesului de lichid interstițial în compartimentul intravascular și intensificarea diurezei. Este urmată de o fază anabolică de lungă durată, cu refacerea structurilor proteice și a depozitelor adipose.

CAPITOLUL 4. MATERIALE ȘI METODE

Experimentele s-au efectuat pe șobolani Wistar-Bratislava de sex masculin, proveniți de la Centrul de Medicină Experimentală și Aptitudini Practice al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. Structura loturilor și etapele experimentelor sunt prezentate în cadrul capitolelor 5, 6, 7.

Investigațiile de laborator au vizat dozările: nitriților/ nitraților serici, malondialdehidei serice, glicemiei, colesterolului seric total, HDL-colesterol, trigliceridelor serice, proteinelor serice totale, testul de disproteinemie cu timol, bilirubinei totale, activității serice a aspartataminotransferazei, activității serice a alaninaminotransferazei, activității serice a lactatdehidrogenazei, activității serice a fosfatazei alcaline, activității serice a gama-glutamyltranspeptidazei, creatininemiei; determinările numărului de leucocite, numărului de trombocite, timpului de protrombină, timpului de tromboplastină parțial activată (APTT).

Pentru determinări histopatologice s-au recoltat fragmente de plămân, miocard, rinichi, ficat, stomac, jejun. Fixarea s-a făcut în soluție de formaldehidă 10%. Colorațiile utilizate au fost: hematoxilină-eozină, tricrom Masson, oil red O.

CAPITOLUL 5. CORELAȚIA STRES NITROOXIDATIV – DEZECHILIBRE METABOLICE – INSUFICIENȚĂ MULTIORGANICĂ ÎN REACȚIA SISTEMICĂ POSTAGRESIVĂ PRIN AGRESIUNE CHIMICĂ CU TETRACLORURĂ DE CARBON

Tetraclorura de carbon este printre cele mai puternice hepatotoxice, în cascada metabolică și patogenetică a intoxicației induse, fiind implicați diverși radicali liberi, rezultând leziuni hepatocitare severe, precum și disfuncția multiorganică asociată: sindromul hepatorenal, sindromul hepatopulmonar, encefalopatia hepatică.

Experimentele s-au efectuat pe un număr de 16 șobolani din rasa Wistar – Bratislava, de sex masculin, cu greutatea de 140 g, care au fost repartizați în două loturi egale, corespunzătoare studiului intoxicației cu CCl₄, respectiv acțiunii L-argininei în această intoxicație.

S-a utilizat un amestec de CCl₄ (p. a.) în ulei alimentar de floarea soarelui (1 volum CCl₄ în 8 volume ulei), care a fost administrat prin gavaj – 1 ml amestec/animal/zi, timp de nouă zile. L – arginina s-a administrat în doză de 100 mg/kgcorp/zi, aceeași perioadă de timp. În ziua a 10-a a experimentului s-a recoltat sânge prin puncționarea sinusului venos retroorbital, pentru determinări biochimice și hemostatice, și fragmente de ficat pentru studiu histopatologic.

S-a constatat că intensitatea hepatocitolizei induse prin CCl₄ este mult ameliorată la animalele cărora li s-a administrat L-arginină și că parametrii de coagulare, APTT și TP, se îmbunătățesc în condițiile tratamentului cu L-arginină.

CAPITOLUL 6. CORELAȚIA STRES NITROOXIDATIV – DEZECHILIBRE METABOLICE- INSUFICIENȚĂ MULTIORGANICĂ ÎN REACȚIA SISTEMICĂ POSTAGRESIVĂ PRIN ARSURĂ TERMICĂ EXPERIMENTALĂ

Arsura termică severă și consecințele sistemice ale acestei agresiuni, reprezintă o cauză majoră de mortalitate și morbiditate. Dezechilibrele fiziopatologice includ hipovolemia severă secundară pierderii de plasmă, hipermetabolismul și disfuncția imună. Acestea conduc la declanșarea insuficiențelor multiorganice, având ca trigger răspunsul inflamator sistemic și infecția.

Ne-am propus evaluarea comparativă a producției radicalilor liberi de oxigen și oxidului nitric, precum și a impactului variației acestui raport asupra disfuncției multiorganice în cea mai agresivă traumă exercitată asupra organismului uman și animal, precum și studiul influenței ketaminei și N-acetilcisteinei asupra proceselor metabolice la șobolani arși.

Experimentele s-au efectuat pe șobolani masculi Wistar – Bratislava cu greutatea medie de aproximativ 200g. S-a obținut o arsură termică de gradele II/ III pe 30% din suprafața corporală prin imersia tegumentului ras timp de 10 secunde într-un vas cu apă la temperatura de 95°C. Loturile de animale studiate au fost:

LOTUL	FUNCȚIA LOTULUI	SUBSTANȚE ADMINISTRATE
1	MARTOR	-
2	EVALUAREA EFECTELOR KETAMINEI la 8 ore de la administrare	Ketamină 50 mg/kg i.p.
3	EVALUAREA EFECTELOR COADMINISTRĂRII KETAMINĂ - N-ACC la 8 ore	Ketamină 50 mg/kg i.p. N-ACC 200 mg/kg i.p.
4	EVALUAREA LA 8 ORE A EFECTELOR ARSURII TERMICE EFECTUATE SUB ANESTEZIE CU KETAMINĂ	Ketamină 50 mg/kg i.p.
5	EVALUAREA LA 8 ORE A EFECTELOR N-ACC ÎN ARSURA TERMICĂ EFECTUATĂ SUB ANESTEZIE CU KETAMINĂ	Ketamină 50 mg/kg i.p. N-ACC 200 mg/kg i.p.
6	EVALUAREA LA 24 ORE A EFECTELOR ARSURII TERMICE EFECTUATE SUB ANESTEZIE CU KETAMINĂ	Ketamină 50 mg/kg i.p.
7	EVALUAREA LA 24 ORE A EFECTELOR N-ACC ÎN ARSURA TERMICĂ EFECTUATĂ SUB ANESTEZIE CU KETAMINĂ	Ketamină 50 mg/kg i.p. N-ACC 200 mg/kg i.p.

La 8 și 24 h postarsură s-au prelevat probe de sânge pentru determinări biochimice, precum și fragmente de organe pentru investigații histopatologice.

Analiza trendurilor de variație ale concentrațiilor serice ale NO și MDA indică constant oscilații în opoziție: creșterea unei substanțe este asociată de scăderea celeilalte, și reciproc. Leziunile cele mai severe interesează plămânul, rinichiul și ficatul.

CAPITOLUL 7. CORELAȚIA STRES NITROOXIDATIV – DEZECHILIBRE METABOLICE – INSUFICIENȚĂ MULTIORGANICĂ ÎN REACȚIA SISTEMICĂ POSTAGRESIVĂ DIN ȘOCUL ENDOTOXINIC

Ne-am propus evaluarea influenței dozei de endotoxină și a celei de N-acetilcisteină, asupra modificărilor metabolice și a disfuncțiilor multiorganice într-un model experimental de șoc endotoxinic la șobolan. S-au evaluat parametrii de stres nitrozativ și oxidativ: metabolizii circulanți ai oxidului nitric și malondialdehida serică. Modificările metabolismului intermediar s-au studiat prin dozarea glicemiei, trigliceridemiei, colesterolemiei și a fracțiunii HDL-colesterol. Disfuncțiile multiorganice au fost evaluate prin markeri biochimici specifici și prin examinări histopatologice.

Experimentele s-au efectuat pe 133 șobolani masculi din rasa Wistar-Bratislava cu greutatea medie de aproximativ 200g, repartizați astfel: lotul martor (M) – format din 7 animale, lotul I și lotul II:

LOTUL I 63 animale LPS 1 mg/kg i.p.	21 animale	-	fiecare dintre subloturile de câte 21 animale a fost împărțit în câte 3 grupuri de câte 7 animale, cărora li s-au recoltat: sânge prin puncția sinusului retroorbital și fragmente din organele – plămân, cord, rinichi, ficat, stomac, jejun, la intervalele de timp 1 oră, 3 ore, 6 ore după inducerea endotoxemiei.
	21 animale	N-ACC 100 mg/kg i.p.	
	21 animale	N-ACC 200 mg/kg i.p.	
LOTUL II 63 animale LPS 5 mg/kg i.p.	21 animale	-	
	21 animale	N-ACC 100 mg/kg i.p.	

	21 animale	N-ACC 200 mg/kg i.p.	
--	------------	----------------------	--

Indiferent de dozele de LPS și N-ACC administrate, pe intervalul primelor 6 h de evoluție a șocului endotoxinic, variațiile markerilor de stres nitrozativ și oxidativ studiați nu se influențează reciproc. Similar agresiunii prin arsură termică, organele cu leziunile cele mai severe sunt plămânul, rinichiul și ficatul.

CAPITOLUL 8. CONCLUZII GENERALE

8.1. Intoxicația experimentală cu CCl₄ demonstrează obiectiv histopatologic, în colorație histochemică oil red O, prezența unei RSPA concretizată printr-o distrofie grasă hepatocitară precoce și deosebit de gravă.

8.2. După expunerea repetitivă, timp de mai multe zile la CCl₄, cu poartă de intrare digestivă, leziunile hepatice sunt extrem de severe, distrucției hepatocitare i se asociază inflamația severă și remanierea fibrotică a parenchimului, compatibilă unei hepatite cu gradul necroinflamator IV și fibroză stadiul II/ III, demonstrată histopatologic prin colorația tricrom Masson

8.3. La animalele cărora li s-a suplimentat aportul de L-arginină, leziunile hepatice sunt mult diminuate, fiind de hepatită gradul I și stadiul I

8.4. La animalele intoxicate cu CCl₄ și tratate cu L-arg exogenă, platforma biochimică lipidologică, proteică, glicemică și cea hemostatică surprinde o ameliorare a parametrilor, concordantă cu investigația histopatologică.

8.5. În condițiile agresiunii chimice cu CCl₄ la șobolan, suplimentarea parenterală a L-argininei conduce la creșterea semnificativă a concentrațiilor serice ale NO și MDA, mai intensă a NO

8.6. Toate investigațiile biochimice și morfologice efectuate, demonstrează efectul favorabil al suplimentării L-argininei în intoxicația cu CCl₄, RSPA fiind modulată pozitiv de NO, ce limitează hepatocitoliza și apoptoza, în timp ce ROS validează pregnant acțiunea lezională, în relație cu creșterea MDA

8.7. Spre deosebire de creșterea sinergică a NO și MDA pe modelul de intoxicație cu CCl₄, în modelul de arsură termică studiat, analiza trendurilor de variație a concentrațiilor serice ale NO și MDA, indică constant oscilații în opoziție: creșterea unei substanțe este asociată de scăderea celeilalte, și reciproc

8.8. Administrarea de N-ACC anterior inducerii arsurii termice severe, generează scăderea semnificativă a MDA și creșterea NO seric

8.9. Administrarea la șobolan a ketaminei, anestezic general de elecție în chirurgia de urgență a arsurii, crește semnificativ nivelul seric al MDA și îl reduce pe cel de NO

8.10. În raport cu animalele cărora li s-a administrat numai anestezicul, coasocierea ketamină/ N-ACC crește semnificativ nivelul seric al NO și îl reduce pe cel de MDA. Ketamina, administrată solitar, exercită efect hipoglicemiant, hipotrigliceridemiant și hipocolesterolemiant

8.11. Intensitatea distrucției tisulare, cuantificată prin activitatea serică a lactatdehidrogenazei, se accentuează în timp, paradoxal fiind mai amplă la loturile de animale cărora li s-a administrat N-ACC, demonstrând implicația majoră a stresului nitro-oxidativ

8.12. Pe modelul de arsură termică la șobolan anesteziat cu ketamină, modificările metabolismului intermediar din RSPA variază în funcție de administrarea N-ACC; afirmația ține cont permanent și de observația personală asupra efectelor trimetabolice exercitate de ketamină, care atenuază mult din intensitatea RSPA, implicit prin asocierea cu N-ACC și un efect analgezic benefic, posibil de modulare a receptorilor opioizi

8.13. Modificările metabolice, implicit ale NO și MDA sunt concordante cu aspectul histologic în colorația uzuală H-E. RSPA este mai pregnantă în pulmon, ce ia aspectul de ARDS.

8.14. Administrarea N-ACC exercită efecte favorabile, leziunile fiind mai atenuate la animalele pretratate cu această substanță, dovedind rolul patogenetic major al stresului oxidativ.

8.15. Impactul agresional sistemic al arsurii termice severe se repercutează asupra ficatului, fiind condiționat prin mecanism ischemic și inflamator. Hepatocitoliza este intensă, atât la 8 h, cât și la 24 h, creșterea ALAT fiind mai intensă decât a ASAT. În prezența N-ACC, hepatocitoliza se accentuează

8.16. Ca o concluzie generală indubitabilă, patogeneza modificărilor metabolice din cadrul RSPA a arșilor, în experimentul animalier, este guvernată cronologic de amploarea descărcării citokinice din focarul de arsură și al impactului acesteia asupra NO și ROS, cu acțiune tisulară sistemică

8.17. În modelul de șoc endotoxinic studiat, la șobolan, variația nivelurilor serice ale NO este independentă de doza de LPS administrată, LPS având, probabil, numai acțiune trigger în activarea izoenzimei iNOS. În endotoxemie, intensitatea stresului oxidativ, cuantificat prin concentrațiile serice ale MDA, comparativ cu martorii normali, este semnificativ crescută.

8.18. La animalele în șoc endotoxinic, concentrațiile serice ale NO sunt semnificativ mai crescute, în raport cu martorul. În evoluția șocului endotoxinic, se constată că în intervalul de timp studiat, după picul inițial la 1 h, nivelurile serice ale NO rămân crescute și fără variații semnificative ulterioare

8.19. Indiferent de dozele de LPS și N-ACC administrate, pe intervalul primelor 6 h de evoluție a șocului endotoxinic, variațiile markerilor de stres nitrozativ și oxidativ studiați nu se influențează reciproc

8.20. RSPA din șocul endotoxinic, modulată sau nu de N-ACC, oferă tipare de variație metabolică interesante, independente de dozele de LPS și N-ACC (creșteri semnificative ale glicemiei, trigliceridemie, cu scăderea semnificativă a HDL)

8.21. În contextul RSPA endotoximice studiate, aspectul histopatologic cel mai pregnant modificat îl oferă ficatul, rinichiul și plămânul:

- hepatocitoliza se amplifică rapid, încă din 1 h de endotoxemie, fiind demonstrată prin creșterea semnificativă a transaminazelor, mai accentuată a ASAT. Intensitatea hepatocitolizei se amplifică la 3 h și la 6 h, fiind direct proporțională cu dozele de LPS și N-ACC administrate, mecanismul fiind dependent de acțiunea lezională directă exercitată de LPS pe hepatocit și a reducerii disponibilului local de NO sub administrarea N-ACC; mecanismul este în relație cu acțiunea protectivă și antiapoptotică a dozelor mici de NO asupra acestor celule.
- reacția renală este rapidă și nespecifică, evidențiindu-se stază sanguină glomerulară și distrofie hidropică la nivelul celulelor tubulare, încă din primele 3 h. Modificările se accentuează în timp, la 6 h, constatându-se formarea cilindrilor proteici
- reacția pulmonară este rapidă după inițierea endotoxemiei, investigațiile histopatologice demonstrând arii de hiperinflație și atelectazie alveolară, instalate încă din primele 3 h de evoluție a agresiunii sistemice. Inițial, sub acțiunea directă a endotoxinei, crește marcant permeabilitatea membranei alveolo-capilare, demonstrată prin prezența edemului alveolar

8.22. Concluzia generală, desprinsă din studiul acestui model de șoc endotoxinic experimental, este că patogeneza modificărilor metabolice intermediare și celulare, determinante ale progresiunii insuficiențelor multiorganice, este dependentă de acțiunea

aditivă a endotoxinei și a citokinelor , fie directă, fie mediată de NO și ROS, precum și de modularea antioxidantă a N-ACC

8.23. Toate cele trei modele experimentale au evidențiat progresiunea RSPA la insuficiență multiorganică, probată prin testele histopatologice și evaluarea biochimică a markerilor specifici

8.24. În fiziopatologia bolnavului critic - ars, politraumatizat, intoxicat sau septic, RSPA reprezintă axul patogenetic central, modulată individual de componenta genetică, rezerva funcțională organică și de promptitudinea și eficiența terapeutică

8.25. Rezultatele cercetărilor experimentale efectuate sunt analizate în spiritul utilității în practica clinică a bolnavului critic, lucrarea dorindu-se o aplicație a fiziologiei și fiziopatologiei experimentale și clinice în practica de anestezie și terapie intensivă.

CUVINTE CHEIE: reacție sistemică postagresivă, tetraclorură de carbon, arsură, endotoxină, ketamină, oxid nitric, malondialdehidă, insuficiență multiorganică

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. (numărul 4 în teză) MOLINA P.E.: Neurobiology of the stress response-contribution of the sympathetic nervous system to the neuroimmune axis in traumatic injury, *Shock*, 2005, 24(1): 3-10
2. (numărul 17 în teză) LIN W.J., YEH W.C.: Implication of Toll-like receptor and TNF-alpha signaling in septic shock, *Shock*, 2005, 24(3): 206-209
3. (numărul 21 în teză) WIERSINGA W.J., POLL T.: The role of Toll-like receptors in sepsis. In: *J.L. VINCENT – 2006 Year Book of Intensive Care and Emergency Medicine*, Springer-Verlang, Berlin , 2006, 3-13
4. (numărul 30 în teză) ARCAROLI J., FESSLER M.B., ABRAHAM E.: Genetic polymorphism and sepsis, *Shock*, 2005, 24 (4): 300-312
5. (numărul 47 în teză) LEVY R.M., PRINCE J.M., BILLIAR T.M.: Nitric oxide – a clinical primer, *Crit Care Med*, 2005, 33 (12): 492-495
6. (numărul 51 în teză) PACHER P., BECKMAN J.S., LIAUDET L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev*, 2007, 87: 315-424
7. (numărul 73 în teză) SINGH S., EVANS T.W.: Organ dysfunction during sepsis, *Intensive Care Med*, 2006, 32: 349-360
8. (numărul 74 în teză) **BĂRĂCAN A.**, PLEȘCA-MANEA L.: Rolul oxidului nitric în hipoxia citopatică-disfuncția mitocondrială în sepsis, *Jurnal Medical Brașovean*, 2007, II(4): 9-12
9. (numărul 112 în teză) CHEONG M.A., KIM K.S., LEE G.S.: The pharmacodynamics of mivacurium in the rabbit with carbon tetrachloride – induced liver disease, *Europ J Anaest*, 2007, 24: 789-795
10. (numărul 134 în teză) ICHI I., NAKAHARA K., FUJII K., IIDA C., MIYASHITA Y., KOJO S.: Increase of ceramide in the liver and plasma after carbon tetrachloride intoxication in the rat, *J Nutr Sci Vitaminol*, 2007, 53(1): 53-56
11. (numărul 136 în teză) **BĂRĂCAN A.**: Implicațiile sistemului L-arginină-oxid nitric în patogeneza dezechilibrelor metabolice din reacția postagresivă toxică indusă de tetraclorura de carbon, *Clujul Medical*, 2007, LXXX (2): 394-398
12. (numărul 158 în teză) PARIHAR A, PARIHAR M.S., MILNER S., BHAT S.: Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury, *Burns J*, 2008, 34 (1):6-17
13. (numărul 164 în teză) GURFINKEL R., CZEIGER D., DOUVDEVANI A., SHAPIRA, et al.: Ketamine improves survival in burn injury followed by sepsis in rats, *Anesth Analg*, 2006, 103: 396-402
14. (numărul 167 în teză) **BĂRĂCAN A.**, PLEȘCA-MANEA L.: Acțiunea administrării de N-acetilcisteină asupra producției de oxid nitric și radicali liberi de oxigen în reacția postagresivă indusă prin arsură termică la șobolanii anesteziați cu ketamină ,*Clujul Medical*, 2008, LXXXI (3): 343-346
15. (numărul 195 în teză) MURCH O., COLLIN M., HINDS C.J., THIEEMERMANN C.: Lipoproteins in inflammation and sepsis, *Intensive Care Med*, 2007, 33 (1): 13-24
16. (numărul 215 în teză) LEVY R.J., DEUTSCHMAN C.S.: Evaluating myocardial depression in sepsis, *Shock*, 2004, 22 (1): 1-10

CURRICULUM VITAE

Nume și prenume: BĂRĂCAN ADRIAN

Locul și data nașterii: SIBIU, 12 iunie 1978

Stare civilă: necăsătorit

Studii liceale: BRAȘOV, 1993 – 1997. Liceul Teoretic “C. D. Nenițescu”

Studii universitare: CLUJ-NAPOCA, 1997-2003, UMF “Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină

Examen de licență: CLUJ-NAPOCA, 2003, UMF “Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină; Lucrarea de diplomă: “Implicațiile căii metabolice L-arginină – oxid nitric asupra metabolismului intermediar” – sub coordonarea prof. Dr. Luminița Pleșca -Manea, UMF Cluj-Napoca, Catedra de Fiziopatologie

Doctorand în științe medicale: 01.11.2003 – prezent, specialitatea Fiziologie Normală și Patologică, coordonator prof. Dr. Luminița Pleșca-Manea; “Implicațiile sistemului L-arginină – oxid nitric în patogeneza dezechilibrelor metabolice din reacția postagresivă și șoc”

Carierea medicală:

- *Stagiatură:* 01.01.2004 - 31.12.2004 - medic stagiar – Spitalul Clinic Județean Cluj – Napoca

- *Rezidențiat:* 01.02.2005-prezent – medic rezident Anestezie – Terapie Intensivă (prin Concurs de Rezidențiat sesiunea 19 decembrie 2004) – Cluj-Napoca

Carierea universitară:

- *Preparator universitar:* Catedra de Fiziopatologie – UMF “Iuliu Hațieganu” – Cluj-Napoca, 2005-2007

- *Asistent universitar:* Catedra de Fiziopatologie – UMF “Iuliu Hațieganu” – Cluj-Napoca, 2007-prezent

Domenii de interes științific: fiziopatologia stării critice

Apartenența la societăți științifice:

- membru al Societății Române de Fiziopatologie (afiliată la Societatea Europeană de Fiziopatologie Clinică și Experimentală), din 2007

Limbi străine cunoscute: engleză, franceză

MEMORIU DE ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

Lucrări publicate în reviste de specialitate:

1. Rolul neurokininelor în medierea inflamației: Adriana Bulboacă, D.I.Pop, **A. Bărcan**, Clujul Medical, 2007, LXXX(1): 11-16
2. Hipokalaemic tetraparesis: renal etiology elucidated by strong ion difference calculation: N. Hagău, S. Cocu, M. Mleşnițe, R. Găvrus, C. Bădescu, C. Laslo, I. Geczi-Toth, **A. Bărcan**, Jurnalul Român de ATI, 2007, 14(2)
3. Implicațiile sistemului L-arginină – oxid nitric în patogeneza dezechilibrelor metabolice din reacția postagresivă toxică indusă de tetraclorura de carbon: **A. Bărcan**, Clujul Medical, 2007, vol. LXXX (2): 394-398

4. Rolul oxidului nitric în hipoxia citopatică – disfuncția mitocondrială în sepsis– **A.Bărăcan**, L.Pleşca-Manea, Jurnal Medical Braşovean, 2007, II(4): 9-12
5. Acțiunea administrării de N-acetilcisteină asupra producției de oxid nitric și radicali liberi de oxigen în reacția postagresivă indusă prin arsură termică experimentală la șobolanii aneșteziati cu ketamină: **A. Bărăcan**, L. Pleşca-Manea, Clujul Medical, 2008, vol. LXXXI (3): 343-346

Lucrări științifice comunicate și prezentate în volume de rezumate:

- Implicațiile căii L – arginină – NO asupra metabolismului lipidic la șobolan: **A.Bărăcan**, sub coordonarea prof. Dr. Luminița Pleşca-Manea și conf. Dr. Mihai Blidaru, Rezumatele lucrărilor științifice ale studenților – Zilele UMF “ Iuliu Hațieganu “ , Cluj – Napoca, 6 – 7 decembrie 2001
- Efectele diltiazemului asupra leziunilor infarctoides produse de izoprenalină la șobolan: M. Blidaru, Luminita Pleşca-Manea, Dana Blidaru, Adriana Bulboacă, I. Pop, R. Buia, **A. Bărăcan**, Rezumatele lucrărilor științifice, Zilele UMF Cluj – Napoca, 6 – 7 decembrie 2001
- Patogeneza fibrogenezei hepatice în intoxicația experimentală cu CCl₄ la șobolan: **A.Bărăcan**, sub coordonarea prof. Dr. Luminița Pleşca – Manea și conf. Dr. Mihai Blidaru, Rezumatele lucrărilor științifice studențești, “Medicalis”- Cluj – Napoca, 26 – 28 aprilie 2002
- Acțiunea căii L-arginină – oxid nitric în patogeneza dezechilibrelor metabolice induse prin supraîncărcare alimentară glucidică și lipidică: **A. Bărăcan**, L. Pleşca-Manea, Rezumatele lucrărilor științifice – Zilele UMF “ Iuliu Hațieganu “ , Cluj – Napoca, 4 – 8 decembrie 2006
- Acțiunea administrării de N-acetilcisteină asupra producției de oxid nitric și radicali liberi de oxigen în reacția postagresivă indusă prin arsură termică la șobolan: **A. Bărăcan**, L. Pleşca-Manea, Rezumatele lucrărilor științifice – “A 6 – a ediție a Conferinței Naționale de Fiziopatologie cu Participare Internațională – Tendințe în Fiziopatologia Modernă” – Timișoara, 4 – 6 octombrie 2007
- Influența ketaminei și a N-acetilcisteinei asupra unor teste biochimice hepatice în etapa inițială - de resuscitare - a arsurii termice experimentale: **A.Bărăcan**, L.Pleşca-Manea, Rezumatele lucrărilor științifice –Zilele UMF “Iuliu Hațieganu“, Cluj-Napoca, 3-7 decembrie, 2007
- N-acetylcysteine effects on reactive oxygen species and nitric oxide production in experimental rat burn injury: L Pleşca-Manea, **A. Bărăcan**, Al X-lea Congres al Societății Române de Științe Fiziologice, Cluj-Napoca, 5-7 iunie, 2008

Paricipări la cursuri de perfecționare și reuniuni științifice:

- “Basic Life Support – Basic Trauma Life Support” – SMURD Tg. Mureș, 3-9 septembrie 2001
- “Implicațiile stresului oxidativ în patologia clinică” – Catedra de Fiziologie UMF Cluj – Napoca, 20.06.2005-21.06.2005
- Congresul Național de Farmacologie, Terapeutică și Toxicologie Clinică – ediția a VI – a , Cluj – Napoca, 2005
- “Tendințe actuale ale integrării fiziopatologiei în contextul medico – științific și educațional european” – în cadrul “ Zilele UMF “ Iuliu Hațieganu “ 5-10 decembrie 2005

- “Rolul moleculelor de adeziune în patologie” – Catedra de Fiziopatologie – UMF Cluj – Napoca, 06.02.2006-10.02.2006
- “Simpozionul româno – suedez de Anestezie – Terapie Intensivă” – Cluj- Napoca, 6-8 aprilie 2006
- “Simpozionul româno – irlandez de Anestezie – Terapie Intensivă” – Cluj-Napoca, 2-4 noiembrie 2006
- “Monitorizarea hemodinamică neinvazivă și invazivă. Corelații între parametrii hemodinamici și statusul clinic. Implicații terapeutice” – Catedra de Chirurgie I – ATI UMF Cluj-Napoca, 15.01.2007-19.01.2007
- “Primul curs internațional de ultrasonografie în practica de anestezie și terapie intensivă” – Cluj-Napoca, 11 – 12. 04. 2007
- “A 6 – a ediție a Conferinței Naționale de Fiziopatologie cu Participare Internațională – Tendințe în Fiziopatologia Modernă” – Timișoara, 4-6 octombrie 2007
- “Al 10-lea Congres al Societății Române de Științe Fiziologice” – Cluj-Napoca, 5-7 iunie, 2008

“IULIU HAȚIEGANU”
 UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
 CLUJ-NAPOCA
 DEPARTMENT OF PATHOPHYSIOLOGY

BĂRĂCAN C. ADRIAN

**THE IMPACT OF L-ARGININE – NITRIC OXIDE SYSTEM IN
 THE PATHOGENESIS OF METABOLIC DYSFUNCTIONS IN
 THE RESPONSE TO SYSTEMIC INJURY AND SHOCK**

PhD THESIS ABSTRACT

SCIENTIFIC COORDINATOR

PROF. UNIV. DR. LUMINIȚA PLEȘCA-MANEA

- 2009 -

CONTENTS

Abbreviation list/ 3

Introduction/ 4

Part I – Actual level of knowledge/ 7

Chapter 1. General pathophysiology of the reaction to systemic injury/ 8

1.1 The neuroendocrine component/ 9

1.2. The systemic inflammatory component/ 10

1.2.1. Definition of the systemic inflammatory response syndrome/ 10

1.2.2. General etiopathogeny of the systemic inflammatory response syndrome / 10

1.2.2.1. Pathogenic role of infectious agents/ 13

1.2.2.2. Toll-like proteins and macrophage activation/ 14

1.2.2.3. Cytokine response/ 16

1.2.2.4. The role of genetic polymorphisms and the heterogeneity of clinical evolution/ 18

Chapter 2. Oxygen and nitrogen free radicals actions in the response to systemic injury/ 19

2.1. Oxygen free radicals/ 19

2.1.1. Free radicals. Superoxide- synthesis and action/ 19

2.1.2. Sources of oxygen free radicals/ 21

2.1.3. Oxygen free radicals- molecular actions/ 23

2.1.4. Antioxidant mechanisms/ 23

2.2. The role of nitric oxide/ 25

2.2.1. Nitric oxide generalities/ 25

2.2.2. Nitric oxide synthesis/ 25

2.2.3. Nitric oxide reactivity/ 28

2.2.3.1. Endothelial nitric oxide/ 29

2.2.3.2. Neuronal nitric oxide/ 29

2.2.3.3. Inducible nitric oxide synthase system/ 30

2.3. The action of oxygen and nitrogen free radicals in the the pathogenesis of multiple organ failure in sepsis/septic shock/ 31

2.3.1. Endothelial dysfunction and hypercoagulation/ 34

2.3.2. Mitochondrial dysfunction in sepsis- a central mechanism in the pathogenesis of multiple organ failure/ 34

2.3.3. Respiratory dysfunction/ 36

2.3.4. Myocardial dysfunction/ 36

2.3.5. Renal dysfunction/ 37

Chapter 3. The metabolic response in reaction to systemic injury/ 39

3.1. The metabolic response mediators/ 39

3.2. Factors that influence the metabolic response in stress/ 39

3.2.1. Energy balance and oxygen delivery to tissues/ 39

3.2.2. The role of genetic polymorphisms/ 40

3.2.3. Nutritional status prior to the response to systemic injury/ 40

3.2.4. The role of surgical interventions and anesthesia/ 40

3.2.5. Iatrogenic secondary aggression/ 41

3.3. Pathophysiological value of the metabolic response/ 41

3.4. The changes in cellular and intermediary metabolism/ 42

3.4.1. The changes in cellular metabolism/ 42

3.4.1.1. Heat shock protein synthesis/ 42

3.4.1.2. Activation of apoptosis/ 42

3.4.1.3. Mitochondrial dysfunction/ 43

3.4.2. Acute phase protein synthesis/ 45

3.4.3. The changes in intermediary metabolism/ 46

3.4.3.1. Carbohydrate metabolism/ 47

3.4.3.2. Lipid metabolism/ 47

3.4.3.3. Protein metabolism/ 48

3.4.4. Stress metabolism- correction strategies/ 48

Part II: Personal research/ 49

Chapter 4. Materials and methods/ 50

- 4.1. Biochemical determinations/ 50
- 4.2. White blood cell count determination/ 57
- 4.3. Coagulation tests/ 58
- 4.4. Histopathological investigations/ 59

Chapter 5. The correlation between nitro-oxidative stress - metabolic changes - multiple organ failure in the response to carbon tetrachloride toxicity / 61

- 5.1. Work hypothesis/ 61
- 5.2. Materials and methods/ 63
- 5.3. Results/ 64
- 5.4. Discussions/ 73
- 5.5. Conclusions/ 79

Chapter 6. The correlation between nitro-oxidative stress - metabolic changes - multiple organ failure in the response to experimental thermal burn/ 81

- 6.1. Work hypothesis/ 81
- 6.2. Materials and methods/ 83
- 6.3. Results/ 86
- 6.4. Discussions/ 110
- 6.5. Conclusions/ 117

Chapter 7. The correlation between nitro-oxidative stress - metabolic changes - multiple organ failure in the response to endotoxin shock/ 119

- 7.1. Work hypothesis/ 119
- 7.2. Materials and methods/ 121
- 7.3. Results/ 122
- 7.4. Discussions/ 177
- 7.5. Conclusions/ 183

Chapter 8. General conclusions/ 185

Bibliography/ 189

ABBREVIATION LIST

L-arg – NO – L-arginine – nitric oxide pathway
ARDS – acute respiratory distress syndrome
CARS – compensatory anti-inflammatory response syndrome
CCl₄ – carbon tetrachloride
H-E – hematoxylin-eosin stain
LPS – lipopolysaccharide (endotoxin)
MDA – malondialdehyde
N-ACC – N-acetylcysteine
NO – nitric oxide
ROS – reactive oxygen species
RSI – response to systemic injury
SIRS – systemic inflammatory response syndrome

INTRODUCTION

The response to systemic injury and shock theory is extremely complex. It encompasses physiology and pathophysiology concepts, from understanding the mechanisms of cellular lesions and the functions and regulations at cellular level, to organ functionality in its entirety, the functional systems and reciprocal pathological interactions. Summed together, all these act towards the final result - multiple organ system failure.

The response to systemic injury is mainly dull, nonspecific; it is centered on a series of common pathophysiological characteristics, and it is modeled by the specific properties of the trigger. The pre-existing functional capacities of the target organism are decisive, and these are represented by the functionality of the bodily organs, and, now better understood, the genetic factor.

The response to systemic injury has a neuroendocrine component and a systemic inflammatory component, both having a functional impact on all the organs.

The infectious component may act as a trigger for the systemic injury or may complicate the evolution of a systemic inflammatory response with a non-infectious start point. In the latter case, the infection acts as a „second hit” on a critical trauma patient or a burn victim or a patient with fulminant hepatitis or acute pancreatitis. The infections may start in the wounds, the mechanical ventilated airways, or through bacterial translocation in a gut with a compromised mucosal integrity.

My thanks go to “Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy, the institution that facilitated my growth as a physician, as a researcher and as a resident in Anesthesiology and Intensive Care.

Sincere thanks to my mentor, Prof.Dr. Luminița Pleșca-Manea; our scientific activities started in 1999 and continue to present day. My thanks also go to all my colleagues in the Pathophysiology Department.

CHAPTER 1. GENERAL PATHOPHYSIOLOGY OF THE RESPONSE TO SYSTEMIC INJURY

The response to systemic injury involves neuroendocrine and systemic inflammatory changes, with a great metabolic impact on all organs. It is nonspecific and it is triggered by very diverse factors: trauma, burns, severe infection, surgery, etc. Best studied and understood is the reaction that is triggered by the surgical stress.

The 1991 conference of the American College of Chest Physicians (ACCP) and the Society of Critical Care Medicine (SCCM) on SIRS, standardized the definitions for SIRS and sepsis, for a more compelling understanding of these concepts in clinical medicine and research. Based on these definitions, SIRS is a generalized inflammatory reaction that may be caused by an infectious or a noninfectious agent. To diagnose SIRS, 2 out of the following 4 criteria must be met: fever ($> 38^{\circ}\text{C}$) or hypothermia ($< 36^{\circ}\text{C}$), tachycardia (heart rate $> 90/\text{minute}$), tachypnea (respiratory rate $> 20/\text{minute}$ or $p_{\text{a}}\text{CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$), white blood cell count ($> 12000 \text{ cells}/\text{mm}^3$ or $< 4000 \text{ cells}/\text{mm}^3$ or $> 10\%$ bands).

The lack of balance between cytokine secretion dictates the pathophysiological evolution: the proinflammatory cytokine surplus generates an excessive, pathologic SIRS, while the antiinflammatory cytokines surplus does the opposite, generating an inflammation inhibitory status, known as CARS.

CHAPTER 2. THE ACTIONS OF OXYGEN AND NITROGEN FREE RADICALS IN THE RESPONSE TO SYSTEMIC INJURY

Nitric oxid reacts with ferrous iron of the heme groups in protein molecules. The result may be the activation or the inactivation of these proteins. A target of extreme importance is

soluble guanylate cyclase. As a result of NO binding to this enzyme, cGMP is generated, which acts as a second messenger and initiates the chain reactions leading to NO-dependent vessel relaxation.

Another important target is cytochrome c oxidase (complex IV) of the respiratory chain inside the mitochondrial inner membrane. NO inhibits this enzyme. NO has a limited inhibitory action on its own synthesis, by acting on NO synthases.

The physiologic amounts of NO are expressed in nM, making NO a weak reagent. However, if an inflammation occurs, the NO concentrations reach quantities that are expressed in microM, and it becomes a very reactive chemical compound. With oxygen free radicals, it forms NO_2 , N_2O_2 , ONOO^- . All these new chemical molecules modify the structures of proteins and lipids through nitration and nitrosilation. The reaction with thiolic groups leads to the formation of nitrosothiols.

Peroxynitrite reacts with mitochondrial enzymes, catalase, ionic channels, receptors and signaling protein molecules, and with transcription factors. The reaction between NO and peroxy radicals limits lipid peroxidation. Peroxynitrite directly initiates lipid peroxidation and the modification of LDL.

There is a big difference between the cellular/ mitochondrial oxygen supply/ consumption in septic shock as compared to hypovolemic and cardiogenic shock. In the hyperdynamic phase of septic shock, the tissue oxygen supply is significantly increased, but its use by the cell is limited. Thus the mitochondria are unable to fully make use of the oxygen that is being provided. This inability is called „cytopathic hypoxia”. Amongst the events involved in the pathogenesis of this phenomenon are: pyruvate dehydrogenase inhibition, NO dependent cytochrome oxidase inhibition, peroxynitrite dependent inhibition of mitochondrial enzymes, as well as changes in the activity of PARP-1 (poly-ADP ribose polymerase family, member 1) in the nucleus.

CHAPTER 3. METABOLIC CHANGES IN THE REACTION TO SYSTEMIC INJURY

The metabolic changes that occur with severe stress are the result of functional alterations inside the cells - the result of the interaction between cytokines, hormones and autonomic neurotransmitters with the receptors located on cell membranes. In sepsis, the interaction between bacterial compounds (or other infectious agents) and monocytes or macrophages is facilitated by the Toll protein receptors. This stands at the epicenter of the pathological changes that are found in sepsis. The direct result is the activation of nuclear factor κB , followed by the induction of transcription and expression of the proinflammatory cytokines genes.

Hormonal changes in response to injury and the action of cytokines generate a series of metabolic responses, classically divided in three phases: the „ebb” phase - has a short duration (12-24 hrs), is characterized by a hypometabolic and hypothermic reaction; there is absolute insulin deficiency and an increase in the synthesis and secretion of counterregulatory hormones (catabolic state); the „flow” phase - has a long duration; it is a hypermetabolic reaction, wherein the insulin secretion returns to normal or may enhance, along with persistently high levels of counterregulatory hormones (catabolic state). Over prolonged periods, this phase leads to severe depletion of energy stores, through: increased protein breakdown, lipolysis, glycogenolysis and gluconeogenesis. The increase in hepatic glucose production and the decrease in glucose utilization results in hyperglycemia. Endogenous lipids represent the main energy stores in critical illness. Excessive protein breakdown leads to a negative nitrogen balance; lastly, the „recovery” phase is characterized by normal glycemia, normal levels of counterregulatory hormones, reabsorption of interstitial fluid in the

intravascular compartment with diuresis. This is followed by an anabolic state, during which protein and lipid stores are normalized.

CHAPTER 4. MATERIALS AND METHODS

The experiments were made on Wistar-Bratislava male rats at the Center for Experimental Medicine and Practical Abilities, at "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca. The characteristics of the groups and experimental phases are presented in chapters 5, 6, 7.

Laboratory investigations comprised the determinations of: plasmatic nitrites/ nitrates, malondialdehyde, glycemia, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, total proteins, total bilirubin, thymol dysproteinemia test, plasmatic activity of AST, ALT, LDH, alkaline phosphatase, gamma-GT, creatinine; coagulation tests: platelet count, prothrombin time, APTT; white blood cell count.

Histopathological analysis was made on tissue fragments from lung, myocardium, kidney, liver, stomach, jejunum. For fixation 10% formaldehyde was used. The sections were stained with: hematoxylin-eosin, Masson's trichrome, oil red O.

CHAPTER 5. THE CORRELATION BETWEEN NITRO-OXIDATIVE STRESS - METABOLIC CHANGES - MULTIPLE ORGAN FAILURE IN RESPONSE TO CARBON TETRACHLORIDE TOXICITY

Carbon tetrachloride is one of the most powerful hepatotoxic compounds. Through various free radicals, it is involved in multiple organ dysfunction such as: hepatorenal syndrome, hepatopulmonary syndrome, hepatic encephalopathy.

The experiments involved 16 Wistar-Bratislava male rats, with an average weight of 140 grams. These were split into two groups, both were poisoned with CCl₄, and one group was given L-arginine to study its effect in relation with CCl₄ toxicity.

CCl₄ was mixed with sunflower oil (1 in 8 volumes) and administered over 9 days, at a dosage of 1 ml mixture/rat/day. 100 mg/kg/day L-arginine was administered daily for 9 days as well. Liver tissue was obtained for histopathological analysis and blood samples from retro-orbital venous sinus were taken in day 10 of the experiment for biochemical and coagulation determinations.

It has been noted that the coagulation parameters such as APTT and PT and the CCl₄-induced hepatic cell lysis were markedly improved by concomitant administration of L-arginine.

CHAPTER 6. THE CORRELATION BETWEEN NITRO-OXIDATIVE STRESS - METABOLIC CHANGES - MULTIPLE ORGAN FAILURE IN RESPONSE TO EXPERIMENTAL THERMAL BURN

Severe thermal burn and its systemic consequences represent a major cause of mortality and morbidity. The result is dramatic hypovolemia due to plasma loss, hypermetabolism and immune dysfunction. These lead to multiple organ failure triggered by the systemic inflammatory response and infection.

We evaluated and compared the NO and oxygen free radicals synthesis, and their impact on multiple organ dysfunction in what is the most severe trauma for both human and animal. We also studied the ketamine and N-acetylcysteine influence on metabolic processes in rats suffering from burning injuries.

The experiments were made on Wistar-Bratislava male rats, with an average weight of approx. 200 grams. Grade II/III burns were obtained on 30% body surface by immersion of shaved skin in water at 95° C for 10 seconds.

Group	Function of each group	Substances administered
1	control	-
2	Study of ketamine effects at 8 hrs from administration	Ketamine 50 mg/kg i.p.
3	Study of ketamine- NACC simultaneous administration at 8 hrs.	Ketamine 50 mg/kg i.p. N-ACC 200 mg/kg i.p.
4	Study of thermal burn effects under ketamine anesthesia – at 8 hrs	Ketamine 50 mg/kg i.p.
5	Study of N-ACC effects in thermal burn under ketamine anesthesia- at 8 hrs	Ketamine 50 mg/kg i.p. N-ACC 200 mg/kg i.p.
6	Study of thermal burn effects under ketamine anesthesia- at 24 hrs	Ketamine 50 mg/kg i.p.
7	Study of N-ACC effects in thermal burn under ketamine anesthesia – at 24 hrs	Ketamine 50 mg/kg i.p. N-ACC 200 mg/kg i.p.

Tissue samples were obtained and used for histopathological investigations. Blood samples were obtained at 8 and 24 hrs following thermal burns, and used for biochemical determinations.

NO and MDA blood concentrations vary in opposite direction: increase of one is associated with decrease of the other. The most severe lesions were in the lung, kidney and liver.

CHAPTER 7. THE CORRELATION BETWEEN NITRO-OXIDATIVE STRESS - METABOLIC CHANGES - MULTIPLE ORGAN FAILURE IN RESPONSE TO SYSTEMIC INJURY IN ENDOTOXINIC SHOCK

We studied the endotoxin and N-ACC influences on metabolic processes and multiple organ dysfunction in an experimentally induced endotoxinic shock in rats. The circulating metabolites of NO and malondialdehyde were determined, along with triglycerides, glycemia, total cholesterol and HDL-cholesterol. Multiple organ dysfunctions were analyzed through specific biochemical and histopathological analysis.

The experiments were made on 133 Wistar-Bratislava male rats, with an average weight of approx. 200 grams, divided in three groups: 7 rats in group the control group, and groups I and II of 63 animals each.

group I 63 animals LPS 1 mg/ kg i.p.	21 animals	-	Each of the 21 animal groups was divided into 3 subgroups of 7 animals each; blood samples were obtained from the retro-orbital sinus, as well as tissue samples from the lung, heart, kidney, liver, stomach, jejunum, at various time intervals following endotoxin administration, i.e. 1 h, 3 hrs, 6 hrs.
	21 animals	N-ACC 100 mg/kg i.p.	
	21 animals	N-ACC 200 mg/kg i.p.	
group II 63 animals LPS 5 mg/kg i.p.	21 animals	-	
	21 animals	N-ACC 100 mg/kg i.p.	
	21 animals	N-ACC 200 mg/kg i.p.	

During the first 6 hrs of endotoxinic shock, and independent of LPS and N-ACC dosages, the concentration of different oxidative and nitrosative stress markers do not influence each other. Similar to what was observed in thermal burn injury, the organs most affected were the lung, the kidney and the liver.

CHAPTER 8. GENERAL CONCLUSIONS

8.1. The CCl₄ experimental poisoning results in a RSI characterized by a precocious and extremely severe hepatic fat dystrophy, as demonstrated histopathologically using oil red O stain.

8.2. On repetitive exposure to CCl₄ (over multiple days), with a digestive port of entry, the hepatic lesions are extremely severe, and hepatic destruction associates a dramatic inflammation and parenchymal fibrosis, corresponding to grade IV necroinflammatory hepatitis, stadium II/III fibrosis, as demonstrated on tissue samples stained with Masson's trichrome.

8.3. Concomitant administration of L-arginine results in much less severe lesions of grade I and stadium II hepatitis.

8.4. Animals poisoned with CCl₄ and treated with exogenous L-arginine show an improved biochemical panel (lipids, proteins, glycemia, coagulation parameters), concordant with the histopathological results.

8.5. L-arginine given parenterally to CCl₄ poisoned rats, leads to a significant increase in plasmatic levels of NO and MDA (with a higher concentration of NO).

8.6. All biochemical and morphological investigations demonstrate the favorable action of L-arginine in CCl₄ poisoning; the RSI is positively influenced by NO.

8.7. As opposed to the synergistic increase in NO and MDA in case of CCl₄ poisoning, in thermal burn NO and MDA concentrations vary in opposite directions, thus the increase of NO associates the decrease in MDA and vice versa.

8.8. Administration of N-ACC before severe thermal burn injury leads to a significant decrease in MDA concentration along with an increase in NO.

8.9. Administration of ketamine (the anesthetic of choice in emergency surgery of burns) significantly increases MDA and reduces NO seric levels.

8.10. As compared to the effects of administration of anesthetic only, the association of ketamine/N-ACC significantly increases blood levels of NO and decreases blood levels of MDA. Ketamine, administered by itself, has a hypoglycemic effect and decreases the levels of triglycerides and of cholesterol.

8.11. The intensity of tissue destruction, biochemically evaluated by the plasma level of LDH, increases with time. Paradoxically, it is more pronounced in groups that have been administered N-ACC, thus showing the major role of nitro-oxidative stress.

8.12. In thermal burn under ketamine anesthesia, the metabolic changes that occur with the RSI varies with the administration of N-ACC; this statement takes into account personal observations on the effects of ketamine on the three major metabolisms; it significantly decreases the intensity of the systemic response (also when associated with N-ACC); ketamine has analgesic properties, most likely through its action at opioid receptors.

8.13. The metabolic changes involving NO and MDA are concordant with the hematoxylin-eosin stained tissue samples histological features. The reaction to systemic injury is more obvious in the lung, where it appears as ARDS.

8.14. The administration of N-ACC has favorable effects; the lesions are less when animals are pre-treated with this substance, thus demonstrating the major pathogenic role of oxidative stress.

8.15. The severe thermal burn injury impact is extremely pronounced in the liver, where both ischemic and inflammatory mechanisms are involved. At 8 hrs and at 24 hrs, the hepatocyte lysis is intense, and the increase of ALT tops that of AST. The lysis is even more intense when associated with N-ACC administration.

8.16. As a general truth, the metabolic changes in the RSI that is triggered by burns, are governed in a chronological order by the amount of cytokine synthesis from the burnt tissue and its impact on NO and oxygen free radicals synthesis, followed by the systemic reaction.

8.17. In the case of induced endotoxin shock, the variation of NO levels is not dependent on LPS dosage; thus LPS has most likely only a trigger action on the activation of iNOS enzyme. In endotoxemia, the intensity of oxidative stress, as quantified by the plasmatic concentration of MDA, is significantly increased, when compared to controls.

8.18. In endotoxin shock, the plasmatic concentrations of NO are significantly increased, as compared to controls. In its evolution, after the initial peak at 1hr, the NO blood levels remain high with no significant latter variations.

8.19. Independent of the administered dosages of LPS and N-ACC, over the first 6 hrs of evolution of the endotoxin shock, the variations in the levels of markers of nitrosative and oxidative stress levels do not influence each other.

8.20. The RSI in endotoxin shock, whether or not controlled by N-ACC, offers interesting metabolic changes patterns, which are independent of LPS and N-ACC dosages (significant increases in glycemia, triglycerides, along with a significant decrease in HDL)

8.21. In endotoxin shock, the most involved organs are the liver, the kidney and the lung, as demonstrated histologically.

- in the liver, cellular lysis amplifies rapidly, beginning with the first hour following the induction of endotoxemia; it results in a significant increase in transaminases, mainly AST. The lysis then attain higher levels at 3 and 6 hrs, directly proportional to LPS and N-ACC doses- LPS has a direct toxic effect on hepatocytes, while N-ACC decreases the local availability of NO. NO in small quantities has a protective, antiapoptotic action on liver cells.
- in the kidney, the processes are fast and nonspecific. In the first 3 hrs, there is blood stasis at the glomerular level, and hydropic dystrophy in the tubular cells. All these changes increase over time, and so, at 6 hrs, protein casts form.
- in the lung, the effects take place rapidly. In the first 3 hrs, areas of hyperinflation and alveolar atelectasis appear, as demonstrated histopathologically. Initially, under the direct action of endotoxin, the permeability of alveolar-capillary membrane dramatically increases, leading to alveolar edema.

8.22. As a general conclusion, in endotoxin shock, the pathogenesis of metabolic changes is dependent on the combined actions of endotoxin and cytokines, and eventually multiple organ failure ensues. These compounds may have a direct action or the effects may be mediated by NO and ROS, as well as by N-ACC, with antioxidant properties.

8.23. Our three experimental models have shown the progression of the RSI to multiple organ system failure, as demonstrated histopathologically and biochemically.

8.24. In critically ill patients- polytrauma, burns, intoxications, infections, the response to systemic injury represents the central pathogenic event. The outcome also depends on the genetic component, the functional reserves and the therapeutic promptness and efficacy.

8.25. The results of our research in experimental physiology and pathophysiology may have applicability in clinical medicine of critically ill patients - anesthesia and intensive care.

Key words: response to systemic injury, carbon tetrachloride, burn, endotoxin, ketamine, nitric oxide, malondialdehyde, multiple organ failure.

SELECTIVE BIBLIOGRAPHY

17. (number 4 in thesis) MOLINA P.E.: Neurobiology of the stress response-contribution of the sympathetic nervous system to the neuroimmune axis in traumatic injury, *Shock*, 2005, 24(1): 3-10
18. (number 17 in thesis) LIN W.J., YEH W.C.: Implication of Toll-like receptor and TNF-alpha signaling in septic shock, *Shock*, 2005, 24(3): 206-209
19. (number 21 in thesis) WIERSINGA W.J., POLL T.: The role of Toll-like receptors in sepsis. In: *J.L. VINCENT – 2006 Year Book of Intensive Care and Emergency Medicine*, Springer-Verlang, Berlin , 2006, 3-13
20. (number 30 in thesis) ARCAROLI J., FESSLER M.B., ABRAHAM E.: Genetic polymorphism and sepsis, *Shock*, 2005, 24 (4): 300-312
21. (number 47 in thesis) LEVY R.M., PRINCE J.M., BILLIAR T.M.: Nitric oxide – a clinical primer, *Crit Care Med*, 2005, 33 (12): 492-495
22. (number 51 in thesis) PACHER P., BECKMAN J.S., LIAUDET L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev*, 2007, 87: 315-424
23. (number 73 in thesis) SINGH S., EVANS T.W.: Organ dysfunction during sepsis, *Intensive Care Med*, 2006, 32: 349-360
24. (number 74 in thesis) BĂRĂCAN A., PLEȘCA-MANEA L.: Rolul oxidului nitric în hipoxia citopatică-disfuncția mitocondrială în sepsis, *Jurnal Medical Brașovean*, 2007, II(4): 9-12
25. (number 112 in thesis) CHEONG M.A., KIM K.S., LEE G.S.: The pharmacodynamics of mivacurium in the rabbit with carbon tetrachloride – induced liver disease, *Europ J Anaest*, 2007, 24: 789-795
26. (number 134 in thesis) ICHI I., NAKAHARA K., FUJII K., IIDA C., MIYASHITA Y., KOJO S.: Increase of ceramide in the liver and plasma after carbon tetrachloride intoxication in the rat, *J Nutr Sci Vitaminol*, 2007, 53(1): 53-56
27. (number 136 in thesis) BĂRĂCAN A.: Implicațiile sistemului L-arginină-oxid nitric în patogeneza dezechilibrelor metabolice din reacția postagresivă toxică indusă de tetraclorura de carbon, *Clujul Medical*, 2007, LXXX (2): 394-398
28. (number 158 in thesis) PARIHAR A, PARIHAR M.S., MILNER S., BHAT S.: Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury, *Burns J*, 2008, 34 (1):6-17
29. (number 164 in thesis) GURFINKEL R., CZEIGER D., DOUVDEVANI A., SHAPIRA, et al.: Ketamine improves survival in burn injury followed by sepsis in rats, *Anesth Analg*, 2006, 103: 396-402
30. (number 167 in thesis) BĂRĂCAN A., PLEȘCA-MANEA L.: Acțiunea administrării de N-acetilcisteină asupra producției de oxid nitric și radicali liberi de oxigen în reacția postagresivă indusă prin arsură termică la șobolanii anesteziați cu ketamină ,*Clujul Medical*, 2008, LXXXI (3): 343-346
31. (number 195 in thesis) MURCH O., COLLIN M., HINDS C.J., THIEEMERMANN C.: Lipoproteins in inflammation and sepsis, *Intensive Care Med*, 2007, 33 (1): 13-24
32. (number 215 in thesis) LEVY R.J., DEUTSCHMAN C.S.: Evaluating myocardial depression in sepsis, *Shock*, 2004, 22 (1): 1-10

CURRICULUM VITAE

Name and surname: ADRIAN BĂRĂCAN

Place of birth and date of birth: SIBIU, June 12, 1978

Marital status: single

Education:

High school: BRAȘOV, 1993 – 1997 “C. D. Nenițescu” High school.

University: CLUJ-NAPOCA, 1997-2003, “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Faculty of General Medicine.

Licensure examination: CLUJ-NAPOCA, 2003, “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Faculty of General Medicine; Graduation thesis: “The impact of L-arginine – NO pathway

on intermediary metabolism” – scientific coordinator: Prof. Dr. Luminița Pleșca -Manea, Department of Pathophysiology.

Doctoral studies: November 01, 2003 – present, Normal and Pathological Physiology, scientific coordinator: Prof. Dr. Luminița Pleșca-Manea; “Implicațiile sistemului L-arginină – oxid nitric în patogeneza dezechilibrelor metabolice din reacția postagresivă și șoc”

Membership in Honorary/ Professional societies:

- 2007- present: member of the Romanian Society of Pathophysiology (affiliation: The European Association of Clinical and Experimental Pathophysiology)

Medical career:

- *Internship:* January 01, 2004 - December 31, 2004 – Cluj-Napoca County Clinical Hospital
- *Residency:* February 01, 2005 - present – Anesthesiology and Intensive Care (national residency examination session: December 19, 2004) – Cluj-Napoca

Academic career:

- Instructor in Pathophysiology: *Department of Pathophysiology* - “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, 2005-2007
- Assistant professor: *Department of Pathophysiology* - “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, 2007-present

Special scientific interest: critical illness pathophysiology

Foreign languages: English, French

Scientific activities:

Publications in specialty journals:

1. Rolul neurokininelor în medierea inflamației: Adriana Bulboacă, D.I.Pop, **A. Bărăcan**, Clujul Medical, 2007, LXXX(1): 11-16
2. Hipokalaemic tetraparesis: renal etiology elucidated by strong ion difference calculation: N. Hagău, S. Cocu, M. Mleşnițe, R. Găvruş, C. Bădescu, C. Laslo, I. Geczi-Toth, **A. Bărăcan**, Romanian Journal of Anesthesiology and Intensive care, 14(2)
3. Implicațiile sistemului L-arginină – oxid nitric în patogeneza dezechilibrelor metabolice din reacția postagresivă toxică indusă de tetraclorura de carbon: **A. Bărăcan**, Clujul Medical, 2007, vol. LXXX (2): 394-398
4. Rolul oxidului nitric în hipoxia citopatică – disfuncția mitocondrială în sepsis– **A.Bărăcan**, L.Pleşca-Manea, Jurnal Medical Braşovean, 2007, II(4): 9-12
5. Acțiunea administrării de N-acetilcisteină asupra producției de oxid nitric și radicali liberi de oxigen în reacția postagresivă indusă prin arsură termică experimentală la șobolanii anesteziati cu ketamină: **A. Bărăcan**, L. Pleșca-Manea, Clujul Medical, 2008, vol. LXXXI (3): 343-346

Scientific topics presented at meetings:

- Implicațiile căii L-arginină- NO asupra metabolismul lipidic la șobolan: **A. Bărăcan**, coordinators: Prof. Dr. Luminița Pleșca-Manea and Conf. Dr. Mihai Blidaru, Students’

- Efectele diltiazemului asupra leziunilor infarctoides produse de izoprenalină la șobolan: M. Blidaru, Luminița Pleșca-Manea, Dana Blidaru, Adriana Bulboacă, I. Pop, R. Buia, **A. Bărăcan**, “Iuliu Hațieganu” University Days, Cluj – Napoca, December 6 & 7, 2001
- Patogeneza fibrogenezei hepatice în intoxicația experimentală cu CCl₄ la șobolan: **A. Bărăcan**, coordinator: Prof. Dr. Luminița Pleșca – Manea and Conf. Dr. Mihai Blidaru, “Medicalis”- Cluj – Napoca, April 26 - 28, 2002
- Acțiunea căii L-arginină – oxid nitric în patogeneza dezechilibrelor metabolice induse prin supraîncărcare alimentară glucidică și lipidică: **A. Bărăcan**, L. Pleșca-Manea, “Iuliu Hațieganu” University Days, Cluj – Napoca, December 4 – 8, 2006
- Acțiunea administrării de N-acetilcisteină asupra producției de oxid nitric și radicali liberi de oxigen în reacția postagresivă indusă prin arsură termică la șobolan: **A. Bărăcan**, L. Pleșca-Manea, The 6th Conference of Romanian Society For Pathophysiology - with international participation: “Tendencies In Modern Pathophysiology” – Timișoara, October 4 – 6, 2007
- Influența ketaminei și a N-acetilcisteinei asupra unor teste biochimice hepatice în etapa inițială - de resuscitare - a arsurii termice experimentale: **A. Bărăcan**, L. Pleșca-Manea, “Iuliu Hațieganu” University Days, Cluj – Napoca, Cluj-Napoca, December 3-7, 2007
- N-acetylcysteine effects on reactive oxygen species and nitric oxide production in experimental burn injury in rats: L. Pleșca-Manea, **A. Bărăcan**, The 10th Congress of the Romanian Society for Physiological Sciences, Cluj-Napoca, June 5-7, 2008