

ACADEMIA ROMANA
Institutul de Chimie Macromoleculară
“Petru Poni”

Tehnici RMN în studiul biofluidelor

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific,
Acad. Bogdan C. Simionescu

Doctorand,
Ing. Alina Elena Nicolescu

Iași

– 2016 –



Academia Română
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași



Nr. 1285/1 TV 2016

Domnului/Doamnei.....

Vă facem cunoscut că în ziua de **25 aprilie 2016**, ora **12:00**, în biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat **“Tehnici RMN în studiul biofluidelor”**, autor inginer chimist **Alina Elena Nicolescu**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

PREȘEDINTE **Dr. Anton Airinei**, Director al Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC **Acad. Bogdan C. Simionescu**, Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

REFERENȚI **Prof. Sorin Roșca**, Universitatea „Politehnica” din București, Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor

Dr. Emilian Georgescu, Cercetător Științific gradul I, Centrul de Cercetări Oltchim din Râmnicu Vâlcea

Dr. Călin Deleanu, Cercetător Științific gradul I, Centrul de Chimie Organică „C. D. Nenițescu” din București

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica în scris aprecierile și observațiile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Director,

Anton Airinei
Dr. Anton Airinei



CUPRINS

Cuvinte cheie	1
Introducere	2
Partea 1. Studiu de literatură.	
Capitolul 1. Tehnici și aplicații biomedicale ale spectroscopiei RMN	3
Partea 2. Rezultate originale.	
Capitolul 2. Markerii RMN urinari în studiul și diagnosticul bolilor metabolice rare	4
Capitolul 3. Aplicații ale spectroscopiei RMN în studiul diabetului	5
Capitolul 4. Contribuții ale spectroscopiei RMN în analiza lichidului cefalorahidian și a lichidului amniotic	6
Capitolul 5. Tehnici de atribuire a semnalelor și factori care influențează amprenta spectrală RMN a biofluidelor	7
Capitolul 6. Aplicații ale spectroscopiei ¹⁵ N RMN în caracterizarea structurală a metaboliților și compușilor biologici activi	8
Capitolul 7. Partea experimentală	9
Capitolul 8. Concluzii generale	9
Capitolul 9. Diseminarea rezultatelor	10
Capitolul 10. Bibliografie selectivă	12

CUVINTE CHEIE

- Spectroscopie RMN
- Metaboliți
- Markerii
- Boli metabolice rare
- Diabet
- Urină
- Lichid cefalorahidian
- Lichid amniotic
- Aminoacizi
- Acizi organici
- Amine
- Aminoxizi
- Pirolobenzimidazoli
- Pirolochinoline

“Why just NMR? – Because there is hardly another technique that is so informative for so many different types of applications, and because there is no other technique that provides so much fun”.

Prof. Richard R. Ernst,
ETH Zurich, Nobel Laureate 1991.

Introducere

Scopul principal al tezei de doctorat este *dezvoltarea unor metode de diagnostic medical bazate pe spectroscopie RMN*, pentru patologii în care diagnosticul clasic este foarte greu de obținut sau pentru care metodele clasice furnizează informații limitate.

Obiectivele specifice sunt următoarele:

- Furnizarea diagnosticului medical de utilitate imediată pentru medicul curant în diverse cazuri de boli metabolice rare.
- Obținerea de informații relevante pentru înțelegerea mecanismului diabetului și identificarea unor markeri utili pentru diagnosticul precoce al acestei patologii.
- Explorarea potențialului spectroscopiei RMN în studiul unor biofluide mai greu accesibile (lichid cefalorahidian și lichid amniotic).
- Avansarea cunoașterii în domeniul aplicațiilor biomedicale ale spectroscopiei RMN și publicarea rezultatelor în reviste de specialitate.
- Realizarea unei baze de date privind parametrii spectrali RMN ai principalilor metaboliți și studiul influenței condițiilor experimentale asupra profilului spectral al fluidelor biologice.
- Explorarea potențialului spectroscopiei ^{15}N RMN în studiul unor metaboliți și compuși biologic activi.

PARTEA 1

CAPITOLUL 1. STUDIU DE LITERATURĂ

Teza cuprinde o trecere în revistă a principalelor tipuri de secvențe de pulsuri folosite în spectroscopia RMN atât din perspectivă istorică, cât și al utilității și informațiilor generate de spectrele uni- și bidimensionale corespunzătoare . De asemenea se discută cei mai importanți parametri din cadrul secvențelor de pulsuri (pulsuri de radiofrecvență, decuplări, perioade de relaxare, timpi de achiziție) și influența acestora asupra evoluției magnetizării probei.

Un alt subcapitol al studiului de literatură prezintă o descriere a principalelor biofluide din organism. Se discută compoziția, funcțiile acestora, metode de păstrare și stabilitatea probelor și se trec în revistă studiile RMN anterioare privind potențialul aplicațiilor biomedicale al spectroscopiei RMN.

PARTEA 2

CAPITOLUL 2. MARKERI RMN URINARI ÎN STUDIUL ȘI DIAGNOSTICUL BOLILOR METABOLICE RARE

În acest capitol sunt prezentate rezultatele unor studii privind diagnosticarea prin spectroscopie RMN a bolilor rare metabolice, cunoscute sub denumirea generală de erori înnăscute de metabolism (Inborn Errors of Metabolism – IEM). Rezultatele au fost obținute în urma analizei unor probe de urină provenite de la copii diagnosticați cu diverse erori înnăscute de metabolism.

Scopul urmărit a fost stabilirea diagnosticului și evaluarea potențialului tehnicilor RMN în studierea profilului metabolic indus de aceste boli. Acest lucru a fost realizat prin parcurgerea următoarelor direcții de studiu:

1. Identificarea unor markeri metabolici urinari pentru o serie de boli metabolice rare.
2. Diagnosticarea unor cazuri de boli metabolice rare.
3. Monitorizarea evoluției unor cazuri de aciduri organice, sub influența tratamentului specific, prin cuantificarea markerilor selectați.

Avantajul major al spectroscopiei RMN este obținerea „amprente metabolice globale” a probei, spre deosebire de metodele clasice de analiză, care folosesc kituri sau tehnici speciale, destinate unui număr restrâns de metaboliți (preselectarea markerilor). Această caracteristică devine importantă în studiul erorilor înnăscute de metabolism deoarece oferă acces la o plajă foarte mare de metaboliți, care ulterior pot fi asociați cu diverse defecte metabolice. Prin metodele clasice, dacă nu este preselectat markerul specific erorii înnăscute de metabolism, rezultatul este negativ și nu apar suspiciuni în acest sens. Folosind tehnicile RMN, deoarece nu este necesară preselectarea unor markeri, chiar dacă proba nu conține markerii suspectați pentru o anumită eroare metabolică, în cazul unei alte boli metabolice, profilul spectral apare schimbat. În acest fel, deși rezultatul este în mod corect negativ pentru markerul suspectat, rezultatul global nu este fals negativ în raport cu starea de sănătate.

Concluzii

1. Au fost diagnosticate 18 cazuri de pacienți cu boli metabolice rare prin spectroscopie RMN. Spectroscopia RMN a fost primul diagnostic în 3 cazuri, iar diagnosticul furnizat prin spectroscopie RMN a fost confirmat ulterior prin teste clasice în străinătate la toate cazurile studiate.

2. Am arătat că în unele cazuri, dacă este aplicat un tratament intuitiv pentru boli metabolice (bazat doar pe suspiciune, fără diagnostic cert), acest lucru poate masca markerii

specificali principali, ducând ulterior la diagnostice fals negative. Un astfel de caz a fost prezentat pentru galactozemie, când pacientul nu a putut fi diagnosticat prin testele clasice, dar spectroscopia RMN a permis diagnosticarea corectă. Un alt caz în care lipsea markerul principal, a permis monitorizarea corectă prin RMN pe baza unui marker secundar.

3. Spectroscopia RMN a permis o monitorizare unică în România a cazurilor de boli metabolice rare studiate. Monitorizarea constantă prin spectroscopie RMN a cazurilor de boli metabolice rare a evidențiat familiile care nu respectă și pe cele care respectă tratamentele și dietele specifice prescrise de medic. Nerespectarea cu strictețe a tratamentelor și dietelor specifice bolilor metabolice rare produce efecte cumulative ireversibile, extrem de grave, culminând cu decesul pacientului.

4. Majoritatea cazurilor suspecte care au ajuns în laboratorul RMN au provenit de la copii cu vârste între 1 și 3 ani.

5. Pentru unul dintre cazurile monitorizate a fost acordat sprijin și la respectarea tratamentului prescris prin verificarea calității laptelui administrat pacientului.

6. Rezultatele obținute până în prezent au fost prezentate parțial la manifestări științifice sub forma unei conferințe, a 4 comunicări orale și 8 postere.

CAPITOLUL 3. APLICAȚII ALE SPECTROSCOPIEI RMN ÎN STUDIUL DIABETULUI

Diabetul este o boală metabolică cronică caracterizată prin creșterea concentrație de glucoză în sânge. Există două tipuri de diabet – diabet tip I (întâlnit preponderent la copii și adolescenți, acesta necesită administrare de insulină) și diabet tip II (întâlnit la adulții peste 30 de ani, acesta se caracterizează prin rezistență la insulină și hiperglicemie). Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS/WHO), în anul 2014, incidența diabetului era de 9% din populația globală adultă (cu vârsta mai mare de 18 ani). Potrivit aceleași surse, până în 2030, diabetul va deveni a 7-a cauză de deces la nivel global.

Metodele standardizate de monitorizare a persoanelor care suferă de diabet se bazează pe determinarea concentrației de glucoză în sânge.

Metodologia folosită în acest studiu a implicat două abordări paralele:

1. Determinarea concentrațiilor individuale ale unor metaboliți identificați în spectrele RMN ale probelor de urină.

2. Prelucrarea statistică a amprentei spectrale RMN.

Concluzii

1. S-a arătat că studiul probelor de urină prin spectroscopie ^1H RMN este deosebit de util pentru monitorizarea proceselor metabolice asociate diabetului tip I și a funcției renale. O parte dintre metaboliții care pot fi cuantificați prin spectroscopie RMN nu pot fi analizați prin alte metode clasice folosite uzual în clinică.

2. Rezultatele obținute în prezentul studiu, contribuie la întărirea ipotezei că creșterea concentrației metaboliților menționați mai sus este caracteristică pentru diabetul tip I prin alterarea unor căi metabolice sau a funcției renale.

3. Au fost identificați și a fost determinat sensul de evoluție cantitativă a unor markeri RMN din probele de urină, asociați diabetului de tip I (rezultatele obținute fiind comentate și puse în contextul cunoștințelor actuale privind procesele biochimice asociate patologiei studiate).

4. Pentru acest studiu au fost prelucrate, analizate RMN, procesate, transformate în format numeric (X/Y), analizate statistic și interpretate spectre provenind de la 172 probe de urină care se constituie în baze de date de referință ce pot fi folosite pentru alte studii care implică spectre RMN ale probelor de urină înregistrate la 400 MHz.

5. A fost dezvoltat un model de discriminare a subiecților în grupele diabetic/normal prin prelucrarea statistică a anvelopei spectrale RMN (fără a face apel la testul clasic de glucoză).

6. A fost realizată o corelare clară a concentrațiilor unor metaboliți între loturile de subiecți implicate în acest studiu și date de literatură ale unor subiecți din zone geografice foarte diferite.

7. Rezultatele cercetărilor au fost publicate parțial în 2 articole ISI și prezentate la manifestări științifice sub forma a 2 comunicări orale și 3 postere.

CAPITOLUL 4. CONTRIBUȚII ALE SPECTROSCOPIEI RMN ÎN ANALIZA LICHIDULUI CEFALORAHIDIAN ȘI A LICHIDULUI AMNIOTIC

În acest capitol sunt prezentate rezultatele obținute în urma analizării prin spectroscopie RMN a două fluide biologice: lichid cefalorahidian (LCR) și lichid amniotic. Scopul urmărit a fost evaluarea potențialului tehnicilor RMN în studierea profilului metabolic caracteristic acestor două fluide. Acest lucru a fost realizat prin două direcții de studiu:

1. Identificarea și cuantificarea unor metaboliți prezenți în lichidul cefalorahidian canin.
2. Identificarea și cuantificarea unor metaboliți prezenți în lichidul amniotic uman.

Concluzii

1. Rezultatele prezentate în acest capitol se constituie în date de referință privind concentrațiile unor metaboliți la persoane normale în biofluide foarte greu accesibile. Aceste date pot fi folosite pentru comparație cu valori patologice (pentru care există mai multe date de literatură disponibile decât pentru probele normale).

2. Valorile obținute au fost de același ordin de mărime cu puținele date existente în literatură ceea ce confirmă corectitudinea rezultatelor și permite folosirea acestora în corelație cu datele existente pentru a crește semnificația statistică a acestora.

3. Rezultatele obținute în acest capitol au fost publicate parțial într-un articol ISI și prezentate la manifestări științifice sub forma unui poster.

CAPITOLUL 5. TEHNICI DE ATRIBUIRE A SEMNALELOR ȘI FACTORI CARE INFLUENȚEAZĂ AMPRENTA SPECTRALĂ RMN A BIOFLUIDELOR

Spectrele RMN ale fluidelor biologice sunt foarte complexe, conținând zeci de semnale cu intensități și forme diferite, multe dintre ele fiind suprapuse. În aceste condiții, interpretarea unui astfel de spectru este foarte dificilă. Această complexitate este dată de numărul mare de metaboliți și de variația compoziției biochimice.

În analiza probelor biologice, fiecare etapă, de la recoltarea probei până la obținerea spectrului RMN, trebuie să fie atent pregătită și perfect reproductibilă pentru întreg lotul de probe din cadrul studiului. Pentru a obține rezultate cât mai reproductibile și fără erori, este necesară identificarea factorilor care ar putea influența profilul RMN al probei biologice. Profilul poate fi influențat de o multitudine de factori. Factorii de natură biologică (vârsta, alimentația, sexul, medicația, etc.) sunt mai greu de controlat, dar cei de natură tehnică (manipularea probei până la analiza RMN, parametrii folosiți în analiză, etc) pot fi standardizați, cel puțin la nivelul laboratorului care analizează astfel de probe.

Având în vedere aspectele menționate anterior, în acest capitol sunt prezentate următoarele direcții de studiu:

1. Crearea bazei de date spectrale cu metaboliți analizați în această teză. Informațiile obținute prin realizarea acestei baze de date au fost ulterior folosite în confirmarea atribuțiilor din studiile de caz incluse în Capitolele 2-4.
2. Descrierea modului de atribuire a semnalelor în spectrele ^1H RMN ale fluidelor biologice.
3. Studiarea influenței unor analgezice uzuale asupra profilului spectral al probelor de urină.

4. Studiarea influenței pH-ului asupra profilului spectral al probelor de urină.

Concluzii

1. A fost realizată o bază de date spectrală pentru 60 de metaboliți individuali constituită din mai multe tipuri de spectre RMN uni și bidimensionale în soluție apoasă.

2. A fost realizat un studiu amplu privind influența pH-ului asupra semnalelor unor metaboliți.

3. A fost studiată modificarea amprentei spectrale RMN a probelor de urină după administrarea unor analgezice.

4. Au fost identificați o serie de metaboliți ai aspirinei și paracetamolului în spectrele RMN ale probelor de urină și a fost studiat timpul cât persistă aceștia în organism după administrarea unei doze terapeutice.

5. Rezultatele din acest capitol au fost folosite în sprijinul studiilor prezentate în capitolele 2-4.

6. O parte din rezultate au fost publicate parțial în 3 articole de specialitate (un articol ISI și 2 articole BDI+) și prezentate sub forma unui poster la o manifestare științifică.

CAPITOLUL 6. APLICAȚII ALE SPECTROSCOPIEI ^{15}N RMN ÎN CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A METABOLIȚILOR ȘI COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI

În acest capitol sunt prezentate aspectele tehnice care influențează observarea prin spectroscopie RMN a nucleilor de azot, la abundența sa naturală. Pe cât este de dificilă observarea prin RMN a acestui nucleu, pe atât este de interesant potențialul acestei tehnici pentru științele biomedicale, motiv pentru care subiectul a fost abordat în cadrul tezei de doctorat. Utilitatea analizării acestui nucleu este exemplificată pe câteva clase de compuși cu activitate biologică.

Concluzii

1. Au fost obținute date privind deplasarea chimică a nucleului ^{15}N pentru un număr mare de compuși de importanță biologică (metaboliți și compuși cu activitate biologică).

2. Datele ^{15}N RMN au fost obținute prin tehnici bidimensionale cu detecție indirectă care au fost optimizate pentru fiecare caz în parte.

3. A fost studiată influența *N*-oxidării asupra deplasării chimice a nucleului ^{15}N la o serie de amine. *N*-oxidarea este un proces de importanță mare în reacțiile biochimice.

4. Rezultatele obținute au contribuit la elucidarea unor mecanisme de reacție în sinteza pirolbenzimidazolilor și a pirolchinoxalinelor.

5. Rezultatele au fost publicate parțial în 8 articole 3 postere.

CAPITOLUL 7. PARTEA EXPERIMENTALĂ

Acest capitol discută în detaliu modul de manipulare și păstrare a probelor până la momentul analizei, modul de pregătire a probelor pentru analiza RMN, condițiile experimentale pentru înregistrarea spectrelor RMN, precum și parametrii importanți folosiți în cadrul secvențelor de pulsuri.

CAPITOLUL 8. CONCLUZII GENERALE

1. Au fost diagnosticate prin spectroscopie RMN 18 cazuri de boli metabolice rare la copii și nou-născuți, iar acest lucru a fost de importanță vitală pentru pacienți și medicii curanți.

2. Diagnosticul bolilor metabolice furnizat prin spectroscopie RMN a fost confirmat ulterior prin teste clasice în străinătate la toate cazurile studiate.

3. Spectroscopia RMN a permis o monitorizare unică în România a cazurilor de boli metabolice rare studiate.

4. A fost realizat un studiu comparativ la pacienți cu diabet de tip I și un grup de control și au fost obținute corelații și tendințe de modificare a concentrațiilor pentru o serie de metaboliți în afara celui clasic (glucoza).

5. A fost realizat un model statistic care permite diagnosticarea prin RMN a pacienților cu diabet tip II, fără a face apel la markerul glucoză, cu o precizie de peste 80%. (Dacă se include markerul glucoză în model precizia este de 100%).

6. A fost realizată o corelație a concentrațiilor unor metaboliți urinari determinați prin spectroscopie RMN la grupuri din România comparativ cu date de literatură provenind de la populații din alte țări situate la distanță geografică mare.

7. A fost realizat un studiu RMN al probelor de lichid cefalorahidian la câini și s-a arătat că datele obținute pot fi extrapolate la pacienți umani, pentru care este foarte dificil de obținut probe de lichid cefalorahidian de la persoane sănătoase. Datele sunt utile pentru studiul tulburărilor sistemului nervos central.

8. Au fost studiate prin RMN probe de lichid amniotic și au fost obținute valori pentru concentrațiile unor metaboliți din acest fluid pentru care există puține date de literatură.

9. A fost realizată o bază de date cu spectre $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ RMN uni și bidimensionale pentru un număr mare de metaboliți care s-a dovedit foarte utilă în atribuirea semnalelor din biofluidele studiate.

10. A fost studiată influența pH-ului asupra spectrelor RMN ale unor metaboliți de interes.

11. A fost studiată prin RMN metabolizarea aspirinei și paracetamolului în organismul uman.

12. A fost realizat un studiu amplu privind detecția nucleului ^{15}N prin spectroscopie RMN la abundență naturală pentru o serie de metaboliți și compuși cu activitate biologică.

CAPITOLUL 9. DISEMINAREA REZULTATELOR

Rezultatele obținute în cadrul stagiului de doctorat au fost parțial publicate în 14 articole cu referenți din care 12 articole ISI (factor de impact cumulativ 17,388) și 2 articole BDI+.

Rezultatele au făcut subiectul a 28 prezentări la manifestări științifice, dintre care: 2 conferințe, 10 comunicări orale și 16 postere.

Articole publicate cu subiectul tezei de doctorat:

1. E. Georgescu, **A. Nicolescu**, F. Georgescu, F. Teodorescu, S. Shova, A. T. Marinoiu, F. Dumitrascu, C. Deleanu, "Fine tuning the outcome of 1,3-dipolar cycloaddition reactions of benzimidazolium ylides to activated alkynes", *Tetrahedron*, **2016**, 1-14, publicat online. (F.I. **2,641**).

2. E. Georgescu, **A. Nicolescu**, F. Georgescu, S. Shova, B. C. Simionescu, C. Deleanu, "Contributions to synthesis of pyrrolo[1,2-*a*]benzimidazole derivatives via 1,3-dipolar cycloaddition reactions", *Rev. Roum. Chim.*, **2016**, acceptat. (F.I. **0,311**).

3. G. L. Ailiesei, M. Ciobanu, M. Balan, C. Stavarache, L. Barbes, **A. Nicolescu**, C. Deleanu, "NMR detected metabolites in complex natural fluids. Quinic acid in apple juice", *Ovidius Univ. Annals Chem.*, **2015**, 26 (2), 51-56. (Indexată BDI+).

4. E. Georgescu, **A. Nicolescu**, F. Georgescu, S. Shova, F. Teodorescu, A.-M. Macsim, C. Deleanu, "Novel one-pot multicomponent strategy for the synthesis of pyrrolo[1,2-*a*]benzimidazole and pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives", *Synthesis*, **2015**, 47, 1643-1655. (F.I. **2,689**).

5. **A. Nicolescu**, C. Deleanu, E. Georgescu, F. Georgescu, A.-M. Iurascu, S. Shova., P. Filip, “Unexpected formation of pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives during the multicomponent synthesis of pyrrolo[1,2-*a*]benzimidazoles”, *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, 1486-1488. (F.I. **2,379**).
6. M. Musteata, **A. Nicolescu**, G. Solcan, C. Deleanu, “The ^1H NMR profile of healthy dog cerebrospinal fluid”, *Plos One*, **2013**, *8* (12), e81192, 1-7. (F.I. **3.234**).
7. **A. Nicolescu**, N. Simionescu, L. Ursu, C. Deleanu, B. C. Simionescu, “The effect of therapeutic doses of paracetamol and aspirin on the NMR profile of urine at 400 MHz”, *Rev. Roum. Chim.*, **2012**, *57* (7-8), 653-658. (F.I. **0,311**).
8. **A. Nicolescu**, B. Dolenko, T. Bezabeh, L.-I. Stefan, C. Ciurtin, E. Kovacs, I.C.P. Smith, B. C. Simionescu, C. Deleanu, “Diagnosis of type II diabetes based on non-glucose regions of ^1H NMR spectra of urine A metabonomic approach”, *Rev. Chim. (Bucharest)*, **2011**, *62* (12), 1150-1153. (F.I. **0,810**).
9. L.-I. Stefan, **A. Nicolescu**, S. Popa, M. Mota, E. Kovacs, C. Deleanu, “ ^1H -NMR urine metabolic profiling in type 1 diabetes mellitus”, *Rev. Roum. Chim.*, **2010**, *55* (11-12), 1033-1037. (F.I. **0,311**).
10. E. Georgescu, F. Georgescu, M. R. Caira, **A. Nicolescu**, C. Deleanu, M. G. Danila, P. Filip, F. Dumitrascu, “A new synthesis of pyrrolo[1,2-*c*]quinazoline from quinazolinium *N*-ylides: a re-investigation”, *Arkivoc*, **2009**, (xii), 232-241. (F.I. **1,165**).
11. F. Potmischil, M. Marinescu, **A. Nicolescu**, C. Deleanu, “Hydroacridines: ^1H and ^{13}C NMR spectra of 9-substituted 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroacridines and of their *N*-oxides”, *Magn. Reson. Chem.*, **2009**, *47*, 1031-1035. (F.I. **1,179**).
12. F. Potmischil, M. Marinescu, **A. Nicolescu**, C. Deleanu, M. Hillebrand, “Hydroacridines: ^{15}N NMR chemical shifts of 9-substituted 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroacridines and their *N*-oxides – Taft, Swain–Lupton, and other types of linear correlations”, *Magn. Reson. Chem.*, **2008**, *46*, 1141-1147. (F.I. **1,179**).
13. **A. Nicolescu**, C. Deleanu, “Identification of metabolites in complex natural fluids by NMR. The use of various NMR techniques for the detection of alanine in grapefruit”, *J. Colloid Surface Chem.*, **2008**, *8* (1), 53-62. (Indexata BDI+).
14. F. Potmischil, H. Duddeck, **A. Nicolescu**, C. Deleanu, “Saturated amine oxides. Hydroacridines: Effects of *N*-oxidation and of *N*-quaternization on the ^{15}N NMR chemical shifts of *N*-methylpiperidine-derived mono-, bi-, and tricycloaliphatic tertiary amines”, *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, *45*, 231-235. (F.I. **1,179**).

CAPITOLUL 10. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] R.W.E. Watts, T.M. Cocs, „The inborn errors of metabolism: general aspects”, in Oxford Textbook of Medicine (5th edn.) D.A. Warrell, T.M. Cox, J.D. Firth (Editors), Oxford University Press, 2016.
- [2] A.A. Derek, J.R. Toone, R.B. Lowry, *Pediatrics*, **2000**, *105*, e10.
- [3] X. Huang, L. Yang, F. Tong, R. Yang, Z. Zhao, *BMC Pediatr.*, **2012**, *12* (1), 18.
- [4] S. Sanderson, A. Green, M.A. Preece, H. Burton, *Arch. Dis. Child.*, **2006**, *91*, 896.
- [5] G.F. Hoffmann, J. Zschocke, W.L. Nyhan (Eds.), „Inherited Metabolic Diseases - A Clinical Approach”, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010.
- [6] Z. Pan, H. Gu, N. Talaty, H. Chen, N. Shanaiah, B.E. Hainline, R.G. Cooks, D. Raftery, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *387*, 539-549.
- [7] Geigy Scientific Tables, vol.1, p.86.
- [8] S. Kolker, E. Christensen, J.V. Leonard, C.R. Greenberg, A.B. Burlina, A.P. Burlina, M. Dixon, M. Duran, S.I. Goodman, D.M. Koeller, E. Muller, E.R. Naughten, E. Neumaier-Probst, J.G. Okun, M. Kyllerman, R.A. Surtees, B. Wilcken, G.F. Hoffmann, P. Burgard, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2007**, *30*, 5-22.
- [9] S. Bijarnia, V. Wiley, K. Carpenter, J. Christodoulou, C.J. Ellaway, B. Wilcken, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2008**, *31*, 503-507.
- [10] T. Roe, W. G. Ng, „Disorders of carbohydrate and glycogen metabolism”, in N. Blau, M. Duran, M. E. Blaskovics, (eds.), Physician’s guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases, Chapman and Hall, London, 1996. Cap. p 277.
- [11] F.M. van der Kloet, F.W.A. Tempels, N. Ismail, R. van der Heijden, P.T. Kasper, M. Rojas-Cherto, R. van Doorn, G. Spijksma, M. Koek, J. van der Greef, V.P. Mäkinen, C. Forsblom, H. Holthofer, P.H. Groop, T.H. Reijmers, T. Hankemeier, *Metabolomics*, **2012**, *8*, 109-119.
- [13] S.C. Connor, M.K. Hansen, A. Corner, R.F. Smithd, T.E. Ryanz, *Mol. BioSyst.*, **2010**, *6*, 909-921.
- [14] K. Suhre, *J. Endocrinol.*, **2014**, *221*, R75-R85.
- [15] K. Færch, K.A. Hulmán, T.P.J. Solomon, *Current Diabetes Reviews*, **2016**, *12* (1), 30-41.
- [16] M.E. Bollard, E.G. Stanley, J.C. Lindon, J.K. Nicholson, E. Holmes, *NMR Biomed.*, **2005**, *18*, 143.
- [17] M. Assfalg, I. Bertini, D. Colangiuli, C. Luchinat, H. Schäfer, B. Schütz, M. Spraul, *PNAS*, **2008**, *105*, 1420.
- [18] C.M. Slupsky, K.N. Rankin, J. Wagner, H. Fu, D. Chang, A.M. Weljie, E.J. Saude, B. Lix, D.J. Adamko, S. Shah, R. Greiner, B.D. Sykes, T.J. Marrie, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 6995.
- [19] M. van Doorn, J. Vogels, A. Tas, E.J. van Hoogdalem, J. Burggraaf, A. Cohen, J. van der Greef, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2006**, *63*, (5), 562-574.
- [20] N. Friedrich, K. Budde, K. Suhre, U. Volker, U. John, S.B. Felix, H.K. Kroemer, H.J. Grabe, H. Volzke, M. Nauck, H. Wallaschofski, *Metabolomics*, **2015**, (11), 1405-1415.
- [21] J.R. Bales, D.P. Higham, I. Howe, J.K. Nicholson, P.J. Sadler, *Clin. Chem.*, **1984**, *30*, 426-432.
- [22] J.K. Nicholson, M.P. O’Flynn, P.J. Sadler, A.F. MacLeod, S.M. Juul, P.H. Sonksen, *Biochem. J.*, **1984**, *217*, 365-375.
- [23] ACCORD Study Group, *New Eng. J. Med.*, **2008**, *358*, 2545-2559.
- [24] M.P. Stoop, L. Coulier, T. Rosenling, S. Shi, A.M. Smolinska, L. Buydens, K. Ampt, C. Stingl, A. Dane, B. Muilwijk, R.L. Luitwieler, P.A.E. Sillevius Smitt, R.Q. Hintzen, R. Bischoff, S.S. Wijmenga, T. Hankemeier, A. J. van Gool, T.M. Luider, *Molec. Cell. Proteomics*, **2010**, *9*, 2063-2075.
- [25] M. Pugliese, J.L. Carrasco, C. Andrade, E. Mas, J. Mascort, et al., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **2005**, *29*, 603-610.
- [26] H. Satoh, O. Yamato, T. Asano, M. Yonemura, T. Yamauchi, et al., *Brain Res.*, **2007**, *1133*, 200-208.
- [27] J.R. Sheedy, P.R. Ebeling, P.R. Gooley, M.J. McConville, *Anal. Biochem.*, **2010**, *398*, 263-265.
- [28] T.N. Kolokolova, O.Yu. Savel’ev, N.M. Sergeev, O.A. Shpigun, K.V. Sokolov, V.I. Skvortsova, *J. Anal. Chem.*, **2010**, *65* (10), 1073-1081.
- [29] G. Gracia, I.F. Duarte, A.S. Barros, B.J. Goodfellow, S.O. Diaz, J. Pinto, I.M. Carreira, E. Galhano, C. Pita, A.M. Gil, *J. Proteom. Res.*, **2010**, *9*, 6016-6024.
- [30] L.G. Rasmussen, F. Savorani, T.M. Larsen, L.O. Dragsted, A. Astrup, S.B. Engelsen, *Metabolomics*, **2011**, *7*, 71-83.