
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Efectul protector al antioxidanților naturali în afecțiunile sistemului urinar

Doctorand **Mara Aurori**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Sanda Andrei**



INTRODUCERE

Afecțiunile sistemului urinar reprezintă tulburări ale funcției renale și tractului urinar inferior. Printre cel mai frecvent diagnosticate afecțiuni sunt injuria renală acută (IRA) și infecția urinară. Nefrotoxicitatea este una dintre principalele cauze de inducere a IRA. Stresul oxidativ reprezintă un element cheie al nefrotoxicității. Strategiile de combatere a IRA induse de medicamente sunt în prezent limitate. În ceea ce privește infecția bacteriană, numeroase antibiotice sunt prescrise pentru tratarea acesteia. Utilizarea în exces a antibioticelor favorizează creșterea rezistenței antimicrobiene, fiind clasificată ca o problemă majoră de sănătate publică.

Recent, se consideră că alimentația joacă un rol crucial în sănătate. Există un interes deosebit în a duce un mod de viață sănătos, prin consumul de alimente și plante bogate în fitonutrienți. În ultimul timp, un interes deosebit a fost acordat fructelor de *Cornus mas*, pentru care studii recente sugerează că dețin un mare potențial în aplicabilitatea lor în medicina alternativă. Cu toate acestea, multe fructe rămân neglijate datorită gustului dezagreabil perceput de consumatori, în ciuda bogăției lor în fitonutrienți. Printre aceste fructe se numără și *Sorbus aucuparia*, care recent a demonstrat a fi o sursă valoroasă de compuși fitochimici cu diverse proprietăți biologice. Așadar, cercetarea și integrarea acestor fructe în strategiile de cultivare, cât și în cele de consum, ar putea duce la îmbunătățiri considerabile ale sănătății umane și animale.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată "*Efectul protector al antioxidanților naturali în afecțiunile sistemului urinar*" este structurată în două părți principale, și anume: **Partea I – Stadiul actual al cunoașterii**, respectiv **Partea a II-a – Contribuția personală**.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Partea I este alcătuită din 7 capitole și redă o sinteză a informațiilor de actualitate cu privire la patologiile sistemului urinar, în special injuria renală acută și infecția bacteriană a tractului urinar inferior, stresul oxidativ și implicarea acestuia în dezvoltarea afecțiunilor sistemului urinar, rolul antioxidanților naturali în combaterea acestor afecțiuni, și date generale despre *Cornus mas*, respectiv *Sorbus aucuparia*, două plante medicinale cu potențiale efecte benefice în diverse patologii.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea a II-a cuprinde 9 capitole unde sunt prezentate ipoteza de lucru și obiectivele principale ale cercetării, materialele și metodele utilizate în vederea atingerii obiectivelor propuse, rezultatele obținute, discuțiile, concluziile și recomandările, precum și elementele de originalitate ale tezei.

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE PRINCIPALE ALE TEZEI

Tratamentele eficiente în IRA sunt încă deficitare, deoarece inflamația, dezechilibrele și stresul oxidativ sunt profund implicate în fiziopatologia IRA. Plantele medicinale ar putea reprezenta o alternativă terapeutică eficientă în combaterea stresului oxidativ implicat în afectarea renală.

Deși au fost depuse eforturi considerabile în crearea de noi antibiotice care să combată infecțiile microbiene, rezistența antimicrobiană este în continuare raportată. Astfel, este necesară descoperirea unor strategii terapeutice alternative în vederea evitării dezvoltării a noilor rezistențe care nu ar mai putea fi combătute.

Un remediu natural care ar putea contribui la tratarea afecțiunilor sistemului urinar este *Cornus mas*. În trecut, fructele de *Cornus mas* au fost utilizate în tratamentul diverselor afecțiuni, printre care se numără și infecțiile bacteriene și bolile renale. Aceste fructe au fost făcut centrul unor studii actuale, care au demonstrat că posedă multiple activități biologice, dintre care cea mai importantă este efectul antioxidant.

Sorbus aucuparia este o altă plantă medicinală, fructul căreia a fost des folosit în trecut pentru a vindeca o varietate de boli. Activitățile biologice ale *Sorbus aucuparia* au fost puțin studiate, dar activitatea antioxidantă a fost identificată ca o componentă cheie.

Având în vedere aceste aspecte, **scopul** major al acestei teze a fost evaluarea compușilor biologic activi din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia*, prin diverse studii *in vitro* și *in vivo*, în vederea stabilirii efectelor antioxidante, nefroprotectoare și antimicrobiene în patologiile sistemului urinar.

Pentru a îndeplini scopul stabilit, **obiectivele** principale au fost structurate astfel:

1. Caracterizarea profilului compușilor fitochimici obținuți din extracte de fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* și evaluarea *in vitro* a efectului antioxidant;
2. Evaluarea *in vitro* a efectului antimicrobian al extractelor hidro-alcoolice obținute din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* asupra unor tulpini bacteriene de referință;
3. Investigarea *in vitro* a efectului antimicrobian al extractelor hidro-alcoolice obținute din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* asupra agenților patogeni rezistenți izolați din urina animalelor de companie diagnosticate cu infecții ale tractului urinar inferior, în corelație cu prevalența infecțiilor urinare la câini și pisici;
4. Evaluarea *in vitro* a potențialului efect citoprotector al extractelor obținute din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* asupra unor linii celulare renale primare stresate cu gentamicină;
5. Investigarea *in vivo* a potențialului efect nefroprotector și antioxidant al extractelor obținute din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* într-un model experimental de nefrotoxicitate acută indusă de gentamicină.

STUDIILE CERCETĂRII

1. Determinarea profilului compușilor biologic activi și evaluarea *in vitro* a efectului antioxidant al extractelor obținute din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia*

Obiectivele studiului:

- Obținerea extractelor hidro-alcoolice din fructe de *Cornus mas*, respectiv extracte hidro-alcoolice și de carotenoide din fructe de *Sorbus aucuparia*;
- Determinarea conținutului de polifenoli totali, flavonoide totale și carotenoide totale din extractele de fructe, prin metode spectrofotometrice;
- Separarea și identificarea compușilor fenolici din extractele de fructe prin analiza cromatografică HPLC-DAD-ESI-MS;
- Evaluarea *in vitro* a activității antioxidante a extractelor de fructe prin metoda de inactivare a radicalilor (DPPH) și metoda de reducere a ionilor ferici (FRAP).

Rezultatele studiului:

- **Conținutul de polifenoli, flavonoide și carotenoide totale**

Tabel 1

Compoziția fitochimică a extractelor de cercetat

Extract analizat	Polifenoli totali mg GAE/mL	Flavonoide totale μg QE/mL	Carotenoide totale μg/g DM
<i>Cornus mas</i>	0.872 ± 0.003	139.14 ± 2.100	3.8 ± 0.0002
<i>Sorbus aucuparia</i>	1.393 ± 0.046	537.58 ± 3.255	95.68 ± 0.297

- **Identificarea compușilor fenolici prin analiza HPLC-DAD-ESI-MS**

În fructele de *Cornus mas* au fost identificați 13 compuși aparținând la patru subclase diferite: **acizi fenolici** – acidul galic, acidul clorogenic și acidul cafeic; **antociani** – Cy 3-O-cumaroil-glucozida, Cy 3-O-galactozida, Cy 3-O-robinobiozida, Pg 3-O-galactozida și Pg 3-O-robinobiozida; **iridoizi** – loganina și swerozidul; **flavonoli** – rutina, K 3-O-galactozida și un dimer procianidin.

Cea mai mare concentrație de GAE a fost găsită în acidul galic (248.51 μg/mL), urmat de dimerul procianidinei (195.82 μg/mL) și loganină (111.47 μg/mL).

În fructele de *Sorbus aucuparia* au fost descoperiți zece compuși din trei subclase distincte: **acizi fenolici** – acidul galic, acidul clorogenic, acidul neoclorogenic, acidul criptoclorogenic și acidul ferulic; **flavonoli** – Q 3,4'-O-diglucozida, Q 3-O-glucozida și Q 3-O-rutinozida; **antociani** – Cy 3-O-(cafeoil-glucozida) și Cy 3-O-glucozida. Cea mai mare valoare a GAE a fost identificată în acidul clorogenic (704.792 μg/mL), urmat de acidul neoclorogenic (376.610 μg/mL).

➤ **Activitatea antioxidantă**

Tabel 2

Activitatea antioxidantă a extractelor de cercetat

Extract analizat	DPPH (IC ₅₀ mg/mL)	FRAP (μM TE/mL)
<i>Cornus mas</i> *	0.466 ± 0.835	23.09 ± 0.610
<i>Sorbus aucuparia</i> **	24.51 ± 0.577	0.016 ± 1.047

2. Studii *in vitro* privind efectul antimicrobian al extractelor obținute din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* asupra tulpinilor bacteriene de referință

Obiectivele studiului:

- Obținerea extractelor hidro-alcoolice din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia*;
- Determinarea efectului antimicrobian *in vitro* al extractelor de cercetat prin intermediul metodei difuzimetrice în agar și metodei microdiluțiilor în bulion, asupra a șase tulpini bacteriene de referință.

Rezultatele studiului:

Ambele extracte au prezentat o activitate antimicrobiană împotriva tuturor tulpinilor bacteriene testate. În cazul fructelor de *Cornus mas*, cel mai mare efect a fost înregistrat față de *E. faecalis* și *Ps. Aeruginosa* (22.33 ± 0.47 mm). *Sorbus aucuparia* a arătat o eficacitate semnificativă împotriva *E. coli* (25.67 ± 0.47 mm) și *E. faecalis* (25.67 ± 0.94 mm). În ceea ce privește indicele CMI, s-a constatat că ambele extracte prezintă activitate bactericidă împotriva tuturor tulpinilor bacteriene testate (CMB/CMI ≤ 4).

Acesta este primul studiu care examinează activitatea antimicrobiană a extractului de fructe de *Cornus mas* împotriva MRSA, care poate fi de un interes deosebit pentru cercetările viitoare privind rezistența antimicrobiană. Zona de inhibiție a extractului împotriva *Ps. aeruginosa* din acest studiu a avut cel mai mare diametru dintre toate datele publicate, întărind caracteristicile antimicrobiene ale acestor fructe.

Cu toate acestea, extractul de *Sorbus aucuparia* a demonstrat un efect antimicrobian mai puternic asupra acestor tulpini în comparație cu extractul de *Cornus mas*.

Tabel 3

Activitatea antimicrobiană a extractelor de cercetat prin metoda microdiluțiilor în bulion

Tulpini bacteriene	Indice CMI					
	MSSA	MRSA	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Cornus mas</i>	1 0.02/0.02	1 0.02/0.02	1 0.02/0.02	2 0.04/0.02	2 0.04/0.02	1 0.32/0.32
<i>Sorbus aucuparia</i>	1 0.04/0.04	1 0.04/0.04	1 0.09/0.09	1 0.04/0.04	1 0.19/0.19	1 0.38/0.38

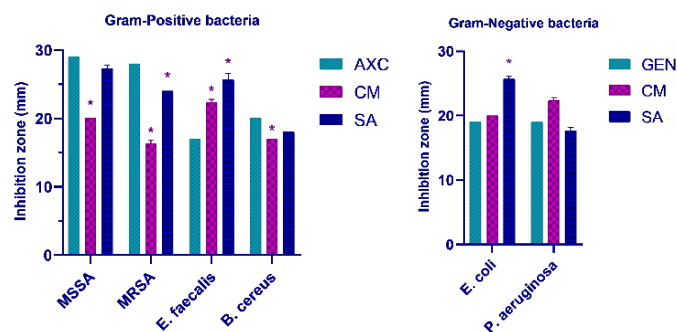


Fig. 1 Activitatea antimicrobiană a extractelor de cercetat prin metoda difuzimetrică

3. Studii *in vitro* privind efectul antimicrobian al extractelor obținute din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* asupra izolatelor clinice de la animalele de companie

Obiectivele studiului:

- Obținerea extractelor hidro-alcoolice din fructele de cercetat
- Colectarea probelor de urină de la animalele de companie;
- Efectuarea diagnosticului microbiologic pe probele de urină colectate;
- Izolarea, identificarea și selectarea izolatelor clinice pentru testarea antimicrobiană;
- Testarea efectului antimicrobian *in vitro* al extractelor de cercetat, prin intermediul metodei difuzimetrică în agar și metodei microdiluțiilor în bulion;
- Caracterizarea prevalenței infecțiilor urinare în rândul câinilor și pisicilor.

Rezultatele studiului:

➤ Prevalența infecțiilor tractului urinar inferior la animalele de companie

Distribuția speciei și a sexului a fost relativ egală, masculii aflându-se într-un procent ușor mai crescut. Câinii adulți și pisicile tinere au fost mai susceptibili în comparație cu alte categorii de vârstă; animalele care nu au fost supuse la tratamente anterioare cu antibiotice au fost mai des diagnosticate cu infecție urinară. De asemenea, câinii de rasă pură și pisicile europene au avut tendința de a fi mai vulnerabile la dezvoltarea infecției urinare.

➤ Izolatele bacteriene și rezistența antimicrobiană

Escherichia coli a fost cea mai răspândită bacterie, fiind agentul patogen cel mai frecvent întâlnit la pisici și al doilea cel mai frecvent la câini. *Proteus mirabilis*, care nu a fost izolat la pisici, a fost cea mai frecventă bacterie identificată în urina câinilor. Un alt agent patogen important, prezent numai la câini a fost *Klebsiella pneumoniae*. *Enterococcus faecalis* a fost cea mai răspândită bacterie din rândul Gram-pozitivelor. Alte bacterii indentificate au fost *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium* și *Staphylococcus pseudintermedius*. Bacterii detectate numai la câini au fost *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *S. aureus*, și *Ps. luteola*, în timp ce *S. lentus*, *S. equorum*, *S. sciuri*, și *S. haemolyticus* au fost raportate numai la pisici. O bacterie Gram-negativă rar documentată în cazurile de infecție urinară a fost *Leclercia adecarboxylata*. De asemenea, două bacterii Gram-pozitive, care nu au mai fost identificate anterior în cazurile de infecție urinară la animalele de companie, au fost *Kocuria rhizophila* și *Kocuria rosea*.

Cel mai eficient antibiotic a fost doxiciclina, în timp ce amoxicilina clavulanată a prezentat cea mai slabă activitate antimicrobiană împotriva bacteriilor uropatogene.

➤ **Activitatea antimicrobiană a extractelor de cercetat**

Extractul de *Cornus mas* a demonstrat o eficacitate antimicrobiană mai însemnată asupra bacteriilor Gram-negative, în timp ce extractul de *Sorbus aucuparia* a manifestat o activitate antimicrobiană mai ridicată împotriva bacteriilor Gram-pozitive. Ambele extracte au înregistrat un efect antimicrobian superior amoxicilinei. Cu toate acestea, extractul de *Cornus mas* a înregistrat un efect bactericid mai puternic, manifestându-se împotriva a 11 tulpini analizate. Coroborând rezultatele ambelor determinări s-a observat că extractul de *Cornus mas* a prezentat cea mai mare activitate antimicrobiană asupra *Pseudomonas luteola*, în timp ce extractul de *Sorbus aucuparia* a manifestat efecte maxime față de *Staphylococcus lentus* și *Enterococcus faecalis*.

4. Evaluarea *in vitro* a proprietății citoprotectoare a extractelor obținute din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* asupra culturilor celulare renale stresate cu gentamicină

Obiectivele studiului:

- Obținerea culturilor celulare epiteliale renale primare;
- Obținerea modelelor experimentale eficiente și predictibile de leziune renală acută *in vitro*, pe culturile celulare renale primare expuse la gentamicină;
- Evaluarea *in vitro* a viabilității celulare prin testul MTT a celulelor renale stresate cu gentamicină și tratate cu extractele de cercetat în diferite concentrații;
- Evaluarea *in vitro* a gradului de apoptoză prin intermediul citometriei în flux a celulelor renale stresate cu gentamicină și tratate cu extractele de cercetat în diverse concentrații.

Rezultatele studiului:

➤ **Viabilitatea celulară**

În cadrul testului MTT, gentamicina a determinat o scădere drastică a procentului de viabilitate celulară renală (63.03%). Tratamentul celulelor stresate cu extract de *Cornus mas* a arătat o creștere importantă a viabilității celulare la toate concentrațiile (71.63%, 74.73%, respectiv 71.25%). Cu toate acestea, s-a observat că cea mai mică viabilitate a fost înregistrată la concentrația cea mai mare. Tratamentul celulelor stresate cu extract de *Sorbus aucuparia* în concentrații mici și moderate a determinat o creștere însemnată a viabilității celulare (74.49%, respectiv 67.63%). În schimb, cea mai mare concentrație de extract a cauzat o reducere substanțială a procentului de celule vii (58.66%).

➤ **Gradul de apoptoză**

În cadrul citometriei în flux, gentamicina a determinat o scădere drastică a procentului de viabilitate celulară renală (63.83%). S-a relevat o ameliorare a nefrotoxicității în urma expunerii celulare la extract de *Cornus mas* în concentrații mici și moderate (77.1% și 80.5%). În schimb, cea mai mare concentrație de extract a manifestat o activitate citotoxică (62.1%), probabil datorită efectului pro-oxidant cumulativ al gentamicinei și polifenolilor în concentrații mari. De asemenea, cea mai mare concentrație de extract de *Cornus mas* a înregistrat cel mai mare procent de celule aflate în stadiul de apoptoză timpurie și tardivă (11.6% și 7.4%). În mod similar, concentrațiile mici și moderate de extract de *Sorbus aucuparia* au îmbunătățit viabilitatea celulară (72.8%, respectiv 73.77%). Cea mai mare concentrație de extract a cauzat o reducere substanțială a procentului de celule vii (60.2%). Totodată, aceasta a obținut cel mai mare procent de necroză (40.3%).

Extractele de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* manifestă un efect citoprotector asupra celulelor renale în cantități mici și moderate, dar odată cu creșterea concentrației, acestea determină o activitate citotoxică similară cu cea a gentamicinei. Mai mult, extractul de *Sorbus aucuparia* s-a dovedit a fi mai citotoxic la concentrații mari comparativ cu extractul de *Cornus mas*.

5. Determinarea *in vivo* a potențialului efect nefroprotector și antioxidant al extractelor din fructe de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* în nefrotoxicitatea indusă de gentamicină la șobolanii Wistar

Obiectivele studiului:

- Obținerea modelelor experimentale eficiente și predictibile de leziune renală acută, *in vivo*, la șobolani Wistar, prin administrarea gentamicinei;
- Evaluarea efectului nefroprotector al extractelor prin determinarea indicilor hematologici;
- Evaluarea efectului nefroprotector al extractelor prin cuantificarea indicilor biochimici nespecifici, precum și a unor indici biochimici specifici (Cistatina C, Indicele NAG și Molecula 1 de Injurie Renală);
- Evaluarea capacității antioxidante a extractelor prin cuantificarea unor indici ai stresului oxidativ, atât la nivel sanguin cât și la nivel tisular;
- Evaluarea efectului protector al extractelor prin analiza histopatologică a țesutului renal și hepatic.

Rezultatele studiului:

- În ceea ce privește **starea generală a indivizilor și greutatea corporală**, grupul tratat cu ulei a înregistrat cele mai mari creșteri în greutate, iar grupul tratat cu gentamicină a relevat scăderi drastice ale masei corporale. Grupurile tratate cu extract și antibiotic nu au înregistrat scăderi drastice ale greutății corporale, evidențiind efectul benefic al acestora asupra organismului.
- **Profilul hematologic** a reflectat valori aflate în limitele de referință, nefiind specific în caz de nefrotoxicitate, fiind astfel necesară investigarea adițională a altor parametrii.
- **Profilul biochimic** a relevat unele modificări importante. Astfel, lotul tratat cu antibiotic a înregistrat creșteri ale PT, ALT, ALP, BUN și CREA. Prin administrarea extractelor de cercetat, valorile acestor indici au fost ameliorate, atât nesemnificativ (BUN) cât și semnificativ (PT, ALT, ALP, CREA), manifestând un efect protector asupra toxicității induse de gentamicină.
- Prin monitorizarea activității **Cistatinei C**, care reprezintă un indice specific al funcției glomerulare, s-a putut observa că extractele de cercetat nu posedă un efect eficient la nivel glomerular renal.
- **KIM-1**, care este un indicator remarcabil al leziunilor renale la șobolan, a prezentat o creștere însemnată în grupul tratat cu gentamicină, ambele extracte ameliorând valorile acesteia.
- În urma analizei **indicelui NAG urinar**, care este un parametru specific al funcției tubulare renale, s-a putut remarca că extractele administrate grupurilor GCM și GSA au manifestat în timp un efect protector similar cu cel al grupurilor CM și SA.
- Analiza **enzimelor antioxidante** a reflectat o scădere a concentrațiilor CAT și GPx, respectiv o creștere a valorilor SOD și TAC în urma administrării terapiei cu *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia*. Nivelurile crescute ale CAT și GPx în lotul stresat ar putea fi datorate unei magnitudini mai mari a stresului oxidativ, existând astfel o eliberare mai însemnată de enzime antioxidante în organism, pentru a compensa efectele nocive determinate de SRO, extractele de cercetat ameliorând aceste aspecte. De asemenea, creșterea concentrației de SOD și TAC ar putea fi pusă pe seama intensificării activității enzimelor antioxidante în urma terapiei pe bază de antioxidanți naturali. Astfel, se poate concluziona că cele două extracte manifestă un efect antioxidant asupra stresului oxidativ determinat de gentamicină.
- În urma analizei activității **indicilor de stres nitro-oxidativ**, s-a observat o scădere a valorilor MDA și NO în loturile tratate cu extractele de cercetat. Acest aspect ar putea fi pus pe seama capacității fructelor de a reduce și neutraliza SRO și SRN.
- În urma administrării gentamicinei au fost identificate **leziuni histopatologice** acute atât la nivel renal cât și la nivel hepatic, extractele de fructe ameliorând severitatea acestora.

RECOMANDĂRI

- Efectuarea de studii *in vitro* și *in vivo*, pe multiple concentrații de extract, în vederea stabilirii indicelui terapeutic pentru ambelor extracte.
- Efectuarea investigațiilor adiționale *in vitro*, pe multiple probe biologice, în vederea descoperirii proprietăților terapeutice a celor două fructe.
- Efectuarea studiilor suplimentare *in vitro*, pe culturi celulare renale standardizate, cu scopul întăririi ipotezei în ceea ce privește efectele citoprotectoare a celor două extracte.
- Efectuarea investigațiilor adiționale *in vivo*, atât experimentale, cât și clinice, în vederea accentuării efectului nefroprotector al fructelor de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia*, și totodată, încurajarea utilizării acestor fructe ca adjuvanți în tratamentul patologiei renale.
- Efectuarea de studii suplimentare, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, cu scopul de a stabili mecanismele și locurile de acțiune a ambelor fructe.

ELEMENTELE DE ORIGINALITATE ALE TEZEI

Cercetarea de față oferă elemente inovative și reprezintă primul studiu în care se evaluează efectele biologice ale fructelor de *Sorbus aucuparia* în patologia renală. Astfel, s-a demonstrat că aceste fructe posedă proprietăți antioxidante și nefroprotectoare în injuria renală acută indusă *in vitro* și *in vivo*. De asemenea, aceasta este prima lucrare care aprofundează efectul benefic al fructelor de *Cornus mas* în nefrotoxicitatea indusă de gentamicină, cu determinarea gradului de apoptoză *in vitro*, și analiza indicilor renali specifici *in vivo*. Totodată, această lucrare evidențiază pentru prima dată efectul antimicrobian al fructelor de *Cornus mas* și *Sorbus aucuparia* împotriva agenților uropatogeni rezistenți la animalele de companie diagnosticate cu cistite bacteriene, îndemnând folosirea compușilor fitochimici ca adjuvanți sau substituenți ai antibioticelor utilizate pentru tratarea infecțiilor urinare, și consecutiv, contribuind la reducerea rezistenței antimicrobiene. Un alt element de originalitate este reprezentat de identificarea pentru prima dată a bacteriilor din genul *Kocuria*, ca agenți patogeni, în urina infectată a animalelor de companie. În plus, un element unic și avantajos ce a contribuit la obținerea acestor rezultate semnificative și autentice a fost implementarea perspectivei colaborative și interdisciplinare, care a avut ca obiectiv investigarea și adevărarea ipotezelor prezentei lucrări.