



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ ВО ШТИП

До
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип
Фонд за научноистражувачка работа

Барање за финансирање на научноистражувачки проект

Датум на поднесување	
Проект бр:	

Наслов на проектот	Тиол/дисулфиден статус и оксидирани липопотеини кај испитаници со висок атероген ризик и пациенти со градна болка од исхемична природа
Клучни зборови	атеросклероза, редокс статус, тиол/дисулфидна хомеостаза, оксидиран LDL
FRASCATI класификација	3. Медицински науки и здравство 302. Клиничка медицина 30210. Клиничка биохемија 3. Медицински науки и здравство 301. Фундаментални медицински науки 30117. Биохемија (Медицинска хемија)



ПРВ ДЕЛ 1:

Апстракт (максимум 250 зборови)

Атеросклерозата е најчеста причина за кардиоваскуларните заболувања, а нарушениот редокс статус се поврзува со најголемиот дел од факторите на ризик за нејзина рана појава и напредување. Меѓутоа, концептот на „лекување“ на оксидативниот стрес со редокс активни компоненти (антиоксидантни витамини и суплементи) се напушта и современата наука се фокусира на изучување на сигналната функција на слободните радикали и на механизмите на ендогена антиоксидантна заштита.

Тиолните групи претставуваат значајна компонента на ендогената антиоксидантна заштита. Тие можат да подлежат на оксидација, а потоа и на редукција, и претставуваат основна детерминанта на тиол/дисулфидната хомеостаза. Постојат докази дека нарушувањата на динамичната тиол/дисулфидна хомеостаза се инволвирани во патогенезата на различни заболувања.

Во фокусот на нашите истражувања ќе бидат плазматичната тиол/дисулфидна хомеостаза и статусот на тиолните групи на еритроцитните мембрани. Ќе ја истражиме и интеракцијата помеѓу тиол/дисулфидната хомеостаза и липидните биомаркери за атероген ризик, вклучувајќи ја и оксидабилноста на LDL фракцијата (oxLDL). Ќе извршиме анализа на корелациите помеѓу испитуваните параметри и некои од позначајните конвенционални фактори на ризик за рана појава и напредување на атеросклерозата, како што се прекумерна здебеленост, пушење, хипертензија и дијабет.

Преку одредувањето на степенот на оксидабилност на плазматичниот LDL при градна болка од исхемична природа, ќе ја истражиме меѓусебната поврзаност на oxLDL и тиол/дисулфидната хомеостаза при акутен коронарен синдром.

Добиените податоци од ова истражување ќе преставуваат основа за идни истражувања на механизмите за регулација на тиол/дисулфидната хомеостаза и последиците од нејзиното нарушување.



Abstract (max 250 words)

Atherosclerosis is most common cause of cardiovascular diseases and disturbed redox status underlies most of the risk factors for its early onset and advancement. However, the concept of “curing” the oxidative stress with redox active compounds (antioxidant vitamins and supplements) has been abandoned, and the modern science is focused on studying of the signaling functions of free radicals and the mechanisms of endogenous antioxidant defense.

Thiol groups are an important component of the endogenous antioxidant protection. They may undergo an oxidation and subsequent reduction, thus representing the main determinant of the thiol/disulfide homeostasis. There are data in the literature that disturbances in the dynamic thiol/disulfide homeostasis are involved in the pathogenesis of various diseases.

We will focus our research on plasma thiol/disulfide homeostasis, as well as on the status of thiol groups of erythrocyte membranes. We will also study the interaction between the thiol/disulfide homeostasis and the lipid biomarkers of atherosclerotic risk, including the oxidizability of LDL fraction (oxLDL). We will analyze the correlations between these parameters and some of the most important conventional risk factors for early onset and development of atherosclerosis, including obesity, smoking, hypertension and diabetes.

Measuring the levels of oxidizability of plasma LDL during the ischemic chest pain, we will study correlations between oxLDL and thiol/disulfide homeostasis in acute coronary syndrome. The results from this project will represent a basis for future studies of mechanisms for regulation of thiol/disulfide homeostasis and the consequences of its impairment.



Детален опис на проектот:

Атеросклерозата е најчеста причина за кардиоваскуларни заболувања, а населението во нашата земја е склоно кон рана појава и развој на атеросклероза поради изложеноста на голем број ризик фактори, како што се: дислипидемија, хипертензија, гојазност, пушење, намалена физичка активност, дијабетес мелитус, метаболен синдром (абдоминална обезност, покачена серумска вредност на триглицеридите, низок HDL, хипертензија и хипергликемија) и оксидативен стрес за кој се смета дека практично се наоѓа во основата на сите овие заболувања и состојби. Нашето истражување има за цел да опфати некои од најзначајните фактори на ризик за појава и напредување на атеросклерозата со цел да добиеме една појасна слика за нивната поврзаност со оксидативниот стрес. При тоа, освен класичните биомаркери за оксидативен стрес, во истражувањето ќе биде вклучена и проценката на тиол/дисулфидната хомеостаза како еден понов пристап кон проучувањето на редокс дисбалансот. Имено, клетките постојано се изложени на дејството на реактивните кислородни видови (ROS – reactive oxygen species) кои потекнуваат од нормалните физиолошки процеси, како на пример клеточното дишење во митохондриите. ROS во голема мерка предизвикуваат оштетувања на клеточните липиди, протеини и ДНК. Сепак, резултатите од најновите базични истражувања покажуваат дека ROS и останатите високореактивни молекули немаат единствено само штетно дејство, туку, во помали концентрации имаат и значајна улога во клеточната сигнализација. Поради тоа, редокс реакциите кои претставуваат моќни хемиски процеси на оксидација и редукција на протеини и други биомолекули, имаат клучна улога во одржувањето на хомеостазата во клетките и организмот како целина, и го детерминираат балансот помеѓу доброто здравје и патолошките состојби.

Тиолните групи претставуваат значајна компонента на ендогената антиоксидантна заштита. Тие имаат способност да подлежат на оксидација при што се формираат дисулфидни врски, а потоа и на редукција, и на тој начин ја детерминираат тиол/дисулфидна хомеостаза. Оваа хомеостаза има критична улога во антиоксидантната заштита, детоксикацијата, сигналната трансдукција, одржувањето на интегритетот на клеточните мембрани, апоптозата и регулацијата на активноста на транскрипционите фактори. Постојат докази дека нарушувањето на динамичната тиол/дисулфидна хомеостаза претставува молекуларна основа на многу заболувања, како на пример дијабетес мелитус, кардиоваскуларни заболувања, рак, автоимуни заболувања и др. Поради тоа, детерминацијата на тиол/дисулфидната хомеостаза може да ни даде важни информации за различни физиолошки и патофизиолошки биохемиски процеси.

Во фокусот на нашите истражувања ќе биде плазматичната тиол/дисулфидна хомеостаза како значајна детермината на редокс статусот на испитуваните пациенти, но и статусот на тиолните групи на еритроцитните мембрани кои се значајни за стабилноста на самите мембрани. Имено, band-3-протеинот (мембрански протеин кој претставува медијатор на анјонската размена, придонесува за протеин-протеин интеракциите и е значаен за стабилноста на еритроцитните



мембрани), се поврзува со липидниот двослој токму преку тиолните групи од неговите цистеински остатоци.

Ќе се осврнеме исто така и на интеракцијата помеѓу тиол/дисулфидната хомеостаза и липидните биомаркери за атероген ризик. Освен класичните клиничко-биохемиски параметри кои го детерминираат липидниот статус, ќе ја одредиме и оксидабилноста на LDL фракцијата (oxLDL). Зголемената оксидабилност на LDL е опишана како значаен неконвенционален фактор на ризик за рана појава и напредување на атеросклерозата. Освен тоа, постојат податоци дека oxLDL во серум се покачува при акутен инфаркт на миокардот и нестабилна ангина пекторис, при што може да ни биде показател за присуство на нестабилна плака и рана детекција на состојбата.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Balla, G., Jacob, H. S., Eaton, J. W., Belcher, J. D., Vercellotti, G. M. (1991) "Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury". *Arterioscler. Thromb.* 11, 1700–1711.
2. Buttari, B., Profumo, E., Businaro R. et al. (2013) "Oxidized haemoglobin-driven endothelial dysfunction and immune cell activation: novel therapeutic targets for atherosclerosis". *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 20, no. 37, pp. 4806–4814.
3. Buttari, B., Profumo, E., Riganò, R. (2015) "Crosstalk between Red Blood Cells and the Immune System and Its Impact on Atherosclerosis". *BioMed Research International*. Volume 2015, Article ID 616834, 8 pages.
4. Erel, O., Neselioglu, S. (2014) "A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis". *Clinical Biochemistry*. 47, 326-332.
5. Gradinaru, D., Borsa, C., Ionescu, C., Margina, D., (2013) "Advanced oxidative and glycoxidative protein damage markers in the elderly with type 2 diabetes". *J. Proteomics*. 92, 313-322.
6. Scoccia, E. A., Molinuevo, S. M., McCarthy, D. A., Cortizo, M. A. (2001) "A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins". *BMC Clinical Pathology* 1:1.
7. Sluimer, J. C., Gasc, J. M., van Wanroij, J. L., Kisters, N., Groeneweg, M., Sollewijn, M. D., et al. (2008). "Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis". *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 1258–1265. doi: 10.1016/j.jacc.2007.12.025.
8. Tsuda, K. (2010) "Oxidative stress and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men". *Int. Heart J.* 51: 121-124.
9. Ziobro, A., Duchnowicz, P., Mulik, A., Koter-Michalak, M., Broncel, M. (2013) "Oxidative damages in erythrocytes of patients with metabolic syndrome". *Mol Cell Biochem.* 378:267–273.



Предложени истражувања

Цели на истражувањето:

Главна цел во истражувањето ќе биде анализа на плазматичниот тиол/дисулфиден статус, како и анализа на промените кои настануваат на ниво на тиолните групи во еритроцитните мембрани. Ќе го утврдиме степенот на корелација помеѓу овие промени и најзначајните фактори на ризик за појава и напредување на атеросклерозата, како што се: прекумерната здебеленост, хипертензијата и шеќерната болест.

Преку одредувањето на степенот на оксидабилност на плазматичниот LDL при градна болка од исхемична природа, ќе ја истражиме меѓусебната поврзаност на oxLDL и тиол/дисулфидната хомеостаза при акутен коронарен синдром.

Пациенти и методи:

Во истражувањето ќе бидат вклучени испитаници/пациенти кои ќе бидат поделени во групи во зависност пушачкиот статус, индексот на телесна маса и начинот на исхрана. Дел од испитаниците ќе бидат здрави млади лица, а дел од нив ќе бидат возрасни лица со дијагностициран дијабет, хипертензија или метаболен синдром.

Во истражувањето ќе бидат вклучени и пациенти од амбуланта по интерна медицина, во моментот кога се јавуваат со градна болка од исхемична природа.

Ќе бидат користени примероци од венска крв земени со стандардна метода на венепункција. Крвните примероци ќе се обработуваат со постапки на центрифугирање. За анализа на примероците ќе се користат спектрофотометриски методи и електрофореза.

Ќе се определуваат: тиол/дисулфидниот статус, реактивните кислородни метаболити и вкупните антиоксиданси во плазма.

Ќе се изолираат еритроцитни мембрани и ќе се детерминира статусот на тиолните групи во истите.

Ќе се одредува исто така и оксидабилноста на липопротеините со мала густина.

Истражувачки план со временска рамка:

а) Прво тромесечје

Организација на истражувачкиот тим и распределба на задолженијата.

Пребарување на литературата.

Набавка на неопходниот потрошен материјал и реагенси.

Селекција на испитаниците/пациентите.

б) Второ тромесечје

Земање на крв за анализа и податоци од испитаниците/пациентите.

Обработка и замрзнување на примероците.

Изолација на еритроцитни мембрани.

Воведување и оптимизација на лабораториските методи.



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ ВО ШТИП

в) Трето тромесечје

Определување на нивото на реактивни кислородни метаболити и вкупни антиоксиданси во плазма.

Определување на нивото на тиолни групи (оксидирани и редуцирани) во плазма.

Определување на oxLDL.

Определување на тиолниот статус на мембранските протеини.

г) Четврто тромесечје

Сумирање на резултатите и нивна статистичка обработка.

Анализа на конечните резултати.

Подготовка на резултатите за публикување.

Презентација на резултатите од Проектот на домашни и меѓународни конференции.



Истражувачка инфраструктура

Истражувачки капацитети/опрема

Крв за анализа ќе се зема во регистрирани медицински установи со кои Факултетот за медицински науки има склучено или ќе склучи договор за соработка.

Сите испитаници/пациенти ќе бидат информирани за целите на истражувањето и ќе бидат вклучени во студијата само доколку дадат своја писмена согласност. Обработката на крвните примероци и изработката на планираните анализи ќе се реализира во новоформираната *Лабораторија за биохемија и транслациона медицина* во просториите на Текстилното училиште.

Опрема која ќе се користи и која во моментот ја има во лабораторијата е следната:

1. Спектофотометар – читач на микроплочи
2. Хоризонтална и вертикална електрофореза
3. Термоблок
4. Водена бања
5. Вортекс мешалка
6. Магнетна мешалка
7. Апарат за ултрачиста вода
8. Трансилуминатор
9. Фрижидер
10. Замрзнувач
11. Дигитална вага