



**COMPETIȚIA DE PROIECTE DE CERCETARE A ACADEMIEI OAMENILOR DE ȘTIINȚĂ DIN  
ROMÂNIA  
DESTINATĂ TINERILOR CERCETĂTORI**

**„AOȘR-TEAMS-III” EDIȚIA 2024-2025  
„TRANSFORMAREA DIGITALĂ ÎN ȘTIINȚE”**

**PROFILUL GENOMIC MITOCONDRIAL AL LIMFOCITUL B CD19<sup>+</sup> LA PACIENTUL CU DIABET DE  
TIP 2 CU RISC ANGIOPATIC ȘI METABOLISMUL CELULAR AL SORBITOLULUI – INOVARE  
COMPUTAȚIONALĂ, VALIDARE MULTISURSĂ ȘI GĂSIRE DE NOI ȚINTE ÎN PREDIAGNOSTIC  
Acronim: CONDRIOM  
Domeniu științific 08: Științe Medicale**

**RAPORT DE ETAPĂ II**

**DIRECTOR DE PROIECT:  
Dr. Vlad-Alexandru TOMA**

**ECHIPĂ DE CERCETARE:  
Dr. Gabriel MARC  
Dr. Mihai LUPU  
Dr. Denisa HATHAZI**

**11.12 2024**

## **I. INTRODUCERE ÎN ETIOPATOGENEZA ȘI PATOLOGIA DIABETULUI DE TIP II**

### ***Diabetul de tip II***

Diabetul de tip II este o boală metabolică caracterizată prin niveluri crescute de glucoză în sânge (hiperglicemie) datorită rezistenței la insulină și/sau producției insuficiente de insulină de către pancreas. Insulina este un hormon esențial produs de pancreas, care ajută celulele să preia glucoza din sânge pentru a o folosi ca sursă de energie. În diabetul de tip II, celulele devin rezistente la efectele insulinei, iar pancreasul nu poate produce suficientă insulină pentru a depăși această rezistență, ceea ce duce la acumularea glucozei în sânge.

### ***Profilul biochimic al diabetului de tip II.***

Calea poliolorilor este un proces metabolic în care glucoza este convertită în sorbitol și apoi în fructoză. Aceasta este deosebit de relevantă în contextul diabetului, deoarece nivelurile ridicate de glucoză din sânge pot activa această cale, având consecințe importante asupra sănătății. Mecanismul căii poliolorilor prin care se generează sorbitolul cuprinde: (1) *Conversia glucozei în sorbitol*: Sub acțiunea enzimei aldoreductază, glucoza este redusă la sorbitol. Aceasta este o reacție dependentă de NADPH. (2) *Conversia sorbitolului în fructoză*: Sorbitolul este ulterior oxidat la fructoză de către enzima sorbitol dehidrogenază, folosind  $\text{NAD}^+$  drept cofactor. În condiții normale, doar o mică parte din glucoza din celule urmează calea poliolorilor. Însă, în diabetul necontrolat, nivelurile ridicate de glucoză din sânge pot duce la activarea excesivă a acestei căi, având mai multe efecte negative: (i) *Stresul oxidativ*: Consumul de NADPH pentru reducerea glucozei la sorbitol poate reduce disponibilitatea NADPH pentru alte reacții esențiale, cum ar fi regenerarea glutatationului, un antioxidant important. Aceasta poate duce la stres oxidativ crescut, care este implicat în multe complicații ale diabetului. (ii) *Osmoticitatea celulară*: Sorbitolul este un alcool de zahăr care nu traversează ușor membranele celulare. Acumularea de sorbitol în celule poate duce la creșterea osmolarității intracelulare, determinând umflarea celulelor și disfuncție celulară. (iii) *Complicații microvasculare*: Activarea căii poliolorilor a fost implicată în dezvoltarea complicațiilor microvasculare ale diabetului, cum ar fi neuropatia (afectarea nervilor), retinopatia (afectarea ochilor) și nefropatia (afectarea rinichilor). Aceste complicații sunt rezultatul combinat al stresului oxidativ și al schimbărilor osmotice.

Datorită rolului negativ al căii poliolorilor în complicațiile diabetului, s-au dezvoltat inhibitori ai aldoreductazei pentru a bloca această cale și pentru a preveni acumularea de sorbitol. Cu toate acestea, utilizarea acestor inhibitori în practica clinică a fost limitată de efectele secundare și de eficacitatea variabilă.

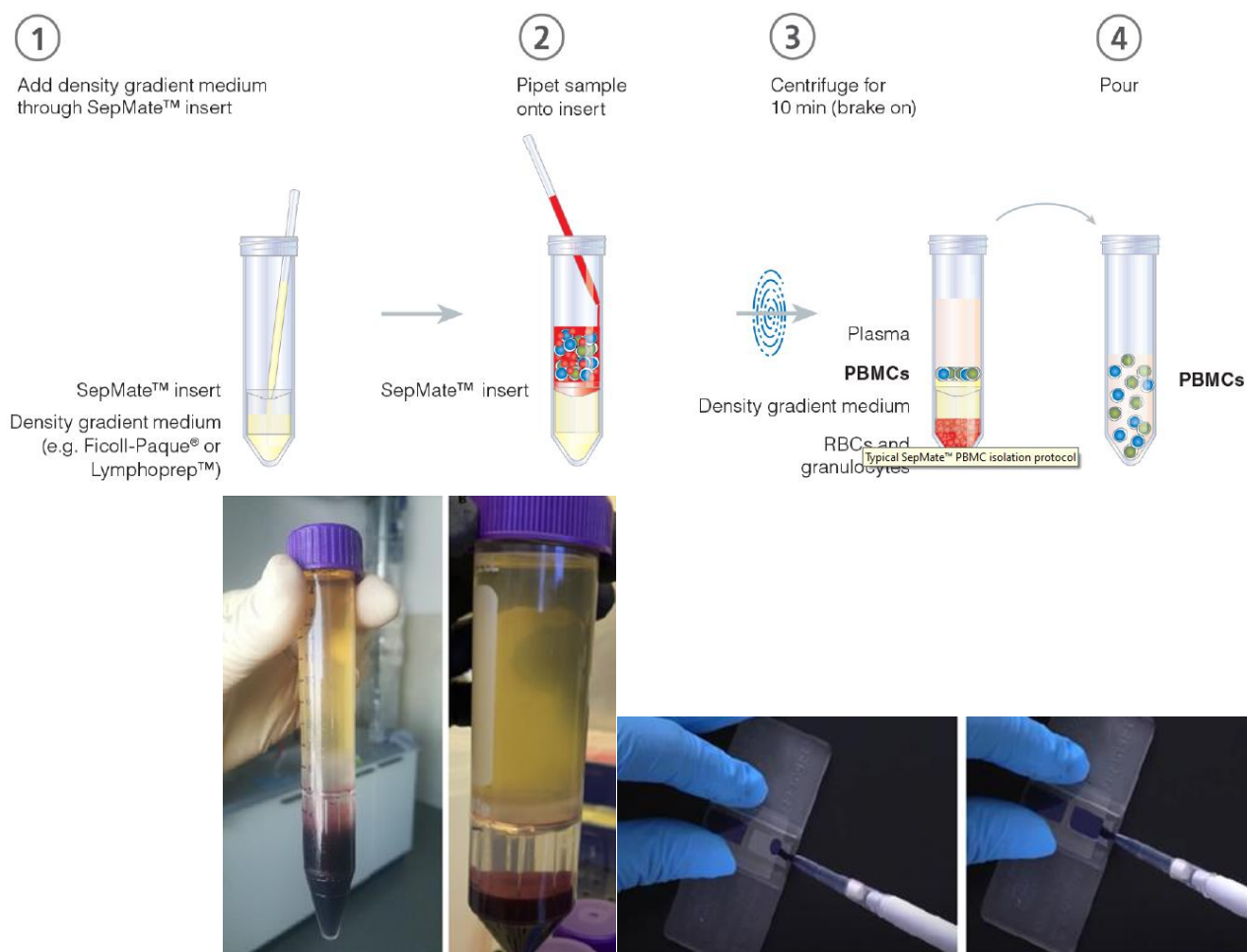
## **II. ACTIVITATEA EXPERIMENTALĂ ETAPA 2**

### **1. Organizarea materialelor și a grupurilor de studiu**

### **2. Validare metodologică**

### **3. Comunicarea de etapă la conferințe**

**1. Organizarea materialelor și a grupurilor de studiu** a avut la bază procesul de achiziție a unor kituri pentru izolarea ADN mitocondrial, pentru izolarea și purificarea limfocitelor  $\text{CD19}^+$  din sângele unor voluntari sănătoși, menținerea acestora în cultură după crioconservare, după cum este redat în **Figura 1**. Dr. Mihai Lupu a demarat procedurile etice privind organizarea voluntarilor cu diabet de tip 2 în vederea recoltării probelor de sânge aferente etapei 3. Am validat protocolul de lucru, concentrațiile necesare, timpii optimi de lucru *in vitro* respectiv obținerea lizatelor celulare utilizând tamponul RIPA, 200 uL pentru 4 milioane de celule.

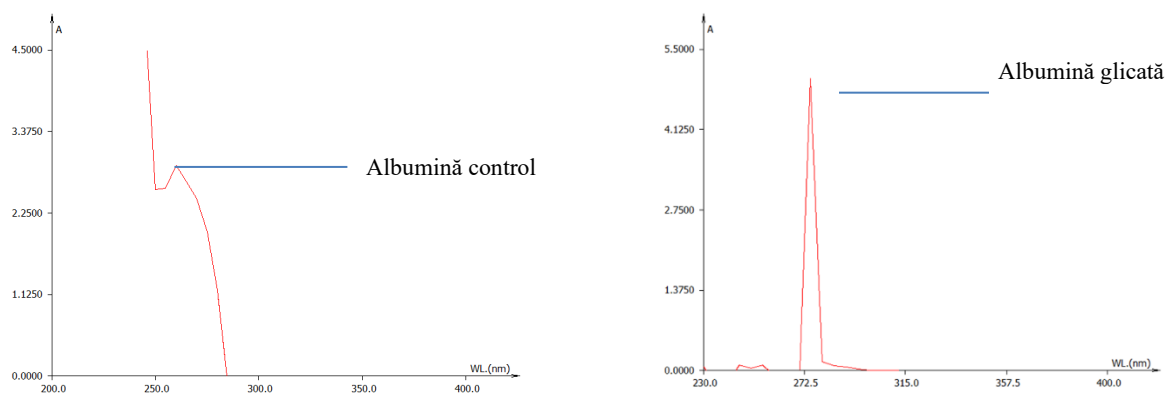


**Figura 1.** Modul de lucru pentru izolarea, cuantificarea și verificarea viabilității celulare, lucrând cu sângele unor pacienți sănătoși, în vederea optimizării metodologice.

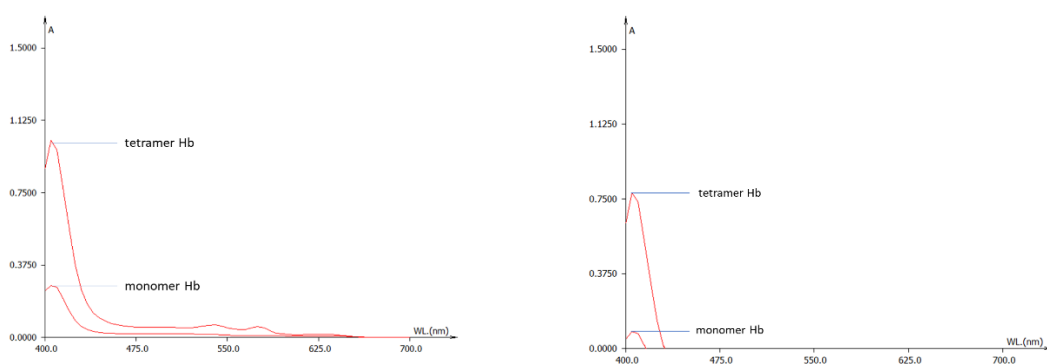
## 2. Validarea metodologică a inclus 2 tipuri de analize.

(i) Prima componentă a acestei activități a cuprins generarea produșilor de glicare avansată, utilizând proteine model precum albumina serică, hemoglobina monomerică respectiv hemoglobina tetramerică. S-a procedat la incubarea experimentală a albuminei respectiv a hemoglobinelor cu glucoză 40 mM, concentrație specifică diabeticului de tip 2. Incubarea a durat 3 zile, a avut loc la  $+37^{\circ}\text{C}$  la o concentrație proteică egală pentru toate cele 3 proteine, de 4.6 mg/mL. Probele au fost examinate prin spectroscopie UV-vis iar spectrele obținute pentru albumină (**Figura 2**) și hemoglobine (**Figura 3**) au demonstrat hipsocromia moleculară, ca urmare a glicării realizate.

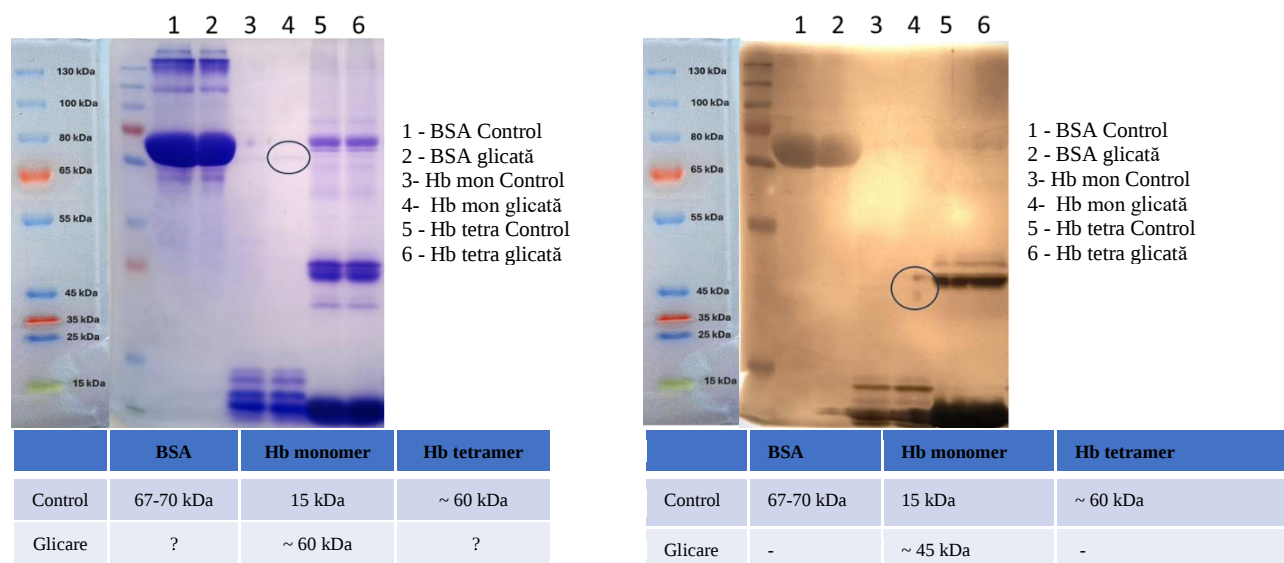
(ii) Compușii de glicare au fost apoi analizați prin electroforeză denaturantă și nativă dar și prin analiza componentei glucidice atașată lanțului polipeptidic, folosind metoda colorării cu argint (**Figura 4**). Datele din acest tip de analiză au sugerat un aspect foarte important, și anume, viteza de glicare a monomerului a fost mai mare decât a albuminei sau a tetramerului de hemoglobină, întrucât pe gelul de electroforeză supus analizei glicoproteinelor, apare un spot la cca. 50 kDa, pentru Hb monomer. Controlul acesteia, monomerul neincubat cu glucoză și-a păstrat masa la 16 kDa. Nu am demonstrat pe gelul de electroforeză glicarea albuminei respectiv Hb tetramer în doar 3 zile așa cum am observat-o la monomer (**Figura 4**).



**Figura 2.** Spectroscopia UV-vis și spectrele obținute pentru albumină cu și fără incubarea cu glucoză. Maximul de absorbție la Control e 280 nm iar la cea glicată scade la 273 nm.



**Figura 3.** Spectroscopia UV-vis și spectrele obținute pentru hemoglobine cu și fără incubarea cu glucoză. Maximul de absorbție la Control e 420 nm iar la cea glicată scade la 405 nm pentru ambele forme studiate.

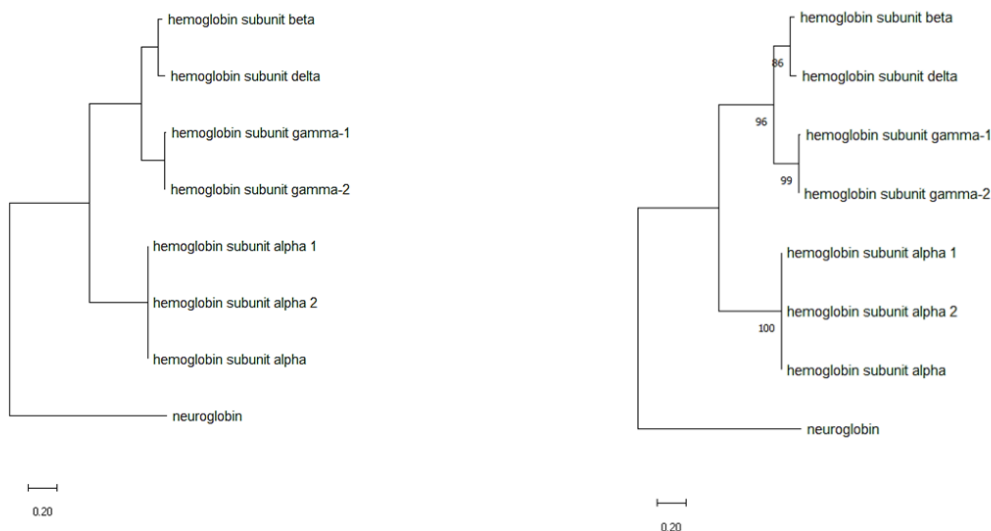


**Figura 4.** Profilul electroforetic al proteinelor glicate; stânga: colorare cu Comassie Brilliant Blue, sistem denaturant; dreapta: colorare cu azotat de argint, sistem denaturant. Compusul glicat se observă în proba 4 (Hb monomer glicată).

Pentru compararea Hb monomer cu alți monomeri globinici implicați în diabetul de tip 2, am efectuat o analiză bioinformatică (Figura 5) privind gradul de similaritate între Hb monomer și neuroglobină.

|                            | Ala   | Cys  | Asp  | Glu  | Phe  | Gly  | His  | Ile  | Lys  | Leu   | Met  | Asn  | Pro  | Gln  | Arg  | Ser   | Thr  | Val   | Trp  | Tyr  | Total |
|----------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|-------|
| hemoglobin subunit alpha 1 | 14.79 | 0.70 | 5.63 | 2.82 | 4.93 | 4.93 | 7.04 | 0.00 | 7.75 | 12.68 | 2.11 | 2.82 | 4.93 | 0.70 | 2.11 | 7.75  | 6.34 | 9.15  | 0.70 | 2.11 | 142   |
| hemoglobin subunit alpha 2 | 14.79 | 0.70 | 5.63 | 2.82 | 4.93 | 4.93 | 7.04 | 0.00 | 7.75 | 12.68 | 2.11 | 2.82 | 4.93 | 0.70 | 2.11 | 7.75  | 6.34 | 9.15  | 0.70 | 2.11 | 142   |
| hemoglobin subunit beta    | 10.20 | 1.36 | 4.76 | 5.44 | 5.44 | 8.84 | 6.12 | 0.00 | 7.48 | 12.24 | 1.36 | 4.08 | 4.76 | 2.04 | 2.04 | 3.40  | 4.76 | 12.24 | 1.36 | 2.04 | 147   |
| hemoglobin subunit delta   | 10.20 | 1.36 | 4.76 | 5.44 | 5.44 | 8.84 | 6.12 | 0.00 | 7.48 | 12.24 | 2.04 | 5.44 | 4.08 | 3.40 | 2.72 | 4.08  | 3.40 | 11.56 | 1.36 | 2.04 | 147   |
| hemoglobin subunit gamma-1 | 8.16  | 0.68 | 5.44 | 5.44 | 5.44 | 8.16 | 4.76 | 2.04 | 8.16 | 11.56 | 2.04 | 3.40 | 2.72 | 2.72 | 2.04 | 7.48  | 7.48 | 8.84  | 2.04 | 1.36 | 147   |
| hemoglobin subunit gamma-2 | 7.48  | 0.68 | 5.44 | 5.44 | 5.44 | 8.84 | 4.76 | 2.72 | 8.16 | 11.56 | 2.04 | 3.40 | 2.72 | 2.72 | 2.04 | 7.48  | 6.80 | 8.84  | 2.04 | 1.36 | 147   |
| neuroglobin                | 8.61  | 1.99 | 3.97 | 8.61 | 4.64 | 5.30 | 1.99 | 1.99 | 2.65 | 13.91 | 2.65 | 1.32 | 5.96 | 3.31 | 7.28 | 10.60 | 3.31 | 7.28  | 1.99 | 2.65 | 151   |
| Avg                        | 11.07 | 1.03 | 5.15 | 4.81 | 5.15 | 6.87 | 5.41 | 0.86 | 7.12 | 12.45 | 2.06 | 3.26 | 4.38 | 2.06 | 2.83 | 7.04  | 5.58 | 9.53  | 1.37 | 1.97 | 145.6 |

Hemoglobin subunits homo sapiens



BLAST between globin CT and all sequences (above):

|                                     | Description                       | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession     |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|---------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">FRYTHROCRUORIN CT</a> |                 | 107       | 107         | 88%         | 2e-34   | 43.66%     | 136      | Query_2921807 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">neuroglobin HS</a>    |                 | 46.2      | 46.2        | 81%         | 8e-11   | 23.02%     | 151      | Query_2921805 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">myoglobin HS</a>      |                 | 30.0      | 30.0        | 83%         | 4e-05   | 23.24%     | 154      | Query_2921806 |

i.e *globin* (not erythrocrurin) from CT is somewhat similar to neuroglobin form HS and also myoglobin form HS (good experimental model)

**Figura 5.** Analiza bioinformatică a gradului de similaritate între Hb monomer și neuroglobină. Datele de secvență (neprezentate) au arătat că similaritatea este de minim 95% (BLAST).

**3. Comunicarea datelor de etapă** a cumulat 8 comunicări științifice și un articol aflat în revizie după ce am primit de la revista *Molecules* Q2 comentariile ca *major revision*. Lista de mai jos sumarizează aceste activități.

Moldoveanu, C.-A., Jurca, A., Colniță, A., Roman, I., Sevastre, B., Sonica, A., **Toma, V.A.**, *Unraveling the Complexities of Cerebral Cortex Peroxidase Behavior in Parkinson's Disease: Examining Correlations with Inflammation and Redox Homeostasis*, **Annual International Conference of RSBMB (The Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, București/România 25-27 sep.2024**

Moldoveanu, C.-A., Jurca, A., Colniță, A., Roman, I., Sevastre, B., **Toma, V.A.**, *Unlocking early diagnosis: exploring blood-brain biomarkers in Parkinson's Disease for enhanced intervention strategies*, la al XIV-lea Congres al Societății Române de Fiziologie, „Fiziologia azi: între concept, inovație tehnologică și aplicația clinică Cluj-Napoca/România 17-19 oct. 2024

**Toma V.A.**, Moldoveanu C.A., Lehen M., Muntean M., Florea A., Roman I., Dandea Ș., Sevastre B. , Silaghi-Dumitrescu R. *Exploring oxygen carriers for hemorrhage management: vascular response to sheep hemoglobin administration*, la al XIV-lea Congres al Societății Române de Fiziologie, „Fiziologia azi: între concept, inovație tehnologică și aplicația clinică Cluj-Napoca/România 17-19 oct. 2024

**Toma V.A.**, Moldoveanu C.A., Lehen M., Muntean M., Florea A., Roman I., Dandea Ș., Sevastre B. , Silaghi-Dumitrescu R. *Characterization of the monomeric hemoglobin from invertebrates (Chironomus)*, Annual International Conference of RSBMB (The Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology) București/România 25-27 sep. 2024

**Toma Vlad-Alexandru**, *Înainte și după Palade în biologia celulară: 50 de ani de la Premiul Nobel. Următorii 50, încotro?* Conferința Națională de Comunicări Științifice la a XXX-a Ediție Bistrița/România 15-16 nov. 2024

**1 Review în pregătire (major revision momentan)**

**3 comunicări la Congresul SRBC 2024, 11-13 decembrie, UMFST Tg. Mureș**

Avizat,

DIRECTOR DE PROIECT:

**Dr. Vlad-Alexandru TOMA**

ECHIPĂ DE CERCETARE:

**Dr. Gabriel MARC**

**Dr. Mihai LUPU**

**Dr. Denisa HATHAZI**