

**Facultatea de Farmacie**

**EVALUAREA CORELAŢIILOR BIOCHIMICE DINTRE MICROELEMENTE, MARKERII BIOCKIMICI TIROIDIENI ŞI MARKERII METABOLISMULUI OSOS**

**PROIECT ȘTIINȚIFIC**

Conducător științific, Student doctorand,

Prof. Univ. Dr. Cornelia-Geanina Mircea Opariuc-Dan Luana-Ștefana

**Septembrie 2021**

**1. Stadiul actual al cunoaşterii**

***1.1. Microelemente – glanda tiroidă – sistemul osos***

Microelementele reprezintă acele elemente minerale care se regăsesc în organism în cantitate foarte mică şi sunt necesare pentru realizarea proceselor normale fiziologice. Cuprul, zincul și fierul asigură sinteza corectă a macromoleculelor care formează structura osoasă, iar iodul, seleniul și fierul determină o sinteză corectă a hormonilor tiroidieni. Totuși microelementele sunt utilizate de organism în concentrații diferite atât în structura tiroidiană cât și osoasă îndeplinind funcții diverse. Acestea participă la reacţiile de oxido-reducere, la sinteza de compuşi cu rol structural, intră în structura enzimelor şi sunt implicaţi în procesul de sinteză a hormonilor care asigură dezvoltarea tiorido-osoasă normală.

Hormonii tiroidieni stimulează modelarea osoasă la adulți prin creșterea resorbției osoase osteoclastice, în timp ce la copii stimulează dezvoltarea și mineralizarea osoasă. Terapia supresivă TSH se aplică de obicei la pacienții cu cancer tiroidian diferențiat (DTC) pentru a îmbunătăți evoluţia afecţiunii la pacienţi. În ultimele decenii, mai mulți autori au evaluat consecinţele disfuncţiei tiroidiene asupra struturii şi funcţiei osoase. Studiile diverse și meta-analizele au arătat că terapia supresivă cronică TSH este sigură la femei în premenopauză și bărbați (Fitzgerald, 2018). În schimb, la femeile aflate în postmenopauză, terapia supresivă TSH este asociată cu o scădere a densității minerale osoase, deteriorarea arhitecturii osoase (evaluată prin computertomografie cantitativă şi scorul trabecular osos) și, eventual, un risc crescut de fracturi. Efectele sunt mai evidente în cazul în care nivelul seric al hormonilor tiroidieni nu este foarte atent monitorizat (Bracantella, 2020).

Glanda tiroidă este reglată în principal de un sistem de feedback prin care secreția hormonilor tiroidieni (în principal tiroxină liberă FT4), este stimulată de hormonul stimulator al tiroidei (cunoscut și sub numele de tirotropină sau TSH) secretat de tirotrofele hipofizare. S-au analizat implicațiile autoreglării TSH, asupra generării răspunsului TSH la tiroxină liberă („curba TSH”) și asupra variației acestui răspuns, care ar putea rezulta din variațiile funcției hipotalamo-pituitare sau a glandei tiroide. Studiile au demonstrat că, în circumstanțele variațiilor interindividuale și intraindividuale ale funcției hipotalamo-hipofizare, autoreglarea TSH diminuează variația curbei TSH. La rândul său, aceasta mărește probabilitatea de a genera și menține o valoare a tiroxinei fără eutiroidie. Această contribuție a autoreglării TSH la stabilizarea fiziologiei tiroidei oferă o explicație logică pentru selecția evolutivă a acestui proces fiziologic (Fitzgerald, 2018).

Scheletul fiind un țesut țintă extrem de sensibil și arhetipal pentru T3, demonstrează rolul critic al hormonilor tiroidieni în timpul dezvoltării, creșterii liniare, a modelării și menţinerii structurii oaselor adulte. Tirotoxicoza este una din cauzele osteoporozei secundare, iar semnalizarea anormală a hormonilor tiroidieni a fost identificată recent ca un nou factor de risc de dezvoltare a osteoartritei. Fenotipurile scheletice la șoarecii modificați genetic au reprodus fidel tulburări genetice la om, evidenţiind relația fiziologică complexă dintre starea tiroidiană controlată prin mecanism central și acțiunile periferice ale hormonilor tiroidieni. Studiile efectuate pe șoareci mutanți au stabilit, că T3 exercită acțiuni anabolice în timpul creșterii și efecte catabolice asupra osului adult. Astfel, scheletul reprezintă un sistem fiziologic ideal în care se pot observa procese din cadrul metabolismului hormonilor tiroidieni, cum sunt transportul hormonulilor, metabolismul acestora și acțiunea în timpul dezvoltării, maturizării şi răspunsul la leziuni. Analiza acțiunii T3 în linii individuale de celule scheletice poate oferi noi perspective asupra mecanismelor moleculare specifice celulei osoase și poate identifica în cele din urmă ținte terapeutice noi pentru bolile degenerative cronice, cum ar fi osteoporoza și osteoartrita (Bassett, 2016).

Hormonul tiroidian T3 acţionează specific în cursul dezvoltarii stucturii osoase asupra condrocitelor și a structurilor articulare, influențând resorbția osoasă prin modelarea acțiunii osteoclastelor. De asemenea Williams, afirmă că T3 stimulează formarea de preoteoglicani, colagen și stimulează acțiunea metaloproteinazelor reglând procesele de mineralizare, respectiv de degradare osoasă (Williams, 2012).

Se consideră că deficitul de cupru afectează sănătatea oaselor prin scăderea cantităţii şi a activităţii liziloxidazei, o enzimă care conține cupru şi care catalizează hidroxilarea resturilor de lizină din structura colagenului cu facilitarea reticulării fibrilelor de colagen cu cele de elastină. Deficitul de cupru determină reducerea gradului de înreţelare a colagenului cu reducerea rezistenţei matricei osoase, deficit de mineralizare osoasă, cu agravarea osteoporozei, aspect observat pe parcursul bolii Mekin asociată cu incapacitatea de absorbție a cuprului. Manganul este implicat în sinteza corectă a proteoglicanilor care intră în structura matricei osoase, iar absența sau deficitul acestuia determină osteoporoză și deficit de dezvoltare a scheletului, cu apariţia de exemplu a condrodistrofiei (Medeirots 2016; Odabasi, 2008). Deficitul de seleniu are un impact negativ asupra structurii şi funcţiilor cartilajului, având o influență indirectă asupra osului. Studiile au arătat faptul că un consum de 3 mg Se/zi ca formă chimică de oxid de seleniu sau seleniu în amestecuri de vitamine-minerale a crescut concentrația serică de albumină și activitatea fosfatazei alcaline, enzimă care este foarte importantă pentru procesul de mineralizare osoasă (Jia, 2019).

Studiile pe celule de *Schizosaccharomyces pombe*, tulpină utilizată ca sistem model pentru evaluarea legăturii zinc-fosfatază alcalină, au demonstrat că activitatea acesteia depinde de zinc, iar o scădere a nivelului microelementului determină reducerea activității enzimei cu reducerea procesului de mineralizare osoasă (Hu, 2019).

Remodelarea osoasă reprezintă un fenomen fiziologic de reînnoire continuă a țesutului osos care necesită funcționarea normală a mai multor tipuri de celule, un metabolism hormonla normal, inclusiv al hormonilor tiroidieni şi este esențială pentru înțelegerea transformărilor suferite de structura osoasă de-a lungul vieţii unui individ (Masaoutis, 2019).

Se remarcă o corespondență între biomarkerii tiroidieni, osoși și microelementele care asigură menţinerea homeostaziei organismului, cele din urmă având rol antioxidant și mai ales funcțional pentru diferitele enzime și proteine structurale (Štefková, 2015).

Conform studiilor aportul exogen insuficient de microelemente, altele decât iodul, crește riscul de apariție a patologiilor tiroidiene. Seleniul intră în structura selenoproteinelor, care se regăsesc în structura enzimelor, cum ar fi în glutation peroxidaza ce protejează tirocitele prin neutralizarea acțiunii oxidante a peroxidului de hidrogen. La nivel tiroidian peroxidul de hidrogen este necesar pentru oxidarea iodurii la iod molecular, formă sub care acesta este utilizat pentru sinteza hrmonilor tiroidieni. Deiodinaza care eliberează iodul din inelul tirosol din structura hormonilor tiroidieni este o enzimă dependentă de seleniu şi este extrem de importantă pentru transformarea tiroxinei (T4) în triiodotironină (T3), forma cu activitate biologică maximă.

Kravchenko şi colaboratorii (2019) afirmă faptul ca pe lângă seleniu, zincul este implicat în metabolismul hormonilor tiroidieni, prin iodotironin deiodinaza care transformă tiroxina (T4) la triiodotirononă (T3), enzimă care necesită concentrații optime de zinc pentru a funcţiona la capacitate maximă. Conform studiului desfăşurat s-a observat faptul că persoanele cu concentrații serice mai mari de zinc, seleniu, cupru, fier nu au dezvoltat noduli tiroidieni, formaţiuni care sunt de foarte multe ori determinate de deficitul funcţional de hormoni tiroidieni. Deși iodul are un rol definitoriu în aparitia gușei, creșterea concentrației de iod nu determină mereu o scădere a TSH, iar concentrația hormonului T4 nu se modifică doar în prezența iodului ci trebuie să existe concentrații semnificative de iod dar și de alte microelemente.

Cuprul se regăsește în structura enzimelor precum lizil oxidaza, superoxid dismutaza, fiind implicat într-o varietate de reacții metabolice enzimatice. O concentrație scăzută de cupru s-a observat în cazul pacienților cu gușă nodulară, și s-a constatat că acest microelement este esențial pentru sinteza de tiroxină. Studiile arată ca hipotiroidismul se asociază și cu o concentrație scazută de zinc în plasma, dar în acelaşi timp o cantitate excesivă de zinc în plasmă, este corelată cu scăderea nivelului de hormon T4 la bărbați. De asemenea, zincul poate duce la dezvoltarea gușei nodulare în asociere cu o concentrație scazută de iod și seleniu (Kravchenko, 2019).

Osul este un ţesut conjunctiv dur care formează scheletul şi care este într-un proces continuu de remodelare, astfel aproximativ 10% din acesta este schimbat anual. Markerii de metabolism osos, sunt compuşi prezenţi în sânge şi/sau în urină a căror valoare se modifică corespunzător proceselor de resorbţie şi formare osoasă. Dezechilibrul între markerii specifici procesului de resorbţie şi cei de formare osoasă, caracterizează procesul de distrucţie osoasă. Răspunsul corect al pacienţilor la terapia de refacere osoasă poate fi evidenţiat prin refacerea echilibrului între cele două categorii de markeri.

Matricea osoasă conţine o cantitate crescută de colagen de tip I care formează, alături de proteoglicani, suportul pe care se fixează hidroxiapatita (hidroxifosfatul de calciu) şi fluoroapatita (fluorofosfatul de calciu).

Cele mai importante celule implicate în metaboslimul osos sunt oseoblastele şi osteoclastele. Osteoblastele fiind responsabile de formarea structurilor osoase noi, dar acestea iniţial declanşează procesul de resorbţie osoasă prin activarea osteoclastelor. Acestea din urmă, vor determina eliberarea unei mici cantităţi de calciu în zona care trebuie refăcută, de asemnea utilizează enzime proteolitice şi compuşi cu caracter acid pentru a degrada şi matricea osoasă care trebuie înlocuită.

Osteoblastele declanşează apoi procesul de refacere osoasă cu sinteza de noi proteine şi compuşi din structura matricei, care vor fi mineralizate prin fixarea de fosfaţi de calciu.

La organismle tinere procesul de formare osoasă este rapid şi intens, astfel oasele cresc în dimensiuni într-un timp relativ scurt, devin mai dense şi mai rezistente.

Fenomenul fiziologic de distrugere a ţesutului osos se declanşează în intervalul 25-30 de ani, dependent de starea fiziologică a fiecărui individ şi este mai evident la femie deoarece acestea au un ţesut osos cu o densitate uşor mai mică comparativ cu cel al abărbaţilor.

Cea mai frecventă afecţiune caracterizată prin demineralizare osoasă este osteooroza, dar fenomenul este întâlnit şi la pacienţii cu artrită reumatoidă, hiperparatiroidism, sindrom Cushing, afecţiuni renale cronice, mielm multiplu, sau consecutiv adminitrării de medicamente cum sunt glucocorticoizii.

Procesul de demineralizare osoasă se evaluaeză, în mod frecvent în practica clinică prin testele de evaluare a densităţii osoase, cum sunt testul DEXA, dar acesta este dificil de aplicat pentru evaluarea în dinamică a răspunsului la terapie în cazul osteoporozei sau a altei afecţiuni caracterizate prin demineralizare osoasă.

Analizând datele din literatura de specialitate, care include rezultatele studiilor experimentale şi clinice, au fost identificaţi markeri care ar putea fi utilizaţi în laboratorul clinic pentru a evalua procesele de resorbţie şi refacere osoasă: telopeptidul C-terminal al colagenului de tip 1, propeptidul N-terminal al procolagenului de tip 1, telopeptidul N-terminal al colagenului de tip 1, deoxipiridinolina (DPD; este un marker al procesului de distrugere a colagenului), priridina legată încrucişat, fosfataza acidă rezistentă la tartrat (este enzima produsă de osteoclaste şi are specificitate osoasă), fosfataza alcalină osoasă (valoarea este dependentă de funcţionalitatea osteoblastelor) sau osteocalcina (este corelată pozitiv cu procesul de formare osoasă).

Telopeptidul C-terminal al colagenului de tip 1, este un marker al resorbţiei osoase care se determină din serul pacienţilor şi reprezintă fragmentul peptidic C-terminal al colagenului. Acesta se utilizează pentru evaluarea răspunsului osului la terapia anti-resorbtivă cu bifosfonaţi sau terapia hormonală de substituţie la femeile aflate la menopauză şi care primesc diferite formule cu estrogeni.

Propeptidul N-terminal al procolagenului de tip 1 este un marker de refacere osoasă. Acesat este produs de osteoblaste şi indică rata de sinteză a colagenului şi de formare a ţesutului osos. Este considerat unul dintre cei mai sensibili markeri pentru fenomenul de formare osoasă şi este foarte util pentru evaluarea răspunsului terapeutic la anti-resorbtive osoase. Se recomandă determinarea acestuia la intervale de 3 sau 6 luni pe parcursul terapiei.

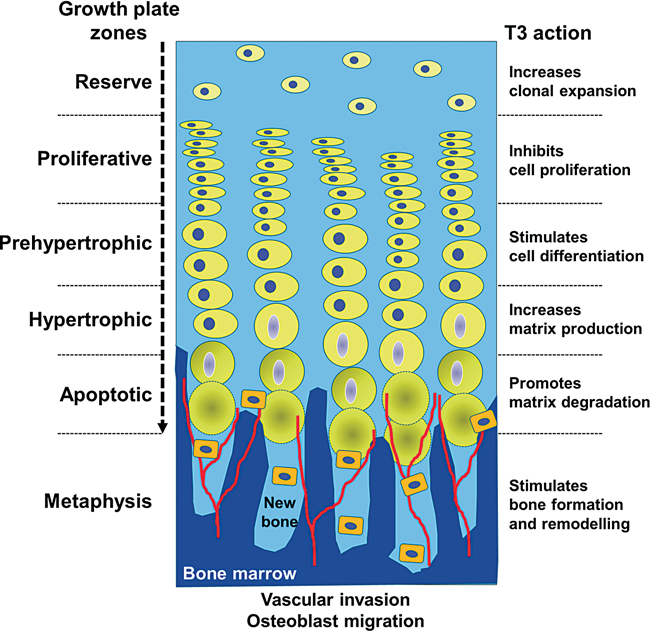
Dificultatea determinării acestora derivă din preţul destul de ridicat al reactivilor utilizaţi, de costul aparaturii necesare sau lipsei acestor instrumente în laboratoarele de specialitate.

Țesutul osos reprezintă un sistem de interconectare celulară în continuă dinamică microscopică, prin activitățile de resorbție și formare, datorită acțiunii osteoclastelor, osteoblastelor, celulelor de captușeală osoasă și a osteocitelor. Țesutul osos este și un depozit pentru o serie de micro- și macroelemente, precum și enzime specifice precum fosfataza alcalină și dipeptidil peptidaza 3 (DDP3). Studiile arată rolul neredundant al DPP3 în menținerea homeostaziei osoase, dar susţin şi ipoteza confrom căreia DPP3 reprezintă un posibil factor osteoimunologic și un marker al fenomenelor patologice din osteoporoză la om. Studiile efectuate pe diferite modele animale, au evidenţiat o modificare a structurii matricei osoase consecutiv scăderii concentrației de DDP3 prin creșterea concentrației de specii reactive de oxigen și reducerea nivelului de factor de transcripție nucleară 2 (Florencio-Silva, 2015; Menale, 2019).

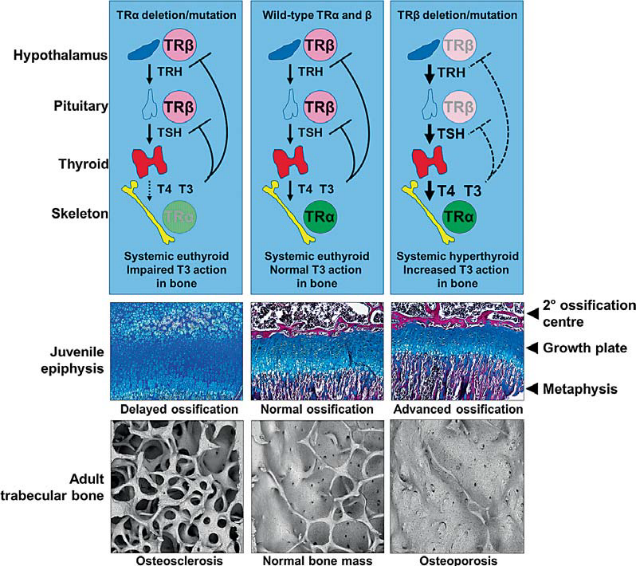
Conform studiilor desfăşurate de McCarty (1995), hormonul paratiroidian (PTH) influențează activitatea osteoclastelor determinând resorbția osoasă, doar în prezența osteoblastelor. Deși hormonul paratiroidian are receptori la nivelul osteoclastelor, în mod necaracteristic, PTH-ul trimite un semnal osteoblatelor şi accelerează resorbția osoasă. Acest efect al PTH asupra osteoblastelor este mediat de mesageri secunzi: protein kinaza C și AMPc.

Activitatea osteoclastică depinde de stimularea protein kinazei C de către PTH. Deoarece insulina este implicată în sinteza colagenului cu ajutorul osteoblastelor, o proteină atât de importantă în menținerea structurii osoase, iar secreția unei cantități optime de insulină este asigurată și de crom, cromul, în mod indirect, joacă un rol important în mineralizarea osoasă. Totodată cromul reduce eliminarea urinară de săruri de calciu, diminuează abilitatea PTH-ului de a activa osteoclastele, astfel reducând resorbția și crescând densitatea osoasă prin stimularea osteoblastică, dar în mod compensatoriu are loc o creștere a nivelului de PTH (McCarty, 1995).

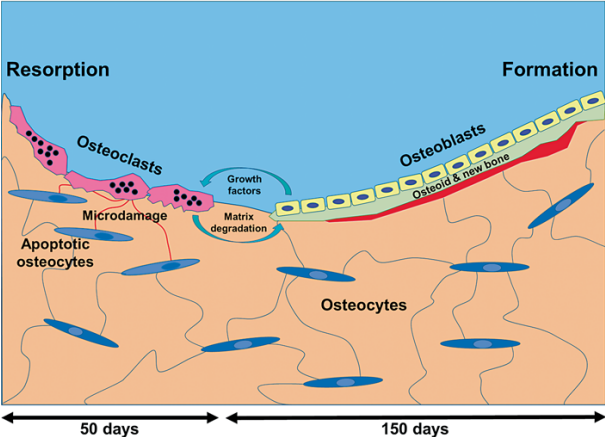
Alte studii au cercetat importanța deoxipiridinolinei (DPD) ca marker în turnover-ul osos. DPD stabilizează lanțurile de colagen din matricea extracelulară conferind structura normală a osului. S-a observat ca deoxipiridinolina se regăsește doar în structura dentinei și a tipului 1 de colagen al osului. Acesta marker este folosit pentru a observa deformările apărute prin resorbție ale țesutului osos din timp, determinându-se prin urină, totodată stabilindu-se o corelație între DPD și densitatea minerală osoasă. Conform studiilor este recunoscut ca fiind un marker foarte sensibil de evidențiere al resorbției osoase. Practic markerii de remodelare osoasă sunt de ajutor pentru diagnosticarea precoce a osteoporozei. Acești markeri sunt de fapt enzime eliberate de obsteoclaste în timpul procesului de resorbție osoasă sau chiar proteine ale matricei osoase. (Sav NM, et al. 2017; Park SG, et al. 2018)



Influența horminilor tiroidieni asupra formării oasoase și a ratei de maturare a osteocitelor (Williams, 2012)



Influența TR alfa asupra hormonului T3 cu acțiune asupra osului (Williams, 2012)



Ciclul de remodelare osoasă (Williams, 2012)

Datele statistice arată că la vârsta de 15-24 ani, persoanele de gen masculin au o incidență de 200 la 10.000, care au suferit o fractură traumatică, iar femeile au o incidență de doar 40 la 10.000. Totuși în jurul vârstei de 50 de ani, femeile suferă o incidență mai mare a fracturilor osoase tocmai din cauza apariției osteoporozei, astfel incidența este de 450 la 10.000 de femei, iar în jurul vârstei de 85 de ani, s-a raportat incidența de 350 la 10.000.

Datele arată că în jurul vârstei de 50 de ani, riscul de a suferi o traumă minoră osteoporotică este de 53% la femei și 21% la bărbați. Fracturile de șold și coloană cresc în incidență după vârsta de 85 de ani cu 4% la femei și doar cu 2% la bărbați. Aceste date au fost extrase de la populația Angliei.

Internațional s-au observat diferențe în ceea ce privește incidența fracturilor osteoporotice. Astfel la populația vârstnică apariția fracturilor a fost de 200 de ori mai frecventă în rândul femeilor și de 140 de ori în cazul bărbaților, incidență mare în America de Nord și Europa, incidența scăzând în Africa. (Aspray, Hill 2019)

S-au studiat 222 de persoane, la care ulterior s-a observat un procent de 76,6% care sufereau de hipertiroidism din acest procent 70,3% erau femei, iar 29,7% au fost bărbați. Conform statisticilor riscul de apariție a unei boli tiroidiene este mai mare la genul feminin. În ceea ce privește vârsta, s-au inregistrat pacienți cu vârsta cuprinsă între 15-80 de ani cu o medie de 38,7 ± 14,7 ani, respectiv 37,7 ± 14,5 pentru femei și 41,2 ± 15 pentru bărbați nefiindo diferență statistică semnificativă pentru aceste grupuri.

DGenul și vârsta pentru 222 pacienți cu boala Graves

| **Vârsta** | **<40 ani** | **>40 ani** | **Total** |
| --- | --- | --- | --- |
| Femei | 100 (45%)\* | 56 (25.2%) | 156 (70.3%) |
| Bărbați | 32 (14.4%)\* | 34 (15.3) | 66 (29.7%) |
| Total | 132 (59.5%) | 90 (40.5%) | 222 (100%) |

\* *P*<0.05

(Waghieh 2020)

***1.2. Justificarea alegerii temei***

Osteoporoza este o afecţiune din ce în ce mai răspândită şi care afectează în special femeil aflate la postmenopauză, dar acesat nu este o condiţie esenţială. În populaţia generală pot fi detectate cazuri de persoane, de ambşe sexe, cu osteopenie sau cu fragilitate osoasă crescută şi care nus e află într-o etapă a vieţii cu risc de osteoporoză.

Cei mai cunoscuţi markeri biochimici care se determină sunt nivelul calciului şi al 25-hidroxi vitaminei D (ca marker de evaluare a statusului vitaminei D în organism). Aceşti markeri sunt uneori insuficienţi deoarece nivelul calciului poate fi normal în condiţii de demineralizare osoasă. Practic, starea de hipocalcemie determină eliberarea hormonului paratiroidian care va activa osteoclastele cu eliberarea calciului din structura osului pentru a normaliza valoarea calcemiei. Acest fenomen induce o situaţie de falsă de metabolism normal al calciului. De asemenea, derivatul 25-hidroxi vitamina D poate să nu fie transformat în cel 1,25-dihidroxi vitamina D care este forma cu activitate biologică, fenomen întâlnit la pacienţii în vârstă, la cei cu afectare renală sau osoasă (Bikle, 2012; Weaver, 2016).

Aceste date impun necesitatea identificării unor noi markeri biochimici de evauare a procesului de demineralizare osoasă, eventual a unor markeri, sau a unor valori ale markerilor cunoscuţi care să poată evidenţia fenomene de demineralizare osoasă înainte de instalarea unor forme evidente de ostepenie sau osteoporoză.

Studiile pe care imi propun să le desfăşor în cadrul cercetării doctorale vor urmări identificarea unor astfel de markeri, optimizarea metodei de dozare a acestora cu scopul utilizării lor în viitor în practica clinică sau în cerectarea medicală.

Alături de markeri vor fi determiante concentraţiile serice ale microelementelor care sunt importante pentru sănătatea structurii osoase.

De asemenea, osteoporoza şi osteopenia sunt fenomene frecvent întâlnite la femei aflate în perioada post menopauză, perioadă în care se observă şi o creştere a frecvenţei afecţiunilor tiroidiene. Stabilirea unei corelaţii între cele două disfuncţii hormonale şi osoase, ar putea creşte rata de diagnostic precoce mai ales a afecţiunilor osoase care sunt mult mai puţin evidente din punct de vedere clinic. În fază incipientă, comparativ cu cele tiroidiene.

***1.3. Contribuţii originale propuse de cercetarea doctorală***

Identificarea markerilor de afectare osoasă, a căror valoare se modifică în funcţie de nivelul hormonilor tiroidieni şi de nivelul microelementelor esenţiale pentru sănătatea osoasă sunt elementele de originalitate pe care sperăm să le evidenţiem la finalizarea studiilor incluse în prezentul proiect ştiinţific.

Evidenţierea prin teste biochimice a relaţiei dintre microelemente, hormoni tiroidieni şi markerii de remodelare osoasă, va permite abordarea pe baza unor noi criterii biochimice şi farmacologice a pacienţilor cu afecţiuni tiroidiene la care există riscul de dezvoltare a osteoporozei.

Avantajul utilizării testelor biochimice derivă din posibilitatea aplicării acestora mult mai frecvent compartiv cu testul DEXA, astfel aceşti markeri pot fi determinaţi la intevale scurte de 3, maxim 6 luni, pe când testul DEXA se efectuează în mod frecvent la un interval de doi ani, sau uneori la un an.

**2. Modul de organizare a cercetării doctorale**

***2.1. Obiectivele cercetării doctorale***

Cercetările care urmează a fi desfăşurate pe parcursul pregătirii doctorale, sunt organizate în funcţie de obiectivele urmărite şi care sunt prezentate în tabelul următor:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **2021**  **2022** | 1. Stabilirea corelaţiei microelemente-markeri tiroidieni-markeri de stres oxidativ. | - stabilirea loturilor de studiu  - determinarea concentraţiei microelementelor serice relevante pentru funcţia tiroidiană  - determinarea unor markeri de stres oxidativ |
| **2022**  **2023** | 1. Stabilirea corelaţiei microelemente- markeri ai metabolismului ososos.  2. Stabilirea corelaţiei dintre stresul oxidativ şi remodelarea osoasă.  3. Diseminarea rezultatelor | - identificarea şi determinarea unor markeri ai metabolismului osos  - determinarea concentraţiei microelementelor serice relevante pentru metabolismul osos  - determinarea markerilor de stres oxidativ  - publicarea rezultatelor ştiinţifice |
| **2024** | 1. Stabilirea corelaţiei microelemente-hormoni tiroidieni-markeri ai metabolismului osos-markeri de inflamaţie.  2. Diseminarea rezultatelor  3. Redactarea lucrării de doctorat | - determinarea microelemntelor, markerilor tiroidieni  - determinarea unor markeri de inflamaţie  - publicarea rezultatelor ştiinţifice  - analiza şi integrarea rezultatelor în vederea elaborării lucrării de doctorat. |

***2.2. Metode şi tehnici de lucru utilizate***

*Determinarea concentraţiei microelementelor* - se va realiza prin spectrometrie de absorbţie atomică. Probele de ser vor fi mineralizate şi vor fi determinate microelementele (cupru, zinc, fier, mangan) din soluţiile realizate. Serul se tratează cu acid nitric la cald pentru a transforma proteienele, carbohidraţii şi lipidele prezente în probă în compuşi anorganici. Mineralizatul este diluat cu apă bidistilată şi se analizează prin spectrofotometrie de absorbţie atomică. Conţinutul în microelemente al probelor de analizat se stabileşte utilizând o curbă de calibrare realizată cu soluţii standard de microelemente.

*Determinarea proteinelor totale (metoda Lowry)*: proteinele prezente în probă reacţionează cu sulfatul de cupru şi formează în prezenţa reactivului Folin-Ciocâlteau un compus de culoare albastră cu absorbanţă maximă la 660 nm. Concentraţia proteinelor se calculează utilizând o curbă de calibrare preparată cu soluţii standard de albumină (Lowry, 1951).

*Determinarea markerilor de stres oxidativ* - vor fi determinate superoxid dismutaza şi catalaza eritrocitară prin metode spectrofotometrice în vizibil.

*Determinarea superoxid dismutazei*: (SOD; metoda RANSOD): anionul radical superoxid format sub acţiunea xantinoxidazei, determină transformarea clorurii de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazoliu (INT) într-un formazan de culoare roşie cu absorbanţă maximă la 505 nm. Activitatea superoxid dismutazei se detemină prin evaluarea gradului de inhibiţie a oxidării INT. După omogenizarea amestecului de reacţie se citeşte absorbanţa la 30 de secunde şi la 3 minute, valori care se utilizează pentru calculul activităţii SOD exprimată în U/mg proteine (Randox - Superoxide dismutase).

*Determinarea catalazei*: catalaza prezentă în probă descompune peroxidul de hidrogen cu scăderea absorbanţei soluţiei la 240 nm. Se notează timpul necesar pentru a reduce absorbanţa soluţiei de la 0,45 la 0,40, valoarea se utilizează pentru calculul activităţii catalazei exprimată în U/mg proteine (Aebi, 1984).

*Determinarea markerilor ai metabolismului osos*

În funcţie de finanţarea acordată pentru desfăşurarea studiilor doctorale vor fi selectaţi markerii ce urmaeză a fi determinaţi. Se intenţionează dezvoltarea şi validarea unei metode HPLC sau electroforetice pentru determinarea unor astfel de markeri, ca de exemplu deoxipiridinolina.

*Determinarea markerilor tiroidieni* - se va determina valoarea TSH şi a fT4 prin metode bazate pe chemimunoluminescenţă.

Una dintre metode ar fi testul ELISA în chimioluminiscență care implică o procedură de extracție și o tehnică ELISA, folosind un reactiv chimioluminiscent îmbunătățit. Această tehnică prezintă 3 metode de lucru: testul ELISA direct, indirect, respectiv sandwich ELISA. În principal se bazează pe identificarea probei de cercetat (hormoni tiroidieni în cazul acesta) prin intermediul unor anticorpi specifici care prezintă pe suprafața lor o enzimă care după ce se adaugă un substrat va forma un compus colorat luminiscent, astfel identificând și pozitivând prezența antigenului/a probei de cercetat.

*Modul de selecţie al loturilor de lucru*

Loturile de pacienţi care vor fi incluse în studiu, vor fi selectate în funcţie de următoarele criterii de includere: afecţiuni tiroidiene diagnosticate (hiper- sau hipotiroidism), deficit de densitate osoasă (diagnosticat). Pacienţii vor fi incluşi în cele două loturi în funcţie de afecţiunea diagnosticată. Criteriile de excludere: prezenţa unor alte afecţiuni asociate, terapie cu medicamente care influenţează nivelul microelementelor, a hormonilor tiroidieni sau care pot induce modificări ale metabolismului osos.

*Metode de prelucrare statistică*

Datele obţinute vor fi prelucrate statistic prin testul ANOVA.

***2.3. Detalierea etapelor de lucru***

A.1.2. - 2021 - Depunerea documentaţiei şi obţinerea avizului Comisiei de Etica cercetării, a Universităţii de Medicină şi Farmacie „Grigore T. Popa” din Iaşi.

A.1.1. - 2021, 2022, 2023. - stabilirea loturilor de pacienţi care vor fi incluşi în studiu. Obţinerea consimţământului informat. Activitatea se va desfăşura în mod continuu pe parcursul studiului.

A.1.2. - 2021, 2022 - determinarea concentraţiei microelementelor serice relevante pentru funcţia tiroidiană. Se va determina concentraţia iodului, cuprului, fierului şi zincului în serul pacienţilor cu afecţiuni tiroidiene, dar şi în serul martorilor sănătoşi.

A.1.3. - 2021, 2022 - determinarea unor markeri de stres oxidativ - din probele de sânge recoltate de la pacienţi, se vor determina markeri serici şi eritrocitari.

A.1.4. - 2022 - diseminarea rezultatelor.

A.2.1. - 2022 - dezvoltarea şi validarea unei metode HPC de determinare a deoxipiridinolinei.

A.2.2. - 2022 - determinarea valorii deoxipiridinolinei a pacienţi cu deficit de mineralizare osoasă.

A.2.3. - 2022, 2023 - determinarea concentraţieie microelementelor relevante pentru metabolismul osos la pacienţii cu deficit de mineralizare osoasă.

A.2.4. - 2022, 2023 - determinarea markerilor de stres oxidativ la pacienţii cu deficit de mineralizare osoasă.

A.2.5. - 2023 - diseminarea rezultatelor.

A.3.1. - 2024 - Stabilirea corelaţiilor dintre rezultatele determinate la pacienţii cu afecţiuni tiroidiene şi cu deficit de mineralizare osoasă.

A.3.2. - 2024 - analiza şi integrarea rezultatelor în vederea elaborării lucrării de doctorat.

A.3.3. - 2024 – redactarea tezei de doctorat.

***2.4. Măsuri prevăzute pentru respectarea normelor de bioetică în cercetarea doctorală***

Loturile de studiu vor fi realizate în funcţie de patologia tiroidiană sau osoasă, iar inlcuderea pacienţilor în loturile respective va fi condiţionată de obţinerea consimţământului informat. Datele personale ale pacienţilor vor fi prelucrare după obţinerea de la aceştia a acordului de utilizare a datelor cu caracter personal şi vor fi cunoscute doar de echipa de cerectărori implicată în desfăşurarea proiectului.

Conţinutul informaţional al formularului de consimţământ informat şi protocolul de desfăşurare a studiilor sunt anexate prezentului proiect ştiinţific. Documentele vor fi înaintate către Comisia de Etica cercetării, a Universităţii de Medicină şi Farmacie „Grigore T. Popa” din Iaşi, în scopul obţinerii avizului pentru desfăşurarea cercetărilor. După obţinerea avizului vor fi demarate studiile incluse în prezentul proiect ştiinţific.

Publicarea rezultatelor cercetării în reviste de specialitate sau prezentarea de lucrări ştiinţifice la manifestări de specialitate va fi efectuată fără a prezenta datele cu caracter personal ale pacienţilor.

Diseminarea rezultatelor cercetărilor ştiinţifice va fi realizată doar după obţinerea acordului de publicare sau prezentare a rezultatelor cercetării, de la cercetătorii care au fost implicaţi în anumite etape de derulare a prezentului proiect de cercetare.

***2.e. Programarea (estimativă) a susţinerii celor două rapoarte ştiinţifice***

Cele două referate care sunt prevăzute de Regulamentul de desfăşurare a studiilor doctorale, vor fi susţinute în: septembrie 2022 şi septembrie 2023.

**3. Modul în care realizarea tezei de doctorat va contribui la evoluţia profesională a doctorandului şi la dezvoltarea capacităţii cognitive a acestuia**

Pe parcursul studiilor de cercetare doctorală consider că informațiile acumulate vor conduce atât la obținerea unor rezultate care vin în ajutorul pacienților cu patologii tiroidiene şi/sau osoase, cât și la dezvoltarea profesională și intelectuală în vederea unei cariere universitare sau alte domenii de cercetare.

Studiile experimentale desfăşurate în diferite colective din laboratoarele de cercetare sau medicale imi va permite dezvoltarea de abilităţi practice noi, participarea la discuţii ştiinţifice, analiza ipotezelor de lucru împreună cu alţi cercetători, dezvoltarea abilităţilor de comunicare şi lucur în echipă.

Prezentarea rezultatelor ştiinţifice la manifestări ştiinţifice din domeniul farmaceutic şi medical îmi vor permite partciparea directă la schimbul de idei, analiza de către alţi cercetători a rezultatelor obţinute şi eventual identificarea unor noi oportunităţi de cerectare şi colaborare ştiinţifică.

**4. Dificultăţi preconizate, modalităţi de surmontare**

Desfăşurarea unui proiect de cercetare doctorală este în mod continuu spus unor riscuri datorită experienţei doctorandului care este în continuă dezvoltare. Pentru a reduce astfel de riscuri toate studiile care urmează a fi desfăşurate vor fi foarte atent evaluate şi se va discuta cu cercetătorii implicaţi.

Desfăşurarea studiilor în care sunt implicaţi subiecţi umani implică riscul identificării în timp util şi a înregistrării acestora în grupele de studiu. De aceea, etapele în care sunt incluse astfel de studii au fost repartizate în ani consecutivi pentru a reuşi includerea unui număr suficient de pacienţi care să permită şi interpretarea statistică a rezultatelor obţinute.

Un studiu este expus şi unor riscuri financiare şi materiale, având în vedere suma alocată pentru desfăşurarea cercetărilor doctorale şi modificările de pe piaţa reactivilor şi a materialelor de laborator. Pentru a reduce un asfel de risc, se va stabili foarte atent necesarul de materiale şi se vor optimiza metodele de lucru pentru a reduce consumurile nejustificate.

Diseminarea rezultatelor reprezintă un risc foarte mare, din punct de vedere al încadrării ritmului de publicare în perioada de desfăşurare a studiilor doctorale, acest risc este frecvent observat şi la alţi doctoranzi. Pentru reduce presiunea publicării, obţinerea de rezultate va fi urmată în mod optim de publicarea acestora în publicaţii de specialitate care au fost identificate anterior.

**5. Valorificarea rezultatelor**

Rezultatele obținute în cadrul acestei teme de cercetare vor fi valorificate prin: participarea la conferințe, naționale sau internaționale cu lucrări științifice, publicarea de lucrări științifice în reviste ISI (exemple de reviste: Polymers, Journal of Controlled Release, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics) sau BDI și prezentarea celor două rapoarte de cercetare științifică.

**Bibliografie**

1. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzimology* 1984; 105:121-126.
2. Aspray T. J., & Hill T. R.Osteoporosis and the Ageing Skeleton. *Methods in Molecular Biology,* 2019;453–476.
3. Basset DJH, Williams GR. Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance. *Endocr Rev* 2016; 37(2):135-187.
4. Bikle DD. Vitamin D and Bone. *Curr Osteoporos Rep* 2012; 10(2):151-159.
5. Brancatella A, Marcocci C. TSH suppresive therapy and bone. *Endocr Connect* 2020; 9(7):R158-R172.
6. Fitzgerald SP, Bean NG. Thyroid stimulationg hormone (TSH) autoregulation reduces variation in the TSH reponse to thyroid hormones. *Temperature (Austin)* 2018; 5(4):380-389.
7. Florencio-Silva R, Rodrigues da Silva Sasso G et al. Biology of bone tissue: structurem function and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015:421746.
8. Hu YM, Boehm DM, Chung H, Wilson S, Bird AJ. Zinc-dependent activation of the Pho8 alkaline phosphatase in Schizosaccharomyces pombe. J Biol Chem 2019; 294(33):2392-12404.
9. Jia Y, Son K, Burris WR et al. Forms of selenium in vitamin-mineral mixes differentially affect serum alkaline phosphatase activity, and serum albumin and blood urea nitrogen concentrations, of steers grazing endophyte-infected tall fescue. *J Anim Sci* 2019; 97(6):2569-2582.
10. Kravchenko VI, Andrusyshyna IM, Luzanchuk IA, Polumbryk MO, Tarashchenko YM. Association between thyroid hormone status and trace elements in serum of patients with nodular goiter. *Biol Trace Element Research* 2019; 12011-019-01943-9.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 1951; 193(1):265-275.
12. Masaoutis C, Theochairs S. The role of exosomes in bine remodeling: Implications for bone physiology and disease. *Disease Markers* 2019; 2019:9417914.
13. McCarty MF. Anabolic effects of insulin on bone suggest a role for chromium picolinate in preservation of bone density. *Medical Hypotheses* 1995; 241-246.
14. Medeiors DM. Copper, iron and selenium dietary defeciencies negatively impact skeletal integrity: A review. *Exp Biol Med (Maywood)* 2016; 241(12):1316-1322.
15. Menale C, Robinson LJ, Palagano E et al. Absence of dipeptidyl peptidase 3 increase oxidative stress and causes bone loss. *Journal of bone and mineral research* 2019; 2133-2148.
16. Michalska-Mosiej M,Socha K, Soroczynska J, Karpinska E, Lazarczyk B, Borawska MH. Selenium, Zinc, Copper and Total Antioxidant Status in the Serum of patients with chronic Tonsillits. *Biol Trace Elem Res* 2016; 173:30-34.
17. Odabasi E, Turan M., Aydin A, Akay C, Kutlu M. Magnesium, zinc, copper, manganese and selenium levels in postmenopausal women with osteoporosis. Can magnesium play a key role in osteoporosis? *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37:564-7.
18. Park SG, Jeong S., Lee JH, Ryu SH, Jeong HJ, Sim YJ., Kim C. The Changes of CTX, DPD, Osteocalcin, and Bone Mineral Density During the Postmenopausal Period. *Annals of Rehabilitation Medicine* 2018;42(3), 441–448*.*
19. Sav NM, Kendirci M, Akin L, & Kurtoglu S. Urinary levels of pyridinoline and deoxypyridinoline and bone mineral density in children with type 1 diabetes mellitus. *Endocrine Research*, 20174; 2(4): 281–286.
20. Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int* 2015; 2015:628368.
21. Wagieh S, Salman K, Bakhsh A, Talaat O, Morsy S, Al-Ezzi M, Hamid G, Al-Juhani N. Retrospective study of Tc-99m thyroid scan in patients with Graves’ disease: Is there significant difference in lobar activity? *Indian J Nucl Med* 2020; 35:122-129.
22. Weaver CM, Alexander DD, Boushey CJ, Dawson-Hughes B et al. Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2016; 27:367-376.
23. Williams, G. R. Thyroid Hormone Actions in Cartilage and Bone. *European Thyroid Journal* 2012.