Univerza v Mariboru

OKVIRNI PROGRAM USPOSABLJANJA MLADEGA RAZISKOVALCA (MR)[1]

1. OSNOVNI PODATKI

Ime in priimek mentorja:	**Izr. prof. dr. Tomaž Langerholc**	Evidenčna številka mentorja pri ARIS (SICRIS):	**23574**
E-naslov mentorja:	tomaz.langerholc@um.si	Tel. štev. mentorja:	+386 (0)2 3209054
Ime in priimek vodje raziskovalnega programa:	Prof. dr. Dejan Škorjanc	Evidenčna številka vodje RP pri ARIS (SICRIS):	01364
Naziv raziskovalnega programa:	Raziskave za zagotavljanje varne hrane in zdravja	Evidenčna številka RP pri ARIS (SICRIS):	P1-0164
Članica Univerze v Mariboru (RO UM), kjer bo potekalo usposabljanje:	Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede	Evidenčna številka RO UM pri ARIS (SICRIS):	0482
Oznaka raziskovalnega področja po klasifikaciji ARIS:	1.05 Biokemija in molekularna biologija	Oznaka raziskovalnega področja po klasifikaciji Ortelius:	7.3. Biochemistry; ID=49

2. OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA IN CILJEV DOKTORSKE RAZISKAVE[2]

Izhodišče raziskovalne naloge mladega raziskovalca in njena umestitev v raziskovalni program v katerega je vključen mentor, delovna hipoteza, cilji raziskave in predvideni rezultati s poudarkom na izvirnem prispevku k znanosti:

Naslov: Znotrajcelični mehanizmi delovanja izbranih antioksidantov

Izhodišče

Antioksidanti so že desetletje precej pogosta tema v znanosti in hkrati zanimivo področje za industrijo in razvoj prehranskih dopolnil. Različni tipi sintetičnih in naravnih antioksidantov so eni najbolj razširjenih prehranskih dodatkov za ljudi. Smisel dodajanja antioksidantov v prehrano utemeljujejo z nižanjem prostih radikalov, ki so zaradi svoje reaktivnosti odgovorni za poškodbe biološko

[1] *Izraz mladi raziskovalec je zapisan v moški slovnični obliki in je uporabljen kot nevtralen za ženske in moške.*

[2] *Raziskovalni in študijski program usposabljanja morata biti skladna z vsebino raziskovalnega programa, katerega član je mentor.*

pomembnih molekul, med njimi tudi celične DNA. Poškodbe DNA na daljši rok lahko privedejo do tumorskih obolenj. Novejše raziskave kažejo, da antioksidanti vplivajo tudi na celično signalizacijo preko sprememb redoks potenciala v celici. Pokazano je tudi, da nizek redoks potencial ni vedno dobrodošel, saj vpliva na metabolizem (nastanek energije v mitohondrijih, nivo ATP) ter znižuje hitrost regeneracije mišic. Oksidativni stres v celicah je normalen pojav, ki pa ga je potrebno držati v primernih koncentracijskih okvirih. Ker so tudi antioksidanti po svoji naravi šibki oksidanti, tudi sami lahko povzročajo oksidativni stres, zato je pomembno njihovo doziranje.

Umestitev v raziskovalni program

Antioksidanti so pomembne sestavine v naši prehrani, saj uravnavajo oksidativni stres v celicah in s tem vplivajo na procese staranja in poškodbe celic. Tematika je direktno vezana na raziskovalni program "P1-0164 Raziskave za zagotavljanje varne hrane in zdravja" in raziskuje mehanizme, ki vplivajo na optimalno doziranje antioksidantov glede doseganja zdravja celic in s tem celotnega organizma.

Problem

Antioksidativni potencial substanc se običajno določi z uporabo kemijskih testov (FRAP, ORAC, DPPH itd.). Ti preprosti testi nikakor ne odražajo dejanske učinkovitosti antioksidantov na nivo oksidativnega stanja v celici. Potrebno je namreč upoštevati, da morajo biti antioksidanti za svoje delovanje najprej absorbirani iz hrane v črevesju in v tkivih iz krvi preko aktivnega/pasivnega prenosa preko celične membrane, znotraj celice pa morajo loviti določene tipe radikalov in oksidantov (NO, NOO·, $O_2^{\cdot-}$, OH·). Istočasno so podvrženi znotrajcelični farmakokinetiki, t.j. izločanju iz celice in metabolizmu.

Delovne hipoteze

1. Izbrani antioksidanti imajo različne stopnje absorpcije in privzema v celice
2. Izbrani antioksidanti se razlikujejo glede na mehanizem znotrajceličnega delovanja in signalizacijskih poti
3. Izbrani antioksidanti se razlikujejo glede učinkovitosti uravnavanja aktivnosti prostih radikalov in s tem posledic njihovega delovanja.

Cilji raziskave in predvideni rezultati s poudarkom na izvirnosti

Znanje o znotrajceličnem dogajanju in učinkovitosti antioksidantov je zelo pomanjkljivo, saj bazira predvsem na kemijskih metodah meritev antioksidativnega potenciala, ki ne odražajo realnega stanja v celicah. Primarni cilj raziskave je določiti privzem oz. znotrajcelično dostopnost, signalizacijske poti in mehanizme delovanja antioksidantov. Novo znanja bi pomenila korak dlje pri pripravi optimalnih mešanic antioksidantov v prehranske namene, s katerimi bi lahko pripravili nove funkcionalne hrane in vplivali na javno zdravje.

Metodologija

Praktični potek raziskav se bo osredotočil na mehanizme delovanja in učinkovitost izbranih antioksidantov na celičnem nivoju. Izbrani bodo antioksidanti iz različnih kemijskih skupin (vitamin C, α-tokoferol, galna kislina, rasveratrol, izbrani polifenoli). Slednji se bodo kot čiste substance ali pa z uporabo simulacije *in vitro* prebave z uporabo umetnih prebavnih sokov testirali glede absorpcije v izbranih epitelnih celicah črevesja. Kot celice bomo uporabili najbolj uporabljeno kancerogeno epitelno celično linijo Caco-2. Slednjo bomo gojili v 2D-obliki na mikrotitrskih ploščah, na mikroporozni membrani ali v obliki sferoidov, ki so najbolj podobni fiziološkemu stanju v tkivu. Po dodatku antioksidantov v medij se bo merila njihova časovno odvisna znotrajcelična koncentracija. Dodatno, ob odvzemu antioksidantov iz medija bomo detektirali časovno odvisno nižanje intracelularne koncentracije antioksidantov. Poleg same znotrajcelične koncentracije bomo z uporabo fluorescenčnih barvil (npr. DCFH-DA) merili časovno odvisno koncentracijo posameznih tipov prostih radikalov. Časovne spremembe fluorescence bomo kvantificirali preko mikrotitrskega čitalca, pretočne citometrije (ki omogoča tudi meritev porazdelitve po celicah) in v primeru sferoidov tudi konfokalne mikroskopije. Preko uporabe več barvil oz. markerjev za mitohondrije, ATP, redoks potencial, kromosomske poškodbe (marker H2A) in signalizacijske poti (NFkb, Jnk, STAT) v celici in z uporabo pretočne citometrije ter Agilent-Seahorse analizatorja bomo dobili vpogled v celovito

znotrajcelično dogajanje v prisotnosti antioksidantov. Preko sekveniranja naslednje generacije je možno vključiti še spremembe v transkripciji genov. Časovni poteki antioksidativne dejavnosti izbranih antioksidantov se bodo matematično modelirali.

Izvedba in potrebna znanja
Poskusi s celičnimi linijami so izvedljivi v laboratorijih FKBV. Zaradi potrebnih analiz in instrumentov bo potrebna povezava z drugimi fakultetami UM (FKKT, MF) ali pa Kemijskim institutom in Institutom Jožef Stefan (IJS) v Ljubljani. Pri matematičnem modeliranju z uporabo nevronskih mrež lahko sodeluje IJS (dr. Livija Tušar). Predvideno je tudi delo v tujini, na področju redoks signalizacije smo že sedaj sodelovali z Medicinsko fakulteto v Nišu.

3. ŠTUDIJSKI PROGRAM

Predvideni študijski program podiplomskega študija v katerega se bo mladi raziskovalec vpisal v študijskem letu 2024/2025:

Kmetijstvo, 3. stopnja na Fakulteti za kmetistvo in biosistemske vede

4. OPIS DEL IN NALOG

Prebiranje literature na temo doktorske naloge; načrtovanje eksperimentov in njihova izvedba v laboratoriju; pisanje člankov; sodelovanje pri pedagoških in raziskovalnih aktivnostih na katedri; sodelovanje pri pisanju projektov

5. ZAHTEVANA STOPNJA IZOBRAZBE

Dokončan magistrski študij II. Stopnje

6. ZAHTEVANA SMER IZOBRAZBE

Študijski programi naravoslovnih smeri

7. KLASIUS SRV

18202 Doktorsko izobraževanje(tretja bolonjska stopnja)/doktorat znanosti (tretja bolonjska stopnja

8. KLASIUS P

0512 Biokemija

9. ZAHTEVANA ZNANJA

Zahtevana so osnovna znanja iz biokemije / biologije celice

10. ZAHTEVANI POSEBNI POGOJI

Ni posebnih dodatnih pogojev

11. ZAHTEVANI JEZIKI

Angleščina (govor, pisanje), vsaj stopnja B2

12. ZAHTEVANE DELOVNE IZKUŠNJE

Zaželene so izkušnje pri delu v laboratoriju, še posebej tehnike sterilnega dela pri delu s celičnimi kulturami

13. PREDVIDENO PODOKTORSKO USPOSABLJANJE

Delo je predvideno do opravljenega doktorata

Podpis mentorja:

_____

Digitally signed by Tomaž Langerholc
DN: C=SI, O=Republika Slovenija, OID.2.5.4.97=VATSI-17659957, CN=SIGEN-CA G2
Reason: I am the author of this document
Date: četrtek, 29. februar 2024 09:01:40

Podpis vodje raziskovalnega programa:

_____

Dejan Škorjanc Digitally signed by Dejan Škorjanc
Date: 2024.02.29 10:08:37 +01'00'

Ime in priimek dekana oz. pooblaščene osebe[3]:

Po pooblastilu dekana prodekan red. prof. dr. Branko Kramberger

Podpis dekana oz. pooblaščene osebe:

BRANKO KRAMBERGER Digitally signed by BRANKO KRAMBERGER
Date: 2024.02.29 11:29:22 +01'00'

Kraj in datum:

[3] Program usposabljanja podpiše dekan članice, na kateri bo potekalo usposabljanje MR.

Hoče 29. 02. 2024

Žig: