

REZUMATUL CU CARACTER NONTEHNIC AL PROIECTULUI

Titlul proiectului

*Microparticulele ca strategii de transport intracelular pentru microARN-uri si
potentiale terapii pentru boala vasculara aterosclerotica*

Durata proiectului

01.10.2015-30.09.2017

Cuvinte-cheie (maximum 5)

Ateroscleroza, Boli Cardiovasculare, Microparticulele derivate de la celule (MPs), Celulele progenitoare endoteliale (EPCs), microARN-urile (miARNs)

Scopul proiectului

Scopul proiectului este acela de a demonstra ca, in boala vasculara aterosclerotica: **(1)** MPs functioneaza ca sisteme de protectie si transport pentru miARNs in circulatie; **(2)** profilul miARNs din MPs este diferit si specific bolii; **(3)** MPs transfera informatia genetica de la celulele de origine la EPCs, mediindu-le functia. De asemenea, vom evidentia diferentele cu privire la transferul de miARNs de catre MPs si MPs derivate de la EPCs (EPC-MPs).

Cercetare de bază: DA

Bioechivalență cercetare translațională și cercetare aplicată: NU

Utilizare regulată și producții de rutină: NU

Protecția mediului înconjurător în interesul sănătății și bunăstării oamenilor și animalelor: NU

Conservarea speciilor: NU

Învățământ superior și instruire: NU

Anchete medico-legale: NU

Menținerea coloniilor cu animale modificate genetic, care nu sunt utilizate în alte proceduri: NU

Descrierea obiectivelor proiectului

Dezvoltarea aterosclerozei si a bolilor cardiovasculare este rezultatul mai multor procese intermediare, in care disfunctia endoteliala si inflamatia vasculara joaca roluri fundamentale. Microparticulele derivate de la celule (MPs), celulele progenitoare endoteliale (EPCs) și microARN-urile (miARNs) au atras un interes major ca biomarkeri si potentiali reglatori pentru boala vasculara aterosclerotica, dar implicarea lor in mecanismele proceselor inflamatorii si in repararea vasculara ramane controversata.

Prin intermediul proiectului propus, scopul nostru este de a oferi dovada-concept ca MPs, in special EPC-MPs, prin capacitatea lor de a transporta o subclasa de miARNs in circulatie si de a le transfera catre celulele tinta (EPCs, ECs), ar putea reprezenta o noua si valoroasa strategie terapeutica pentru medicina regenerativa in BCV. In plus, EPC-MPs ar putea imita efectul celulelor de origine, sugerand ca acestea ar putea fi o abordare terapeutică mai eficientă. De asemenea, proiectul nostru deschide posibilitatea de a transfera miARNs sau ARN-urile mici de interferenta (siARNs) chiar prin intermediul MPs in diferite patologii. **In plus**, celulele modificate pentru a exprima ARNm, miARNs si siARNs, sau proteina pot fi capabile sa transfere aceste macromolecule celulelor din apropierea lor prin intermediul MPs. Aceste celule modificate pot fi

incapsulate pentru a oferi un transfer local sustinut. Pentru ca tehnicile actuale de transfer de gene folosesc agenti virali sau sintetici ca agenti de livrare, inlocuirea lor de catre MPs eliberate de la celulele modificate va oferi avantajul unei abordari lipsite de virusi si perspectivele unei terapii genice mai sigure.

Prin urmare, prezenta propunere de proiect va aduce abordari noi in domeniul MPs ca vehicule de transport major si de protectie pentru miARNs specifice, aflate in circulatie si asociate cu bolile cardiovasculare. In plus, putem promova ideea ca MPs si EPC-MPs, prin continutul lor de miARNs, sunt capabile de a programa celulele stem/progenitoare pentru a repara tesutul vascular lezat.

Pe langa acestea, credem ca, hamsterul este modelul cel mai util, economic si valid pentru studierea aterosclerozei si explorarea unor abordari terapeutice eficiente.

Care sunt potențialele beneficii aduse de către proiect (cum ar putea avansa informațiile științifice sau oamenii ori cum ar putea animalele beneficia de rezultatele acestuia)?

Bolile cardiovasculare (BCV) sunt principala cauza a morbiditatii si mortalitatii in lume. Există diferite cauze ale BCV, dar ateroscleroza si/sau hipertensiunea sunt cele mai frecvente. Factorii de risc ai BCV sunt considerati factori de prognostic ai procesului bolii, in timp ce biomarkerii care anvizajeaza riscul cardiovascular au o baza biologica importanta. Integrarea factorilor de risc ai BCV si a noilor biomarkeri poate imbunatatii stratificarea riscului BCV si managementul bolii. Identificarea MPs in fluidele biologice a deschis noi perspective in diagnosticul, prognosticul si tratamentul patogenezei BCV. Au fost evidentiate mai multe fete ale MPs, ca factori de risc, biomarkeri, noi forme ale comunicarii intercelulare, potientiale mijloace neinvasive de diagnostic, si s-a discutat impactul lor pozitiv si negativ asupra BCV. **Avand in vedere proprietatea naturala a MPs de transfer de informatii genetice, in prezentul proiect, vom investiga pentru prima data, posibilitatea de a exploata MPs in scopuri terapeutice in BCV.** Astfel, pe modelul nostru experimental de boala vasculara aterosclerotica, MPs si EPC-MPs vor avea un rol central ca mijloace de transfer de miARNs in circulatie, specific celulelor de origine si bolii. Abilitatea MPs si a EPC-MPs de a transfera miARNs in celulele tinta (EPCs, ECs) va fi o descoperire inovativa care se extinde asupra rolurilor pe care se considera ca le au miARNs. In consecinta, MPs ar putea induce modificari epigenetice in EPCs, prin transferul de miARNs, reactivand sau moduland programul lor de regenerare tisulara. Astfel, rezultatele vor dezvalui ca MPs ar putea fi într-adevar exploatate ca o noua abordare terapeutica in BCV aterosclerotica. **Vom aduce, de asemenea, dovezi cu privire la diferentele in transferul de miARNs de catre MPs si EPC-MPs. In plus,** aceasta propunere de proiect ne-ar putea ajuta sa ne continuam munca in domeniul MPs/EPCs, pentru a studia si a intelege in profunzime misterele BCV, in special implicarea miARNs, in masura in care suntem hotarati sa consideram acest proiect ca pe o provocare pertinenta cu privire la cercetarea medicala.

In aceste conditii, proiectul nostru de cercetare este de actualitate si poate aduce noi date cu un mare impact asupra sanatatii umane.

Descoperirile noastre ar putea contribui la o mai buna intelegere a participarii MPs/miARNs/EPCs la disfunctiile vasculare si progresia/regresia placii aterosclerotice, si ar putea duce la noi modele experimentale, instrumente, tehnologii si strategii terapeutice pentru ateroscleroza.

Mai mult decat atat, punerea in aplicare a obiectivelor proiectului va creste competenta in cercetarea biomedicala si vizibilitatea stiintei romanesti, va transfera informatiile din laborator catre locul de tratament al pacientilor, va duce la cresterea numarului colaborariilor, precum si la atragerea tinerilor cercetatori in cercetarea biomedicala.

Care este specia utilizată și care este numărul preconizat de animale care va fi utilizat?

Specia utilizata este hamsterul Sirian Auriu (*Mesocricetus Auratus*), mascul.

Numarul de hamsteri va fi de 60, impartiti in 3 subgrupe a câte 20 animale de studiu. Numărul

este minim necesar pentru a asigura interpretarea statistică validă a rezultatelor.

Alegerea numărului de animale se bazează pe experiența anterioară în lucrul cu acest model experimental animal.

În contextul aspectelor realizate pe animale, care ar fi efectele adverse așteptate, gradul de severitate așteptat/probabil și care va fi finalul animalelor;

Gradele de severitate a procedurilor din acest proiect cuprind categoriile: „superficial” (dieta modificată grasă administrată timp de 16 săptămâni; tratamentul prin gavaj/injecție în volum minimal a unui compus/vezicule fără impact major asupra stării animalului), „moderat” (recoltările periodice de sânge din plexul retro-orbitar, sub anestezie generală, pentru analiza unor parametrii biochimici sanguini), iar la finalul proiectului „fără recuperare” (sacrificare pentru prelevare de tesuturi și organe). După fiecare procedură experimentală superficială sau moderată, animalele vor fi lăsate să se refacă, cu respectarea intervalului minim recomandat. Moartea animalelor va surveni prin aducerea acestora în starea de inconștiență cu sedare prealabilă (anestezie generală) și confirmarea încetării permanente a circulației. Animalele nu vor redeveni conștiente înaintea morții. Moartea animalelor ca punct final al procedurilor prevăzute nu poate fi evitată, deoarece obiectivele proiectului prevăd analiza tesuturilor și organelor prelevate de la acestea.

Aplicarea conceptului 3R

Înlocuire

Rezultatele pe care le-am obținut anterior în acest domeniu au utilizat modele experimentale in vitro, de culturi celulare și modele experimentale in vivo, de animale. Studiul pe model animal constituie o etapă intermediară necesară în direcția extrapolării rezultatelor finale la organismul uman.

Prezentul studiu își propune să investigheze microparticulele circulante ca strategii de transport intracelular pentru microARN-uri și potențiale terapii pentru boala vasculară aterosclerotică.

Reducere

Cum vă asigurați că numărul de animale utilizat este minim?

Numărul de animale este minim necesar pentru atingerea obiectivelor unui proiect complex. El este ales în funcție de experiența anterioară și redus astfel încât să se poată face și o statistică corectă a rezultatelor experimentale.

Îmbunătățirea metodelor de creștere, adăpostire, îngrijire și utilizare a animalelor în proceduri

Condițiile de creștere, îngrijire și utilizare includ cuști ventilate individual. Conform reglementărilor CEE, cuștile "Allentown european style IVC type III high (443 x 274 x 231 mmH), 181mm h" pentru hamsteri, cu o suprafață a podelei de 800 cm², asigură suprafața necesară per hamster în funcție de categoria de greutate a acestora, după cum urmează: sub 60g → 150cm² (5-6 capete per cușcă), între 61-100g → 200cm² (4 capete per cușcă), peste 100g → 250 cm² (3 capete per cușcă). Cuștile se situează pe rafturi dotate cu turbosuflete (de admisie și de evacuare a aerului) controlate de microprocesoare. Aerul este filtrat constant, la viteză mică și urmează întotdeauna același sens și traiect, eliminându-se astfel riscurile de contaminare atât între cuști cât și între micromediu (cuști) și macromediu (încăpere). Acest sistem funcționează non-stop și asigură o presiune pozitivă continuă de aer curat în fiecare cușcă, indiferent de numărul hamsterilor din fiecare cușcă și de densitatea cuștilor pe rafturi. Se păstrează temperatura (20-25°C) și umiditatea (30-70%) constante în micromediu, iar schimbările de așternut se fac astfel încât acesta să fie uscat și să se păstreze concentrații foarte scăzute de amoniac la nivelul micromediului. Animalele vor fi menținute cu acces liber la hrana și apa. Cazarea în condiții de control microbiologic moderat al animalelor, la standardele recomandate, permite o refacere

rapidă după prelevarea de probe de sange.

Explicați alegerea speciilor și de ce modelul de animale utilizate este cel mai potrivit ales, având în vedere obiectivele științifice.

Am ales aceasta specie deoarece hamsterul Sirian Auriu prezinta un metabolism lipidic mult mai apropiat de cel uman, comparativ cu alte rozatoare. Astfel, hamsterii prezinta lipoproteine de joasa densitate (LDL) ca transportori de colesterol in circulatie, sintetizeaza enzima de transfer a esterilor de colesterol (soarecii nu sintetizeaza) si alte enzime implicate in metabolismul biliar, similar cu omul. In plus, hamsterul dezvolta placi aterosclerotice ca raspuns la dieta hiperlipidemica, cu localizare in zonele pro-aterogene, similare speciei umane, acestea urmand a fi investigate (localizare, dimensiune, compozitie) prin prezentul proiect.

Explicați măsurile generale care trebuie luate pentru a minimiza răul produs animalelor.

Pentru a reduce la un minim posibil durata și intensitatea suferinței animalelor, folosim în acest proiect:

- Formule moderne de anestezie simplă (isofluran/oxigen) ori mixtă (ketamină/xylazină/acepromazina),
- Utilizarea cutiei cu întuneric la anestezie.
- Utilizarea saltelei cu încălzire pentru compensarea hipotermiei indusă de anestezie.
- Respirația artificială (când este cazul)
- Rehidratarea (când este cazul)
- Metode neinvazive de recoltare a sângelui
- Metode de analiză microcantitative, volumul de sânge recoltat fiind unul minim (sub 1 ml) după caz