

REZUMATUL CU CARACTER NONTEHNIC AL PROIECTULUI

Titlul proiectului: Alterarea barierei hemato-nervoase în diferite tipuri de neuropatii periferice: modificarea expresiei proteinelor joncțiunilor strânse ca marker de diagnostic

Durata proiectului: 2 ani

Cuvinte cheie: bariera hemato-nervoasă, joncțiuni strânse, joncțiuni autotipice, demielinizare, nerv periferic, neuropatii periferice autoimune

Scopul proiectului: Cercetare de bază

Descrierea obiectivelor proiectului:

Elaborarea protocoalelor de lucru; obținerea acordurilor de etică privind utilizarea probelor de țesut uman și utilizarea animalelor de laborator.

Identificarea unor proteine din joncțiunile strânse (JS) din nervul periferic de la pacienți cu neuropatii periferice: claudine 1, 2, 3, 5, 11 (prin IHC și WB).

Identificarea unor proteine din JS din nervul periferic de la pacienți cu neuropatii periferice: Ocludina, ZO-1, JAM-C, Tricelulina (prin IHC și WB).

Identificarea proteinelor JS din nervul periferic de la șoareci cu neuropatie periferică din loturile experimentale: claudine 1, 2, 3, 5, 11, Ocludina, ZO-1, JAM-C, Tricelulina (prin IHC și WB).

Studii preliminare ale unor markeri epigenetici (micro-ARN-uri - miR-21, miR-29b, miR-133, miR-138, miR-124 și SIRT1 și 2) care ar putea interfera cu proteinele de JS investigate (prin RT-PCR, IHC și WB).

Analiza tuturor rezultatelor obținute; studii statistice; concluzii.

Care sunt potențialele beneficii aduse de către proiect

Proiectul propus va aborda un subiect destul de puțin studiat pe plan internațional, dar și mai puțin la noi în țară (cu excepția colectivului care propune această tematică), una din cauze fiind și faptul că neuropatiile periferice sunt boli relativ rare (dacă excludem durerea neuropatică, care apare secundar în multe boli sistemice) iar materialul biologic disponibil pentru cercetări fiind și mai rar - biopsia de nerv este indicată doar în cazuri de dificultăți de diagnostic, în vasculite și, în general, în neuropatii de tip inflamator sau atipice.

Rezultatele estimate vor fi atât științifice, cât și cu impact în diagnosticul/prognosticul pacienților cu neuropatii periferice.

Rezultatele științifice vor aduce date noi cu privire la localizarea și dinamica exprimării proteinelor joncțiunilor strânse din bariera hemato-nervoasă în diferite modificări patologice ale

nervului periferic, atât în experimente coordonate astfel încât să avem un fenomen dinamic și controlat de apariție a procesului patologic, cât și în diferite neuropatii periferice umane.

Rezultatele cu aplicație în diagnostic vor ține de găsirea unor noi biomarkeri, printre proteinele studiate, cu o variație semnificativă și repetabilă în condiții patologice definite, astfel încât să poată fi utilizați în prognosticul procesului de afectare a nervului periferic.

Este posibil ca unii dintre acești biomarkeri să devină chiar ținte terapeutice în studii viitoare.

Studiile preliminare pe anumiți biomarkeri epigenetici din finalul proiectului, vor constitui o bază pentru viitoare analize și experimente în acest domeniu, în cazul în care rezultatele vor fi încurajatoare.

Rezultatele vor fi valorificate prin comunicări științifice la reuniuni științifice în domeniul abordat și prin lucrări științifice publicate în reviste indexate.

Îndeplinirea obiectivelor poate să ducă și la introducerea unor biomarkeri în diagnosticul/prognosticul unor tipuri de neuropatii periferice, cu impact în lumea medicală.

De asemenea, obținerea unor rezultate valoroase va putea duce la stabilirea de noi colaborări interne și internaționale pe plan științific.

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

Se vor folosi 78 șoareci (*Mus musculus*) C57BL/6, nealterați genetic, după cum urmează: câte 39 animale pentru fiecare experiment (neuropatie diabetică și/sau neuropatie inflamatorie). Numărul estimat de animale are la baza experiența personală și datele din literatură. Considerăm că vom utiliza numărul minim de animale pentru un experiment cu trei repetiții (loturi), cu 7 animale/lot sacrificate la diferite intervale de timp de la apariția și manifestarea neuropatiei, 3 animale control/lot și 3 animale de rezerva/lot, ținând cont de rata de mortalitate la injectarea cu substanța care va produce modelul de neuropatie.

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

Procedurile utilizate, respectiv injectarea și testele de evaluare neuropatică, au un grad superficial de severitate. Se așteaptă o suferință medie, la apariția diabetului și neuropatiei periferice. La sfârșitul experimentelor, animalele vor fi sacrificate prin eutanasiere (dislocare cervicală), așa cum este prevăzut în proiect, conform regulamentelor în vigoare.

Aplicarea conceptului 3R:

Înlocuire – Nu este posibilă înlocuirea animalelor în proceduri deoarece nu există un model *in vitro* validat și unanim acceptat de barieră hemato-nervoasă de nerv periferic. Mai mult, o parte din proiect se va face pe țesut uman patologic, respectiv pe fragmente/criosecțiuni provenite din biopsie de nerv periferic sural. Dar rezultatele nu pot fi comparate cu date provenite de la analiza nervului sural normal, neputându-se preleva țesut normal în aceleași condiții cu cel prelevat biopsic. Nevul prelevat de la cadavru suferă modificări cadaverice care dau erori de interpretare, fiind inutil ca termen de comparație. Modelul animal este singurul model care poate oferi date comparative acceptate între nervul periferic neuropatic și cel normal.

Reducere – Se va utiliza numărul strict necesar de animale pentru obținerea rezultatelor concludente, verificabile și publicabile. Se va folosi un model animal verificat și validat deja, publicat în literatura de specialitate, fără a se face optimizări inutile.

Îmbunătățire – Pe durata studiului toate animalele utilizate vor beneficia de condiții de adăpostire, îngrijire, hrănire, adăpare conform legislației europene în vigoare. Laboratorul Biobaza dispune de toate utilitățile necesare pentru asigurarea unui mediu adecvat pentru păstrarea animalelor; are posibilitatea de control al infecțiilor, poate asigura accesul liber la hrană și apă al animalelor, condiții standard de lumină/întuneric. De asemenea, Laboratorul dispune de personal calificat profesional. Pe tot parcursul studiului se va avea în vedere bunăstarea animalelor. Animalele vor fi monitorizate după fiecare procedură și se vor menține condiții normale/optime de viață. Hrana și apa vor fi la discreție. Manipularea animalelor în proceduri se va face cu grijă și profesionalism, evitându-se stressarea acestora.

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

Modelul murin ales este cel mai utilizat model preclinic de studiu pentru neuropatia periferică (diabetică sau de tip inflamator) având avantajul că metodele de evaluare funcțională sunt bine stabilite.

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

Pe tot parcursul studiului se va avea în vedere bunăstarea animalelor. Animalele vor fi monitorizate de personal veterinar calificat după fiecare procedură și se vor menține condiții normale/optime de viață. Hrana și apa vor fi la discreție. Manipularea animalelor în proceduri se va face cu grijă și profesionalism, evitându-se stressarea acestora.

La finalul experimentelor animalele vor fi eutanasiate prin dislocare cervicală.