

REZUMATUL CU CARACTER NONTEHNIC AL PROIECTULUI	
Titlul proiectului: Ingineria tesutului ischemic prin transplant combinatorial: asamblarea pieselor ce induc atat supravietuirea grefei cat si repararea tesutului gazda.	
Durata proiectului: 4 ani	
Cuvinte-cheie (maximum 5): terapie celulara; celule stem; infarct de miocard, boala ischemica; regenerare tisulara	
Scopul proiectului	Bioechivalenta cercetare translationala si cercetare aplicata
Descrierea obiectivelor proiectului:	
<p>Acest proiect isi propune sa dezvolte o terapie celulara eficienta, bazata pe utilizarea simultana a mai multor populatii de celule stem/progenitoare pentru a conferi beneficii mutuale atat pentru celulele grefate, cat si pentru tesutul ischemic, prin imbunatatirea grefarii celulelor transplantate in tesutul ischemic si stabilizarea vaselor de sange nou-formate.</p> <p>Obiectivele acestui proiect sunt :</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Obiectivul 1. Caracterizarea cross-talk-ului intre celule stem mezenchimale (CSM) si celule endoteliale progenitoare (CEP) in vitro.</i> Prin aceasta, vom determina influentele reciproce ale celor doua tipuri celulare pentru a stabili un raport optim in care cele doua tipuri celulare trebuie administrate, precum si necesitatea contactului direct dintre celule, pentru o terapie eficienta. Aceasta interactiune nu a fost raportata ca fiind studiata niciodata pana in prezent, nici in vitro, nici in vivo.• <i>Obiectivul 2. Testarea contributiei spatiale si temporale a CSM si CEP, administrate simultan sau individual pe modele de tesuturi ischemice, la supravietuirea grefei.</i> Bazat pe datele noastre anterioare, scopul acestui obiectiv este de a cuantifica beneficiile aduse de transplantul combinatorial la supravietuirea celulelor transplantate. Studiile vor fi axate pe distributia celor doua tipuri de celule in grefa, una in relatie cu cealalta, ca si pe stimularea reciproca a grefarii si supravietuirii locale a fiecarui tip celular.• <i>Obiectivul 3. Masurarea capacitatii transplantului combinatorial cu CSM si CEP de a stimula procesul reparator in tesuturile ischemice.</i> Mai intai, va fi investigata contributia celor doua tipuri de celule transplantate la recrutarea CEP gazda in tesutul ischemic, ca o masura prin care organismul gazda raspunde la ischemie si se angajeaza in repararea endogena. In cel de-al doilea stadiu, va fi evaluat efectul transplantului combinatorial de a stimula angiogeneza la situsul ischemic si de a accelera repararea tisulara atat la nivel structural, cat si functional.	
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)?	
<p>Exista un numar tot mai mare de pacienti cu infarct de miocard sau cu ischemie miocardica cronica care dezvolta insuficienta cardiaca, un sindrom clinic care constituie in prezent una din cauzele principale de spitalizare si care este asociat cu leziuni colaterale si disfunctia multor altor organe. Aceasta boala nu numai ca produce vulnerabilitate in randul pacientilor si al familiilor lor, dar de asemenea pune in pericol sustenabilitatea sistemului de sanatate publica. Faptul ca majoritatea terapiilor farmacologice conventionale au efect numai in rata de supravietuire si nu modifica prognosticul indivizilor afectati (care ramane nefavorabil) determina o nevoie disperata de a dezvolta noi concepte pentru intarzierea sau prevenirea instalarii insuficientei cardiace, mai degraba decat pentru tratarea bolii. Proiectul isi propune sa dezvolte o terapie celulara mai eficienta, bazata pe utilizarea simultana a mai</p>	

multor populatii de celule stem/progenitoare. Aceasta terapie poate fi transferata in clinica, unde ne asteptam sa produca efecte semnificativ mai bune asupra calitatii vietii pacientilor cu insuficienta cardiaca si sa reduca impactul economic al bolilor cardiace ischemice cu implicatii directe pentru sanatatea umana. Prin restabilirea, chiar si partiala, a functiei miocardului lezat si stimularea cresterii de noi vase se va reduce incidenta mortalitatii si complicatiilor asociate cu bolile cardiace.

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

Experimentele vor fi realizate pe soareci de laborator (*Mus musculus*), iar numarul preconizat de animale utilizate este de 590 (divizate in loturi de cate 12-15 animale).

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 ale procedurilor din cadrul acestui proiect sunt cuprinse in urmatoarele categorii:

a) Superficial: injectii si aplicatii fara a induce conditii patologice (analgezie, anestezie, prelevare sange), injectare intravenoasa in vena din coada fara narcoza, analize neinvazive (echocardiografie) sub narcoza.

b) Moderat: Operatii cu narcoza cu resuscitarea animalelor (infarct miocardic, ischemia membrului posterior), transplant celular.

c) Fara recuperare: Operatii cu narcoza, fara resuscitarea animalelor (masurare invaziva a presiunii si volumului cardiac).

Animalele se vor utiliza numai pentru procedurile mentionate, iar la sfarsitul experimentelor, ele vor fi sacrificate. Dupa fiecare procedura experimentală superficiala sau moderata, animalele vor fi lasate sa se refaca, cu respectarea intervalului minim recomandat. Animalele supuse procedurilor chirurgicale de severitate moderata vor fi cazate individual in custi curate cu asternut proaspat, pentru a se asigura o refacere post-operatorie optima. Pentru aceste animale se iau masuri speciale de asigurare a hranei si apei si se urmaresc regulat gradul de hidratare si greutatea acestora.

Finalizarea procedurilor are loc in cadrul masurarilor invazive, cand soarelele se afla sub anestezie si analgezie cu ketamina si xilazina. Moartea se induce in acest caz in narcoza prin exanguinare. In cazul in care este nevoie de inducerea precoce a mortii animalelor, se va folosi supradozare cu anesthetic.

Aplicarea conceptului 3R

Deoarece prin acest proiect incercam sa stabilim o noua strategie terapeutica complexa pentru tratamentul bolii cardiovasculare umane, utilizarea modelelor experimentale animale nu poate fi evitata. Cu toate acestea, strategia proiectului a inclus toate oportunitatile pentru inlocuirea, reducerea, si imbunatatirea experimentelor pe animale (cei 3R): Reducerea (prin obtinerea a cat mai multor informatii de la acelasi numar de animale), Inlocuirea (prin utilizarea metodelor alternative, non-animale, ori de cate ori este posibil) si Rafinarea (prin limitarea la maxim a durerii, suferintei si stresului animalelor).

Înlocuire Precizați de ce trebuie utilizate animale, și nu alte metode alternative.

Deoarece acest proiect isi propune introducerea unei noi terapii pentru a lupta mai eficient impotriva insuficientei cardiace, evaluarea beneficiilor aduse de aceasta terapie pe modele experimentale animale este foarte importanta si nu poate fi evitata. Pentru reducerea numarului de animale, vor fi facute studii in vitro pe culturi de celule, ori de cate ori acestea pot furniza raspunsuri predictive care ar putea eficientiza noua strategie terapeutica urmarita in acest proiect (**inlocuire**).

Reducere Cum vă asigurați că numărul de animale utilizat este minim?

Reducerea numarului de animale este realizata prin utilizarea celulelor marcate

bioluminescent sau fluorescent, ceea ce permite analiza multipla a animalelor pentru perioade mai lungi de timp, fara sacrificarea acestora. Imagistica in vivo pe animale mici de laborator, reprezinta o tehnologie de ultima generatie prin care este permisa monitorizarea pe longitudinala, ne-invaziva, a progresiei unei boli, a traficului celular si a expresiei genice in animale vii. In plus, cuantificarea parametrilor functionali (ex.: functia cardiaca, perfuzia tisulara) se realizeaza neinvaziv, in aceleasi animale si pe perioade lungi de timp, cu ajutorul sistemului de imagistica cu ultrasunete. Experimentele de microchirurgie cardiovasculara sunt foarte bine standardizate de catre grupul nostru de cercetare, fiind realizate de cercetatori cu experienta, ceea ce va ajuta la reducerea numarului de animale utilizate, prin limitarea mortalitatii asociate tehnicilor de microchirurgie enumerate mai sus. Rezultatele obtinute prin utilizarea acestor tehnici de microchirurgie cardiovasculara au fost deja publicate de catre directorul de proiect in importante articole stiintifice.

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

Deși grupul implicat în acest proiect are o experiență îndelungată în modelele experimentale de soarece cu boala cardiovasculară umană, lucrăm în mod constant la **îmbunătățirea** modelelor experimentale animale pentru a reduce durerea animală și pierderea acestora. Regimul de îngrijire pre- și post-operatorie a fost atent luat în considerare când a fost conturată metodologia utilizată în prezenta propunere.

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

Cercetarea pe animale de laborator a avut un rol vital în multe progrese științifice și medicale ale secolului trecut și continuă să ajute la înțelegerea diferitelor boli. Progresele în medicina necesită studii pre-clinice pe animale de laborator înainte de a putea fi aprobate studiile clinice pe voluntari umani sau pacienți.

În timp ce rezultatele experimentelor in vitro pe celule stem sunt uneori aplicabile pentru a determina rezultatele așteptate în studiile pe animale, de multe ori se observă efecte neașteptate pe animale. Astfel, testarea pe animalele de laborator este, în marea majoritate a cazurilor, singura modalitate de a obține informații cu privire la modul în care celulele stem se comportă într-un organism întreg. În plus, procesul de reparare a unui infarct miocardic sau a unui membru ischemic presupune reacții complexe de infiltrare a celulelor imune, angiogeneză, fibroză și formare de țesut cicatrizant, care se suprapun sau sunt decalate, fiind controlate de factori încă incomplet cunoscuți. Mai mult decât atât, funcția cardiacă este cel mai important parametru ce ne oferă informații despre procesul de regenerare și nu se poate evalua decât în condiții in vivo. Până la ora actuală nu există un sistem adecvat să poată imita și reproduce toate aceste procese. Prin urmare, condițiile patologice studiate în acest proiect nu pot fi simulate în alt sistem, modelul animal fiind de neînlocuit.

Experimentele vor fi realizate pe soareci de laborator (*Mus musculus*) deoarece: (i) sunt animale mici, ce se pot adăposti și crește ușor, sunt relativ ieftini și se adaptează bine la noi condiții de mediu; (ii) anatomia, fiziologia și genomul lor sunt foarte bine înțelese de cercetători, facilitându-se astfel dezvoltarea mai rapidă a științei. Prin utilizarea de linii înbred, animalele sunt aproape identice genetic. În plus, omul și soarele sunt surprinzător de asemanători. Organizarea ADN-ului și expresia genică la om este foarte asemanătoare cu cea a soarecelui, aceștia având în comun între 95 și 98 la suta din genom. Cu alte cuvinte, un soarece cu ateroscleroză sau boala cardiacă ischemică poate servi ca model pentru un pacient uman cu aceeași boală sau afecțiune. Acest lucru permite oamenilor de știință să efectueze experimente care ar fi altfel etic imposibil de realizat pe oameni.

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

Pe durata experimentelor se are in vedere in primul rand bunastarea animalelor, asigurandu-se o analgezie si anestezie corespunzatoare. In cazul in care animalele prezinta anomalii in timpul examenilor regulate, acestea sunt sacrificate fara durere. Uciderea animalelor este imperativ sa se realizeze cat mai omeneste posibil. Momentul sacrificarii este ales ca punctul in care o durere sau suferinta a unui animal poate fi prevenita sau incheiata, in timp ce scopul stiintific si obiectivele studiului au fost atinse. Sacrificarea umana a animalelor este realizata numai de catre personalul calificat din cadrul proiectului, dupa efectuarea de observatii generale si/sau specifice fiecarui studiu experimental, la momente de timp adecvate.