

REZUMATUL CU CHARACTER NONTEHNIC AL PROIECTULUI

Titlul proiectului : Noi perspective în relația plachete-celule progenitoare endoteliale în boala aterosclerotică

Durata proiectului: 01.10.2015 – 30.09.2017

Cuvinte-cheie (maximum 5) : Plachete, celule progenitoare endoteliale (EPCs), terapia cu EPCs, factori de risc cardiovascular, modele animale experimentale

Scopul proiectului : Acest proiect își propune să investigheze relația EPCs-plachete și să urmărească consecințele transplantării de EPCs circulante asupra acestei interacțiuni în ateroscleroză.

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

Celulele progenitoare endoteliale (EPCs) și plachetele au un rol important în repararea lezării vasculare, iar înțelegerea interacțiunii dintre ele poate aduce explicații privind mecanismele celulare implicate. Deși există dovezi care sugerează că plachetele sunt esențiale în atragerea, sosirea și diferențierea EPCs, efectele plachetelor asupra funcțiilor EPCs în ateroscleroza au fost mai puțin studiate. Scopul acestui proiect este de a investiga relația EPCs-plachete și de a urmări consecințele transplantării de EPCs circulante asupra acestei interacțiuni în ateroscleroza. Studiul va fi efectuat pe hamsteri aurii sirieni (în vârstă de 3 luni) împărțiți în trei grupe: **(1)** hipertensivi-hipercolesterolemici, **HH** (hrăniți cu dietă standard îmbogățită cu 3% colesterol, 15% unt și 8% NaCl, timp de 4 luni); **(2)** HH tratați cu EPCs, **HH-EPCs** (1×10^5 EPCs izolate de la grupul C vor fi transplantate prin injecție în plexul retro-orbital, într-o singură doză pe lună, în timpul procesului aterosclerotic indus prin dietă); **(3)** control, **C** (hrăniți cu o dietă standard pentru hamster). **Obiective:** **(1)** caracterizarea grupelor experimentale de hamsteri: HH, HH-EPCs și C; **(2)** cuantificarea nivelurilor și funcțiilor EPCs circulante; **(3)** evaluarea relației directe de cauzalitate dintre EPCs și plachete; **(4)** investigarea mecanismelor moleculare prin care plachetele influențează funcțiile EPCs circulante.

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)?

Studiul nostru prezintă noi căi de cercetare care vor duce mai departe cunoștințele noastre privind rolul biologic al EPCs. Mobilizarea, chemotaxia, adeziunea, diferențierea și interacțiunea cu plachetele sunt etape esențiale în repararea tisulară mediată de EPCs. Cu toate

acestea, mecanismele care stau la baza acestor interacțiuni intercelulare sunt incomplet înțelese. Astfel, elucidarea relației dintre EPCs și plachete poate ajuta la înțelegerea mecanismelor care controlează atât regenerarea vasculară cât și leziunea și poate conduce la dezvoltarea de noi terapii pentru a trata pacienții cu risc crescut de boală aterosclerotică. În prezent, biomarkerii miARN prezintă un interes considerabil, iar analiza rolului miARN-urilor provenite din plachete se află încă la început. Așadar, investigarea implicării anumitor miARN-uri plachetare în contextul proiectului nostru ar putea oferi mai multe aspecte pentru viitoarele aplicații terapeutice în inflamație.

Rezultatele obținute pe noile modele experimentale animale vor contribui la descifrarea modului în care EPCs interacționează cu plachetele, esențială pentru înțelegerea pe deplin a proprietăților lor terapeutice potențiale. Elucidarea și modularea mecanismelor care controlează atât regenerarea vasculară, cât și leziunea, pot conduce la o abordare terapeutică promițătoare pentru tratarea pacienții cu risc crescut de boală aterosclerotică.

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

Specia utilizată este hamsterul Sirian Auriu (*Mesocricetus auratus*), masculi. Numarul de hamsteri va fi de 60, impartiti in 3 subgrupe a câte 20 animale de studiu: control, hipertensivi-hipercolesterolemici și hipertensivi-hipercolesterolemici tratați cu EPCs.

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” (dietă 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-orbital, 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 prevazute nu poate fi evitată, deoarece obiectivele proiectului prevad 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.

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

Prezentul studiu își propune să investigheze relația EPCs-plachete și să urmărească consecințele transplantării de EPCs circulante, obținute de la control, asupra acestei interacțiuni, în ateroscleroză. Acest studiu se poate realiza numai pe organisme vii, respectiv hamsteri, deoarece hamsterul este modelul cel mai util, economic și valid pentru studierea aterosclerozei și explorarea unor abordări terapeutice eficiente.

Reducere

Cum vă asigurați că numărul de animale utilizat este minim?

Numarul de hamsteri va fi de 60, impartiti in 3 subgrupe a câte 20 animale de studiu. Numarul 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 această specie deoarece dintre cele trei specii de rozătoare – șoareci, șobolani, hamsteri – disponibile în biobaza institutului, hamsterul Sirian Auriu posedă caracteristicile fiziologice de interes pentru prezentul proiect, cele mai apropiate de fiziologia omului.

Hamsterul Sirian Auriu constituie un model pentru cercetarea aterosclerozei, deoarece dezvoltă leziuni arteriale în asociere cu o hiperlipidemie marcantă atunci când i se administrează o dietă suplimentată cu colesterol și grăsimi saturate. Hamsterul Sirian Auriu prezintă un metabolism lipidic mult mai apropiat de cel uman, comparativ cu alte rozătoare. Astfel, hamsterii prezintă lipoproteine de joasă densitate (LDL) ca transportori de colesterol în circulație, sintetizează enzima de transfer a esterilor de colesterol (soarecii, nu) și alte enzime implicate în metabolismul biliar, similar cu omul. Hamsterul dezvoltă plăci aterosclerotice ca răspuns la dieta hiperlipidemică, cu localizare în zonele pro-aterogene similare speciei umane, acestea urmând a fi investigate (localizare, dimensiune, compoziție) în 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 1ml).