

RAPORT FINAL DE ACTIVITATE
privind desfășurarea programului-nucleu PN 16.22
DE LA TEHNOLOGII DE DIAGNOSTIC MOLECULAR LA MEDICINA DE PRECIZIE (TDM-MP)

Durata programului: 2 ani

Data începerii: martie 2016

Data finalizării: decembrie 2017

1. Scopul programului:

Programul are ca **scop** implementarea conceptelor și instrumentelor medicinei de precizie pentru optimizarea algoritmilor de diagnostic și abordare terapeutică în vederea îmbunătățirii calității vieții.

Programul pe care îl propunem contribuie la folosirea cât mai completă a resursei umane și bazei materiale a institutului ceea ce va duce la sporirea vizibilității internaționale a colectivelor de cercetare din cadrul INCD „Victor Babeș”, facilitând obținerea și diseminarea de rezultate ale activității de cercetare prin articole în reviste de circulație internațională și prin comunicări la manifestări științifice naționale și internaționale, în corelație atât cu strategia proprie a institutului, cât și în concordanță cu cele prevăzute în SNCDI 2014-2020.

Noul concept „**Medicina de Precizie**” se concentrează pe abordarea individuală și pro-activă a problemelor de sănătate, fiind rapid preluată în cercetarea biomedicală fundamentală și clinică de avangardă. Acest concept a fost inclus în programe de finanțare atât în Uniunea Europeană, cât și în Statele Unite ale Americii, fiind o componentă-cheie a programelor europene, precum **Horizon 2020**, dar și a celor din SUA, cum ar fi **White House’s Precision Medicine Initiative**.

Propunerea de **Programul Nucleu** a plecat de la realitatea că **medicina de precizie** reprezintă o nouă abordare inovatoare pentru tratamentul și prevenția bolii, luând în considerare variabilitatea individuală la nivel genetic, condițiile de mediu și stilul de viață al fiecărei persoane. Abordarea clasică, în practica medicală curentă, înseamnă același tratament pentru toți (aceeași boală, aceeași terapie), în timp ce medicina de precizie / personalizată înseamnă terapia potrivită pentru grupul potrivit de pacienți, la momentul potrivit. Viitorul medicinei se bazează pe o astfel de personalizare, care va eficientiza terapiile și va putea spori starea de sănătate a populației, chiar în condițiile actuale de dezechilibre la nivelul mediului ambiant și de schimbări survenite în stilul de viață.

Necesitatea aplicării **screeningului molecular**, pentru determinarea unui diagnostic de precizie, este crucială în majoritatea patologiilor. Este utilă și realizarea unor baze de date care să ofere informații pentru prevenția, tratamentul și îngrijirea medicală în scopul valorificării noilor tehnologii – genomică, proteomică, metabolomică în beneficiul pacienților.

2. Modul de derulare al programului:

2.1. Descrierea activităților (utilizând și informațiile din rapoartele anuale)

Proiect: PN 16.22.01.01

În anul 2016 s-au realizat: **(a)** alcatuirea grupului de studiu, stabilirea criteriilor de includere în studiu, a protocoalelor de prelevare și stocare a probelor biologice tumorale și non-tumorale; **(b)** optimizarea protocoalelor experimentale și analizei de date pentru caracterizare moleculară prin microarray în LAM; **(c)** studii genomice de înaltă rezoluție bazate

pe microarray la pacienti cu LAM vizand identificarea dezechilibrelor cantitative si regiunilor de homozigotie dobandite in celulele maligne

In anul 2017: Activitatea în cadrul proiectului în cel de-al doilea an de derulare a presupus: **(a)** realizarea unui protocol experimental optimizat de secvențiere țintită. Protocol optimizat de prelucrare și analiză a datelor de secvențiere în leucemia acută mieloblastică; **(b)** obținerea de profile mutaționale in LAM; **(c)** înregistrari in baza de date referitoare la variatiile genice detectate; **(d)** realizarea de profile moleculare, genice si genomice in LAM; **(e)** realizarea unui algoritm de investigatie moleculara in LAM; **(f)** obținerea unui panel de biomarkeri genomici/genici pentru investigatii diagnostic; **(g)** constituirea unui ample baze de date

Performanțele realizate pot fi sintetizate astfel: Proiectul, prin investigațiile genomice de înaltă rezoluție propuse, se încadrează în tendința actuală de investigare și intervenție bazate pe caracteristicile moleculare unice ale pacienților. In cadrul proiectului au fost introduse în algoritmul de investigație a LAM-CN metodologii NGS, puțin utilizate în context național. O optimizarea testelor moleculare a vizat, totodată, obținerea unei specificități și sensibilități mai bune, comparativ cu metodele curente. Proiectul a condus la: **(a)** Acumularea de seturi de date moleculare; **(b)** Identificarea dezechilibrelor genomice cantitative și a mutațiilor driver în LAM și evidențierea corelațiilor existente între diferitele evenimente genetice în LAM; **(c)** Extinderea gamei de metode de investigație genetică prin introducerea secvențierii NGS țintite. Au fost elaborate 6 lucrări comunicate la manifestări științifice naționale (4) și internaționale (2)

Proiect: PN 16.22.01.02

In anul 2016: In concordanta cu obiectivul principal al proiectului, in primele 3 etape am identificat statusul mutational al genelor *KRAS*, *NRAS* si *BRAF* la pacienti diagnosticati cu adenocarcinom colorectal. Am extras ADN din fragmente tumorale colorectale verificate histopatologic si imunohistochemic si am identificat statusul mutational al genelor mentionate prin tehnologia NGS. Rezultatele obtinute au fost verificate prin metodele de diagnostic utilizate in laborator (pirosecventiere, PCR-hibridizare inversa).

In anul 2017: Activitatea în cadrul proiectului în cel de-al doilea an de derulare a presupus obținerea de date privind **(a)** semnătura miARN specifică țesuturilor cu mutații la nivelul genelor din familia RAS comparativ cu țesutul normal și cu cel tumoral *wild type*; **(b)** Semnătura miARN specifică țesuturilor cu mutații la nivelul genei BRAF comparativ cu țesutul normal si cu cel tumoral *wild type*; **(c)** Semnătura miARN specifică liniilor celulare tumorale colo-rectale; corelații cu datele din literatura de specialitate; **(d)** Integrarea rezultatelor obținute. Concluzii finale

Performanțele realizate constau în: **(a)** identificarea unor tipuri de miARN cu expresie modificata in cancerul colorectal cu mutatii la nivelul oncogenelor din familiile RAS si RAF pentru stabilirea unor noi tinte terapeutice; **(b)** identificarea statusului mutational al oncogenelor din din familiile RAS si RAF in tumorile colorectale; **(c)** 3 Comunicări științifice manifestări științifice din țară (2) și din străinătate (1); 1 lucrare publicată în străinătate.

Proiect: PN 16.22.01.03

In anul 2016 activitatea a presupus **(a)** caracterizarea mecanismelor de biogeneză și endocitoză ale VE eliberate de celule leucemice K562 în cultură, prin TEM, crio-electrono-microscopie (crio-TEM), electrono-tomografie (ET) și microscopie de super-rezoluție (SRM); **(b)** Studiul rutelor intra-celulare ale miARN marcat fluorescent atât în celulele de origine, cât și în cele receptor din cultură, folosind microscopie electronică corelațională (CLEM) și SRM; **(c)** Caracterizarea structurală a împachetării miARN în VE de origine leucemică (celule K562) în cultură, folosind crio-TEM, ET și software specializat de reconstrucție tri-dimensională.

In anul 2017 au fost abordate următoarele aspecte: **(a)** realizarea de transfecții de oligonucleotide/miRNA marcate fluorescent conform protocoalelor descrise anterior; **(b)** observarea transferului de semnal fluorescent între celule în cultură, folosind tehnici de live cell imaging; **(c)** fixarea celulelor leucemice K562 în glutaraldehidă și prelucrarea în

conformitate cu procedurile de includere în Epon pentru studii ultrastructurale și 3D sau crio-fixate conform protocoalelor publicate anterior pentru celule în suspensie (a fost estimată o mai bună caracterizare morfologică a proceselor de biogeneză și endocitoză); **(d)** VE au fost obținute din mediul de cultură al K562, apoi fixate în glutaraldehidă sau crio-fixate pentru caracterizare structurală prin TEM sau crio-TEM; **(e)** celule leucemice s-au studiat prin live cell imaging pentru observarea în SRM a traficului intra-celular de miRNA. Ulterior s-au fixat folosind glutaraldehidă, iar observarea miRNA fluorescent se va face în microscopul electronic folosind tehnica CLEM, obținându-se date suplimentare în ceea ce privește dispersia și transportul intra-celular al miRNA în leucemii; **(f)** generarea de modele moleculare 3D, care vor contribui la o mai bună înțelegere a arhitecturii celulare și a proceselor studiate

Performanțele realizate pot fi rezumate astfel: Prin acest studiu am arătat că miR21-Cy5 poate fi transfectat cu succes în celule leucemice K562, fără a influența semnificativ viabilitatea celulară și cu menținerea fluorescenței până la 48 de ore de la momentul transfecției, sugerând atât metabolizarea lentă a miRNA exogen, cât și stabilitatea fluoroforului utilizat. Ulterior, am arătat prin SRM că miRNA transfectat în celule poate fi excretat în spațiul extracelular, unde se regăsește în structuri sferice aflate în apropierea corpilor celulari, dar delimitate de aceștia. Aceste structuri au fost observate atât în probe fixate, cât și, ca element de noutate, în culturi celulare prin tehnici de "live cell imaging". VE libere, conținând RNA, sunt abundente în cultură, confirmând astfel rolul de transportor al moleculelor de semnalizare. VE reprezintă o populație heterogenă, cu diametre între 100 nm și 1.6 μm. Prin optimizarea tehnicilor de SRM și prin rezultatele obținute folosind aceste metode, am răspuns astfel obiectivelor setate pentru prima parte a proiectului. Din cauza timpului experimental limitat (considerabil mai scurt decât cel solicitat prin propunerea de proiect), nu s-au putut optimiza complet și tehnicile de microscopie electronică necesare. Totuși, rezultatele parțiale și creșterea experienței în manipularea celulelor hematologice, precum și în tehnicile de CLEM și crio-electrono microscopie, au făcut posibilă inițierea unei colaborări internaționale, cu laboratorul Prof. Ștefan Constantinescu (deDuve Institute, Universite Catholique de Louvain, Belgia). Colaborarea reprezintă o continuare a tematicii proiectului curent, *i.e.* a studiilor de trafic intra-celular și secreție extra-celulară în boli hematologice.

Proiect: PN 16.22.01.04

In anul 2016: Au fost avute în vedere următoarele aspecte: **(a)** Actualizarea bazei de date documentare a proiectului; **(b)** alcatuirea lotului de studiu, examinarea preparatelor microscopice, cu evaluarea diagnosticului histopatologic; **(c)** introducerea informațiilor în baza de date a proiectului.

In anul 2017: Au fost efectuate studii privind: **(a)** evaluarea expresiei SATB și BRAF în cazurile selecționate de adenocarcinom de colon; **(b)** identificarea subgrupeii de tumori ce prezintă mutație BRAF; **(c)** identificarea prezentei mutației BRAF și SATB în alte tumori decât cele colorectale; **(d)** identificarea subgrupeii de tumori ce exprimă SATB și compararea cu cele SATB pozitive și sistematizarea rezultatelor; **(e)** identificarea de subtipuri moleculare ale adenocarcinoamelor colorectale și reclasificarea acestor tumori.

Performanțele realizate pot fi sintetizate astfel: Proiectul a stabilit valoarea markerului SATB2 pentru a confirma histogeneza cancerului de colon, cu utilitate în stabilirea originii metastazelor fără punct de plecare precizat. Expresia genei BRAF V600E se asociază cu instabilitatea microsatelitară iar expresia sa imunohistochimică pare suprapusă cu mutația detectată prin biologie moleculară. A fost realizată o schiță de subclasificare a cancerului de colon folosind markeri imunohistochimici.

Proiect: PN 16.22.02.01

In anul 2016: În faza 1 s-au realizat: Elaborarea protocoalelor de lucru: s-au elaborat protocoale de lucru pentru tehnicile utilizate în proiect, în mod specific pentru cantități foarte mici de țesut provenit din resturi de biopsii de nerv periferic sau criosecțiuni. S-au optimizat tehnici de lucru (imunohistochimie, imunofluorescență, Western blot) pentru biomarkerii pe

care ne-am propus sa-i investigam pentru prima dată in acest proiect. Obținerea acordurilor de etică privind utilizarea probelor de țesut uman și utilizarea animalelor de laborator de la Comisia de etica a IVB. Elaborarea unui Consimțământ informat pentru pacienții luati in studiu. In faza 2 s-au realizat: Identificarea unor proteine din JS din nervul periferic de la pacienți cu neuropatii periferice: Claudinele 1, 2, 3, 5, 11. S-a urmarit evidentierea expresiei fenotipice a proteinelor mentionate anterior in nervul periferic al unor pacienti cu diagnosticul de neuropatie periferica, prin imunohistochimie si Western blot. S-au studiat coloratiile histologice de rutina (hematoxilina & eozina si tricrom Gomori). S-au analizat sectiunile semifine provenite de la aceleasi cazuri, sectiuni obtinute din tesutul nervos incluzionat in Epon812 pentru microscopie electronica. S-au analizat probele de disociere a fibrelor nervoase mielinice (teasing) care au pus in evidenta anomalii ale tecii de mielina.

In anul 2017 activitatea s-a concentrat asupra: (a) realizării unui protocol experimental de producere a neuropatiei periferice diabetice la șoareci; (b) analizei expresiei fenotipice a proteinelor din joncțiunile strânse de la nivelul nervului periferic al șoarecilor din modelul experimental; (c) continuării analizei expresiei proteinelor din joncțiunile strânse din nervul periferic uman în diferite patologii neurologice; (d) identificării prezentei unor markeri epigenetici: micro-ARN-uri (miR-21, miR-29b, miR-133, miR-138, miR-124) și proteine care interferează cu mecanismele epigenetice (SIRT1 și SIRT2). Metodele de investigare: investigație: RT-PCR, IHC și WB); (e) analiza rezultatelor obtinute in functie de datele patologice și de metodele de investigație; (f) efectuarea statistice și elaborarea concluziilor finale; (g) elaborarea a 3 comunicări științifice prezentate la manifestări de profil.

Performanțele realizate pot fi prezentate astfel: Dintre proteinele componente ale BHN studiate, rezultatele cele mai concludente și semnificative s-au obtinut pentru Claudina-1 și Claudina-19, atât in cazul pacienților cu neuropatii periferice, cât și in modelul murin cu neuropatie diabetică. Acestea au fost prezente in BHN in nervul uman, in diferite tipuri de neuropatii periferice, și au prezentat o scădere semnificativă in nervul periferic la șoarecele cu neuropatie diabetică, in comparative cu controlul normal. Aceste rezultate au un caracter de noutate și sunt importante pentru deslusirea fiziopatologiei nervului periferic, cu accent pe BHN. Aceasta scădere a expresiei celor două Claudine ar putea avea un efect deosebit de important in permeabilizarea BHN. Pentru nervul periferic uman nu am avut control, din motive obiective. Studiile au fost comunicate la manifestări științifice din țara, cu participare internațională.

Proiect: PN 16.22.02.02

In anul 2016: Au fost rezolvate aspecte referitoare la: **(a)** analiza tipurilor de celule componente ale NCS in diferite organe; **(b)** Analiza moleculară a joncțiunilor hetero-celulare pe care le realizează telocitele la nivelul NCS; **(c)** Ultrastructura joncțiunilor heterocelulare in care sunt implicate telocite in NCS din diferite organe.

In anul 2017: Au fost efectuate studii privind: **(a)** Analiza electrono-tomografică a nișelor de celule stem din diverse organe pentru o mai bună caracterizare a interacțiunilor dintre celulele implicate în regenerare; **(b)** Identificarea unui model de interacțiune celulară la nivelul NCS poate oferi informații utile pentru eficientizarea terapierilor celulare; **(c)** Obținerea unor modele 3D al NCS în diferite organe poate pune în evidență detalii ale interacțiunii celulelor implicate în procesul de regenerare.

Performanțele realizate pot fi prezentate, succint astfel: **(a)** Rezultatele obtinute indica faptul ca procesul de regenerare tisulară implica mai multe tipuri celulare care realizează joncțiuni atipice între ele; **(b)** Analiza interacțiunilor dintre celulele implicate în procesul de regenerare fiziologică furnizează datele necesare pentru reproducerea acestui proces in vitro, cu implicații terapeutice; **(c)** Au fost elaborate 4 comunicări științifice prezentate la manifestări naționale (2) și internaționale (2); **(d)** Au fost elaborate 3 lucrări științifice prezentate în străinătate.

Proiect: PN 16.22.02.03

In anul 2016: Activitatea în cadrul proiectului a avut în vedere rezolvarea următoarelor aspecte: **(a)** Stabilirea de proceduri de lucru și optimizarea cadrului experimental specific; **(b)** obținerea de culturi de salisfere din celule provenind din glandele submandibulare; **(c)** obținerea de culturi de osteoblaste din linii celulare

In anul 2017: Au fost efectuate studii privind: **(a)** Determinarea condițiilor optime de cultura pentru un potențial inductiv ridicat; **(b)** Analiza eficienței transplantului selectiv celular postdeligaturare; **(c)** Studiul influenței exercitate de celule stem neurale în regenerarea indusă; **(d)** Analiza eficienței transplantului combinat celular

Performanțele realizate pot fi sintetizate astfel: **(a)** Metodologie de cultivare salisfere în mediu cu neuromediatori; **(b)** Metodologie de cultivare salisfere în bioreactor microgravitațional; **(c)** 5 comunicări științifice la manifestări naționale (4) și internaționale (1); **(d)** 1 articol publicat în revistă internațională („Regenerative perspective in modern dentistry”, Dentistry Journal. 2016, 4(2), 10; doi:10.3390/dj4020010, 2016)

Proiect PN 16.22.02.04

In anul 2016: În faza 1 s-au realizat: Elaborarea protocoalelor de lucru: s-au elaborat protocoale de lucru pentru tehnicile utilizate în proiect, în mod specific pentru cantități foarte mici de țesut provenit din resturi de biopsii de nerv periferic sau criosecțiuni. S-au optimizat tehnici de lucru (imunohistochimie, imunofluorescență, Western blot) pentru biomarkerii pe care ne-am propus să-i investigăm pentru prima dată în acest proiect. Obținerea acordurilor de etică privind utilizarea probelor de țesut uman și utilizarea animalelor de laborator de la Comisia de etică a IVB. Elaborarea unui Consimțământ informat pentru pacienții luați în studiu. În faza 2 s-au realizat: Identificarea unor markeri proteomici de stres de Reticul endoplasmatic din mușchiul scheletic de la pacienți cu miozite: CHOP (DDIT3), Atf3, sXbp1, Grp78/Bip, eIF2a, NF-κB prin Imunohistochimie și Western Blot. S-au studiat colorațiile histologice de rutină (hematoxilina & eozina și tricrom Gomori). În faza 3 s-au realizat: Identificarea aceluși markeri proteomici din mușchiul scheletic de la pacienți cu distrofii musculare, prin aceleași metode. Inițierea unei baze de date clinice și paraclinice de la pacienții cu miozite și distrofii musculare luați în studiu.

In anul 2017 activitatea s-a concentrat asupra: **(a)** analizei expresiei unor micro-ARN-uri implicate în stresul de reticul endoplasmatic muscular în miozite; **(b)** analizei expresiei SIRT1 și SIRT2 în mușchiul scheletic al unor pacienți cu miopatii de tip inflamator; **(c)** Continuării analizei expresiei fenotipice a unor proteine implicate în stresul de reticul endoplasmatic în mușchiul scheletic în diferite miopatii; **(d)** evidențierii markerilor epigenetici pentru stresul de reticul endoplasmatic din probe de țesut muscular de la pacienți cu distrofii musculare: micro-ARN-uri (miR-133a, miR-122, miR-221/222, miR-211), prin RT-PCR; deacetilazele SIRT1 și SIRT2 prin IHC, WB; **(e)** analizei rezultatelor obținute în funcție de datele patologice și de metodele de investigație; **(f)** realizării analizei statistice și elaborarea concluziilor finale.

Performanțele realizate pot fi prezentate astfel: CHOP, sXBP1 și NFκB. De asemenea, s-a studiat și prezenta MHC I și legătura lui cu expresia NFκB cu care este conectat prin intermediul sRE. Toate aceste proteine au avut valori crescute față de control la toate cazurile loturilor de studiu, la pacienții cu miozite mai mult decât la pacienții cu distrofii musculare forma centurilor. Este foarte important, cu caracter de noutate, faptul că pacienții cu distrofii musculare prezintă o supraexpresie a proteinelor de stres endoplasmatic și a MHC I. Am arătat că, deși supraexprimate, între NFκB și MHC I nu există o conexiune directă a variabilității expresiei, dovedind că există și alte mecanisme celulare care le influențează pe fiecare în parte. Studiile au fost comunicate la diferite manifestări științifice în țară, cu participare internațională, una din comunicări primind premiul 2 la secțiunea postere (al XV-lea Congres al Societății de Neurologie din România, 2017).

Proiect: PN 16.22.02.05

In anul 2016: În prima fază a proiectului „Alcatuirea loturilor de lucru prin selectarea pe baza analizei histopatologice a biopsiilor musculare” obiectivul general a fost stabilirea modelului experimental și evaluarea histopatologică a biopsiilor

musculare pentru indeplinirea caruia am avut mai multe obiective specifice dupa cum urmeaza: s-au stabilit principiile de formare a loturilor de studiu; s-au pus la punct aspectele etice privind protejarea subiectilor si recoltarea biopsiilor, in acord cu legislatia in vigoare; au fost selectati pacientii la care examenul clinic efectuat la Spitalului Clinic Colentina, Laboratorul de Neuropatologie, a fost compatibil cu o distrofie musculara Duchenne/Becker. Pacienții au fost clasificați în funcție de datele clinice și anamnestice indentificându-se în detaliu simptomatologia în vederea asocierii cu datele furnizate de studiile de biologie celulara si moleculara care vor fi abordate in fazele urmatoare ale proiectului. Se asemena s-a stabilit un model experimental de studierea; s-au stabilit procedurile de recoltare a probelor biologice; s-a prelevat material biologic de la subiecti cu patologice caracteristica pentru muschiul distrofic care au fost pregatite pentru analizele histologice conform procedurilor stabilite; s-au analizat probele prin tehnici de histologie pentru probele care au fost alese ca facand parte din lotul de studiu. In etapa doua a proiectului "Identificarea modificarilor expresiei fenotipice pentru proteinele de interes" obiectivul general a fost evaluarea imunohistochimica a biopsiilor musculare pentru indeplinirea caruia am avut mai multe obiective specifice dupa cum urmeaza: s-au stabilit procedurile si protocoalele de lucru pentru imunofluorescenta si western blot, s-au optimizat parametrii optimi de lucru pentru cele doua tehnici utilizate in aceasta etapa, s-a stabilit panelul de anticorpi ce urmeaza a fi utilizat si concentratiile optime de lucru, s-a realizat optimizarea metodelor de detectare a proteinelor luate in studiu prin tehnica de microscopie de fluorescenta si western blot si s-au stabilit loturile de lucru pe patologii in vederea asocierii cu datele furnizate de studiile de biologie moleculara care vor fi abordate in fazele urmatoare ale proiectului.

In anul 2017: Au fost efectuate următoarele activități: **(a)** realizarea modelului experimental in vitro pentru investigarea interacțiunii distrofina-nNOS-microARN; **(b)** evaluarea modificarilor de expresiei a distrofinei, nNOS si proteinelor asociate sub actiunea micro-ARN; **(c)** caracterizarea interactiunii nNOS-dystrofina-proteinele DAPC si rolul acesteia in regenerarea fibrei musculare

Performanțele realizate constau în: **(a)** Identificarea deficitului proteic primar in distrofiile musculare de tip DMD si BMD precum si reducerile secundare ale proteinelor asociate care nu au mai fost studiate pana in prezent, prin tehnici de imunofluorescenta si western blot; **(b)** Confirmarea prin analiza screeningul mutational prin tehnica MLPA (*multiplex ligation probes amplification*) al genei *DMD* care codifica proteina sarcolemala - distrofina – a modificarilor cantitative si calitative de la nivelul exonilor genei distrofinei; **(c)** Utilizarea culturilor celulare primare obtinute in investigarea modificarilor intercatiunii distrofina-nNOS-microARN prin modularea expresiei nNOS; **(d)** 7 lucrări comunicate la manifestări științifice din țară

Proiect: PN 16.22.03.01

In anul 2016 s-au realizat: **(a)** Identificarea si selectarea cazurilor cu diagnostic de boli inflamatorii intestinale adecvate studiului si alcatuirea lotului de cazuri si a lotului control; **(b)** Analiza histologica si morfometrica a densitatii si patternului de distributie a celulelor neuroendocrine din mucoasa colonica inflamata si normala.

In anul 2017 activitatea s-a concepat asupra studiilor privind: **(a)** profilul moleculelor cu rol modulator al inflamației în bolile inflamatorii cronice intestinale; **(b)** stabilirea nivelurilor de exprimare a genelor implicate in reglarea inflamatiei, apoptozei, imunitatii innascute si adaptative, adeziunii si remodelarii tisulare in bolile inflamatorii intestinale; **(c)** efectuarea de comparații boala Crohn – colita ulcerativă; **(d)** efectuarea de comparații boala activa - boala in remisiune; **(e)** integrarea rezultatelor histopatologice, imunohistochimice si moleculare și efectuarea de corelatii cu datele din literatura de specialitate; **(f)** elaborarea concluziilor finale privind patologia studiată

Performanțele realizate pot fi rezumate astfel: **(a)** Identificarea expresiei moleculelor cu rol în modularea inflamatiei atât de către celulele neuroendocrine, cât si de către alte celule din tesuturi învecinate sau la distanță; **(b)** Identificarea expresiei ARNm a mediatorilor modulatori ai inflamatiei cronice din bolile inflamatorii intestinale prin tehnici moleculare avansate; **(c)** 4 lucrări publicate și 4 comunicări la manifestări științifice de profil

Proiect: PN 16.22.03.02

In anul 2016: Au fost efectuate studii referitoare la: **(a)** Membrana filtrantă glomerulară normală - studiu ultrastructural și molecular prin tehnici avansate de ME și microscopie de înaltă rezoluție; **(b)** Nefropatia cu IgA - studiu ultrastructural prin tehnici avansate de ME; **(c)** Nefropatia cu IgA - studiu molecular prin tehnici avansate de microscopie de înaltă rezoluție

In anul 2017: Au fost efectuate studii privind: (a) Caracterizarea ultrastructurii și arhitecturii moleculare a membranei filtrante glomerulare în nefropatia lupică comparativ cu țesutul renal normal, folosind tehnici avansate de microscopie electronică; (b) Analiza expresiei proteinelor YAP (implicată în apoptoza) și Schip1 (implicată în dezvoltarea podocitelor) prin tehnici avansate de microscopie de înaltă rezoluție poate duce la identificarea unor posibile ținte terapeutice pentru întârzierea sau stoparea evoluției spre boala cronică renală ca stadiu terminal în nefropatia lupică; (c) Realizarea de modele tridimensionale ale podocitelor și a membranei filtrante glomerulare în cadrul modificărilor întâlnite în nefropatia cu IgA și nefropatia lupică va permite o mai bună înțelegere a acestei patologii cu importanță majoră în trierea pacienților pentru o terapie adecvată.

Performanțele realizate pot fi rezumate astfel: Rezultatele obținute prin derularea proiectului (descrierea ultrastructurii și arhitecturii moleculare a MFG în țesut renal normal și în cadrul unor patologii renale imune prin tehnici avansate de microscopie electronica și microscopie de înaltă rezoluție permit o mai buna intelegere a procesului de filtrare glomerulara precum si a rolului unor proteine structurale ale podocitelor (YAP, Schip1) în patologia renală imună). In cadrul proiectului au fost elaborate 5 comunicări științifice.

Proiect: PN 16.22.03.03

In anul 2016 s-au realizat: **(a)** Investigarea stării de activare a inflamazomului NLRP3 prin concentrația de IL-1 β și IL-18 în ser în corelație cu exprimarea genelor care codifica pentru aceste citokine pro-inflamatorii la nivelul celulelor mononucleare periferice de la pacienți cu artrita reumatoidă; **(b)** Investigarea la nivel molecular prin „pathway-focused PCR array” a stresului oxidativ și a răspunsului antioxidant în artrita reumatoidă;

In anul 2017 activitatea s-a concentrat asupra studiilor privind: **(a)** Obținerea profilului expresiei genelor implicate în activarea inflamazomului NLRP3 (date de multiplexare genică) la nivelul celulelor mononucleare periferice de la pacienți cu artrită reumatoidă pe parcursul terapiei biologice cu agenți anti-TNF α ; **(b)** Corelarea datelor moleculare cu evoluția nivelului seric de IL-18 și a scorului de activitate a bolii pe parcursul terapiei; **(c)** Completarea bazei de date moleculare a studiului privind activarea inflamazomilor și activitatea oxidativa intracelulara; **(d)** Identificarea corelațiilor potențiale dintre cele două cai de semnalizare în cazul pacienților RA și al subiecților control; **(e)** Completarea bazei de date a studiului; **(f)** Analiza datelor și stabilirea corelațiilor între datele fenotipice, moleculare și serologice ale pacienților RA investigați, comparativ cu subiecții control

Performanțele realizate pot fi cuantificate astfel: **(a)** Crearea unui pol de competență în domeniul investigațiilor imunologice moleculare în domeniul artritei reumatoide; **(b)** Evidențierea unor aspecte noi în patologia RA referitoare la starea de imunosupresie a PBMC din sangele pacienților RA, corelată cu supresia activității redox și a sistemului antioxidant endogen. Demonstrarea faptului că PBMC nu sunt sursele de citokine pro-inflamatoare detectate în concentrații mari în sangele pacienților RA; **(c)** Dovezi privind faptul că IL-18 din serul/plasma pacienților RA poate distinge între pacienții în remisie și cei cu boala activă; **(d)** Panel de biomarkeri care caracterizează evoluția pacienților RA pe parcursul terapiei anti-TNF care vor fi validați în vederea implementării lor în clinice de reumatologie partenere (IL-6, IL-1 β). Remarcăm faptul că datele noastre experimentale arată că modificările nivelului de TNF α ; **(e)** Biobanca cu probe biologice (ser, plasma, acizi nucleici) de la pacienți RA și controale; **(f)** Baza de date cu parametri imunologici celulari, moleculari și serologici ai pacienților RA investigați în dinamică, pe parcursul terapiei anti-reumatice; **(g)** ser/plasma pe parcursul terapiei anti-TNF nu se corelează cu evoluția bolii obiectivată prin scorul DAS28. Tot la acest

capitol punctăm **comunicările**¹ la manifestari stiintifice nationale si internationale, 1 **artico**² transmis spre publicare la Pharmacological Reviews (impact factor 27,27) – articol aflat in evaluare dupa prima revizie (minor revision), precum și **colaborarea cu Prof. Antonio Cuadrado de la Universitatea Autonoma din Madrid, Spania** in domeniul biologiei factorului de transcripție NRF2 in patologice. Impreuna cu Prof. Cuadrado am elaborat 2 articole de tip review in acest domeniu si urmeaza sa depunem o propunere de proiect la o competitie internationala.

Proiect: PN 16.22.03.04

In anul 2016: Au fost efectuate cercetări referitoare la: **(a)** Identificarea modificărilor unor categorii de limfocite mai puțin investigate (B de memorie, plasmocite, T dublu-negative) prin imunofenotipare la citometrul în flux la copii cu infecții recurente; **(b)** Evaluare moleculară pentru diferențierea imunodeficiențelor primare; **(c)** Sortare și evaluare funcțională a limfocitelor T dublu-negative; **(d)** Stabilirea importanței categoriilor limfocitare investigate pentru patogenia infecțiilor recidivante la copii

In anul 2017: Au fost efectuate studii privind: **(a)** Identificarea mutațiilor genice pentru imunodeficiențe primare (IDP); **(b)** Determinarea expresiei fenotipice a mutațiilor identificate; **(c)** Excluderea imunologică a IDP umorale; **(c)** Obținerea unui protocol de izolare și sortare a celulelor T-DN (CD3+CD4-CD8-CD1d-); **(d)** Obținerea de valori pentru un set de citokine intracelulare determinate pentru grupul celular T-DN (CD3+CD4-CD8-CD1d-) izolat prin sortare; **(e)** Evaluarea funcționalității celulelor T-DN; **(f)** Realizarea unui panel de screening de imunofenotipare limfocitară cu 6 culori în suspiciunile de IDP; **(g)** Stabilirea prezenței/absenței mutațiilor specifice pentru IDP și încadrarea cazurilor în grupuri diagnostice diferite: IDP, non-IDP; **(h)** Asociere studiu imunologic – studiu genic în infecțiile recurente.

Performanțele realizate pot fi rezumate astfel: **(a)** Realizarea de paneluri de investigație pentru limfocitele T și B ce completează determinarea curentă standard a acestor populații celulare. Astfel, au fost stabilite metodologiile de evidențiere prin citometrie în flux a următoarelor subpopulații de limfocite B care nu sunt în prezent testate în clinică: B imature, B naive, B de memorie, plasmocite. Subpopulațiile de limfocite T testate prin metodologia extinsă au fost T dublu negative și NKT. S-a optimizat o tehnică de imunofenotipare cu 8 culori pentru evaluarea directă a tuturor subpopulațiilor; **(b)** Au fost investigate 40 cazuri de copii cu sindrom de infecții recurente. Testările au fost efectuate prin metodologie standard (imunofenotipare pentru populații limfocitare T, B, NK) și prin imunofenotipare limfocitară extinsă (populații limfocitare T, B, NK + subpopulații B și T). Rezultatele au fost evaluate pe baza unui sistem de valori normale determinat pe un grup de 15 subiecți normali testați în condițiile laboratorului. Principalele constatări au fost următoarele:

¹ Comunicări

- ❖ Conferința Anuală de Imunologie cu participare internațională, organizata în perioada 22-24 Octombrie 2015, la INCD "Victor Babeș", București. „Heterogeneity and plasticity of the innate and adaptive immune response in rheumatoid arthritis”. Gina Manda, Gheorghita Isvoranu, Dobre Maria
- ❖ Sesiunea anuala a Institutului „Victor Babeș”, al 8-lea Simpozion National de Patologie MEDICINA DE PRECIZIE – DE LA MODELE EXPERIMENTALE LA BIOMARKERI, organizate în perioada 19-21 Noiembrie 2015, la INCD "Victor Babeș", București. „Schimbare de paradigma in abordarea artritei reumatoide”. Gina Manda, Gheorghita Isvoranu, Maria Dobre
- ❖ Congresul National de Reumatologie 2016, organizat în perioada 13-15 Octombrie 2016 la Biblioteca Națională, București. „Evaluarea profilului molecular al stresului oxidativ si al raspunsului antioxidant in celule mononucleare periferice la pacienti cu artrita reumatoida”. Manda Gina, Dobre Maria, Denisa Predeteanu, Codreanu Catalin
- ❖ NRF2-net: Research net on the NRF2 hub of the diseasome, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAMCSIC, 31 martie 2017, Madrid, Spania: “Rheumatoid arthritis from the redox perspective”, Gina Manda (prezentare orala - invited speaker)
- ❖ A 47-a Conferință Anuală de Imunologie cu participare internațională, 4-6.10.2017, INCD “Victor Babeș”: “Raspunsul redox al celulelor mononucleare periferice la furtumna citokinica din sange in artrita reumatoida”, Gina Manda, Maria Dobre, Ionela Neagoe, Simona Mihai, Denisa Predeteanu, Catalin Codreanu (prezentare poster);
- ❖ Congresul National de Reumatologie 2017, a 24-a editie, organizat în perioada 4-7 Octombrie 2017 la Centrul de Conferinte, Palatul Patriarhiei, București: “Semnalele de pericol și inflamazomul în artrita reumatoidă”, Gina MANDA; Maria DOBRE, Ionela Victoria NEAGOE, Mihnea Ioan NICOLESCU; Denisa PREDEȚEANU; Laura GROȘEANU; Florian BERGHEA; Claudiu C. POPESCU; Corina MOGOȘAN; Cătălin CODREANU (prezentare orala)

² **Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach**, Antonio Cuadrado, Gina Manda, Ahmed Hassa, María José Alcaraz, Coral Barbas, Andreas Daiber, Pietro Ghezzi, Rafael León, Manuela G. López, Baldo Oliva, Marta Pajares, Ana I Rojo, Natalia Robledinos-Antón, Angela M. Valverde, Emre Guney, Harald H.H.W. Schmidt

scăderea populației limfocitare B prin scăderea cu precădere a subpopulației B-naive (celule pregătite pentru răspunsul imun), creșterea subpopulației B de memorie (probabil în context infecțios), creșterea subpopulației T-dublu negative ca rezervă pentru limfocitele T-helper. Utilitatea generală a imunofenotipării limfocitare extinse a fost cu 20% mai mare decât a imunofenotipării standard; **(c)** Pentru excluderea IDP au fost efectuate teste genetice (secvențiere de nouă generație) la 8 cazuri din cazuistica investigată imunologic. Testele genetice au vizat identificarea unor mutații prezente pe anumite gene implicate în răspunsul imun. Scopul a fost stabilirea prezenței IDP în rândul cazuisticii investigate și clarificarea departajărilor diagnostice între IDP și alte cauze de infecții recurente (imaturitate imunologică, imunodeficiențe secundare etc). Subiecții testați nu au prezentat anomalii genice caracteristice IDP, ceea ce sugerează că investigația imunologică prin imunofenotipare limfocitară extinsă este indicată pentru clarificarea etiopatogeniei infecțiilor recurente la acești copii; **(d)** Rezultatele obținute au fost comunicate la manifestări științifice interne (6) și internaționale (1) și vor constitui subiectul unor viitoare publicații și întâlniri cu medici clinicieni din domeniu.

Proiect: PN 16.22.03.05

In anul 2016: A fost introdus în studiu un lot de 16 voluntari cu vârste cuprinse între 27 - 67 ani; voluntarii sunt subiecți sănătoși, care nu au în istoric patologii reumatice și autoimune. Materialul biologic utilizat a fost sângele periferic recoltat în tuburi fără anticoagulant (capac roșu) din care a fost prelevat serul. Pentru lotul de voluntari au fost determinate prin tehnica ELISA, în condițiile laboratorului, concentrațiile serice ale următorilor parametri: factor reumatoid – IgG, factor reumatoid – IgA, factor reumatoid – IgM, anticorpi anti - peptid ciclic citrulinat (anti-CCP), proteina matriceală oligomerică de cartilaj (COMP), prin tehnica ELISA. Lotul control (reduc prin excluderea unui voluntar în cazul căruia s-a obținut o valoare patologică FR-IgA > 18U/mL) urmează să fie folosit în determinările ulterioare pentru stabilirea intervalului de referință ale anticorpilor anti-MCV, proteinei 14-3-3 η și microparticulelor serice.

In anul 2017: Au fost efectuate cercetări privind: **(a)** Stabilirea de valori ale biomarkerilor de diagnostic: FR -IgA, -IgM, proteină C-reactivă (CRP), anti-CCP, anti-MCV, 14-3-3 η pentru pacienții cu artrită reumatoidă tratați cu agenți biologici anti-TNF α ; **(b)** Stabilirea de valori ale biomarkerilor de prognostic: FR -IgG, -IgA, -IgM, anti-CCP, COMP și proteina 14-3-3 η (pentru pacienții cu artrită reumatoidă tratați cu agenți biologici anti-TNF α); **(c)** Stabilirea de valori ale biomarkerilor de monitorizare: anticorpi anti-alotip (pentru pacienții cu artrită reumatoidă tratați cu agenți biologici anti-TNF α); **(d)** Elaborarea unui protocol de izolare a microparticulelor serice; **(e)** Valori de referință pentru microparticulele serice (lot martor); **(f)** Evidențierea de modificări calitative și/sau cantitative ale microparticulelor serice pentru pacienții cu artrită reumatoidă tratați cu agenți biologici anti-TNF α ; **(g)** Realizarea de corelații între modificările valorilor markerilor serici testați

Performanțele realizate pot fi rezumate astfel: **(a)** Studiul s-a realizat pe un lot de 20 pacienți cu AR cu vârste cuprinse între 25 - 74 ani, prezentând diverse aspecte clinice stabilite prin scorul DAS28. Acești pacienți au fost tratați cu terapie biologică anti-TNF (Adalimumab, Etanercept, Infliximab). Testările s-au efectuat în dinamică, înaintea primei administrări de agent anti-TNF α (vizita 0) și ulterior tratamentului biologic (la 3 luni – vizita 1 și la 6 luni – vizita 2). Valorile parametrilor investigați pentru loturile de pacienți au fost comparate cu datele obținute pentru grupul control (subiecți sănătoși, care nu prezentau în istoric patologii reumatice și autoimune); **(b)** A fost realizat un sistem de valori normale stabilite pentru un lot control de 16 voluntari cu vârste cuprinse între 27 - 67 ani, testați în condițiile laboratorului (subiecți sănătoși, fără patologii reumatice și autoimune); au fost stabilite intervalele de valori normale ale biomarkerilor de diagnostic/prognostic: factorul reumatoid (FR – IgG, IgA, IgM), anticorpi anti - peptid ciclic citrulinat (anti-CCP), proteina matriceală oligomerică de cartilaj (COMP), anticorpi anti – vimentină citrulinată mutantă (anti-MCV), proteina 14-3-3 η ; **(c)** Au fost determinați biomarkerii de diagnostic/prognostic: factorul reumatoid (FR – IgG, IgA, IgM), proteina C reactivă (CRP), anticorpi anti - peptid ciclic citrulinat (anti-CCP), proteina matriceală oligomerică de cartilaj (COMP), anticorpi anti – vimentină citrulinată mutantă (anti-MCV), proteina 14-3-3 η . Aceștia au fost evaluați pe baza sistemului de valori

normale la pacienții luați în studiu în condițiile eșalonării testărilor: vizitele 0, 1 și 2; **(d)** A fost evaluată prezența anticorpilor anti-alotip (biomarkeri de monitorizare, predictivi ai răspunsului la tratament) la pacienții cu AR tratați cu Adalimumab și Etanercept; **(e)** A fost optimizat protocolul de izolare a microparticulelor din ser și plasmă; au fost identificate prin citometrie în flux microparticulelor plasmatică/serice în vederea cuantificării și caracterizării lor, pentru un lot control și pentru pacienți cu artrită reumatoidă; **(f)** Valorile obținute pentru biomarkerii de diagnostic, prognostic și monitorizare au fost corelate cu scorurile clinice (DAS28). Activitatea bolii a fost monitorizată pe parcursul celor trei vizite în funcție de evoluția scorului DAS28. Monitorizarea scorului DAS28 indică tendința de scădere a acestuia, activitatea bolii menținându-se intensă după 3 luni de terapie la doar 33% din pacienți, și după 6 luni la 29% din cazuri; **(g)** După șase luni de terapie anti-TNF se remarcă o ușoară tendință de scădere (comparativ cu vizita 0) în cazul FR (global), anti-MCV și proteinei 14-3-3 η . Markerul cu cea mai semnificativă normalizare / scădere a fost CRP, această evoluție sugerând reducerea inflamației. Pentru restul markerilor, monitorizarea indică o evoluție mai lentă sub tratament. Valorile concentrațiilor COMP (care se încadrează în intervalele de valori normale pe parcursul celor trei vizite) sunt în concordanță în majoritatea cazurilor cu evoluția favorabilă a scorului DAS28; **(h)** Elaborarea a 3 comunicări științifice prezentate la manifestări naționale; **(i)** elaborarea unei lucrări publicate în străinătate

Proiect PN 16.22.04.01

In anul 2016: In cadrul **fazei nr. 1** s-au realizat: **(a)** instalarea și optimizarea unor culturi celulare de celule (glioblastom, U87MG), astrocite normale, cancer mamar (linia BT-20) celule normale mamare (linia MCF12F); **(b)** experimente de cultivare, expunere la inhibitori ai căilor de semnalizare și în prezența agonistilor EGFR și INSR, date experimentale asupra caracteristicilor de răspuns celular în condițiile date. (Metoda de laborator). In cadrul **fazei nr. 2** au fost studiate: **(a)** particularități de ale celor 4 linii celulare la stimularea cu factori de creștere și la expunerea la substanțe inhibitoare ale transducției semnalului pe căile Erk/MAP și PI3K/Akt; **(b)** evaluarea răspunsului celular (expresie și activare specifică a cascadelor de semnalizare MAP/Erk și PI3K-AKT), utilizând ca modele experimentale sistemele tumoral/control, respectiv glioblastom/astrocite și cancer mamar/celule mamare normale selecționate (Studiu). In cadrul **fazei nr. 3** au fost cercetate: **(a)** particularități de răspuns celular la stimularea cu factori de creștere și expunerea la substanțe inhibitoare ale transducției semnalului pe căile Erk/MAP și PI3K/Akt ale celor 4 linii celulare; **(b)** date experimentale privind răspunsul celular, mai precis nivelul de expresie al unor molecule de semnalizare, nivelul de activare (fosforilare) al acestora și nivelul de activare al unor receptori tirozinkinazici. (Studiu)

In anul 2017 au fost rezolvate aspectele privind: **(a)** realizarea unor evaluări în timp real ale activităților proliferative, pe perechi de culturi de celule normale și tumorale, în prezența unor compuși farmacologic activi; **(b)** obținerea unor date experimentale privind capacitatea de inhibiție a migrării celulare/invazivității sub acțiunea unor compuși farmaceutici activi obținute prin monitorizarea în timp real; **(c)** stabilirea de corelații între seturile de date – obținute prin diferite metode – monitorizare în timp real, teste clasice de viabilitate și analiza Luminex.

Performanțele realizate pot fi prezentate sintetic astfel: **(a)** evaluarea expresiei receptorilor membranari implicați în activarea căilor de semnalizare prin MAPkinaze și PI3K-Akt sub acțiunea unor compuși farmaceutici activi; **(b)** evaluarea unor paneluri de molecule de semnalizare implicate în activarea căilor de semnalizare prin MAPkinaze și PI3K-Akt sub acțiunea unor compuși farmaceutici activi; **(c)** corelarea rezultatelor privind panelul de receptori membranari și molecule de semnalizare implicate în activarea căilor MAPkinaze și PI3K-Akt; **(d)** Monitorizarea în timp real a capacității de inhibiție a proliferării celulare prin acțiunea unor compuși farmaceutici – model pe celule de tip astrocit-glioblastom; **(e)** Monitorizarea în timp real a capacității de inhibiție a proliferării celulare prin acțiunea unor compuși farmaceutici – model pe limfocite – leucemie limfoblastica; **(e)** elaborarea a 4 comunicări științifice prezentate la manifestări naționale de profil.

Proiect: PN 16.22.04.02

In anul 2016: Pentru inceput a fost realizat protocolul experimental al studiului prin punerea la punct a metodologiei de investigatie in vitro. Au fost investigate in vitro, pe celule normale si tumorale, 2 tipuri de nanoparticule diferite prin dimensiuni (10 si 30 nm), in vederea selectiei tipului de nanoparticule pentru investigatii toxicologice in model animal. A fost obtinuta Autorizatia de Proiect nr. 306 / 24.10.2016, emisa de Autoritatea Nationala Sanitara Veterinara in vederea derularii studiilor in vivo din cadrul proiectului.

In anul 2017: Au fost rezolvate aspectele privind **(a)** difuzarea nanosistemelor în organismul animal normal; **(b)** obținerea de probe biologice în vederea stocării în biobancă; **(c)** difuzarea nanosistemelor in modelul animal, la nivel tumoral; **(d)** Modificarea progresiei tumorale la soarecii cu terapie comparativ cu soarecii control

Performanțele realizate pot fi rezumate astfel: **(a)** realizarea unei biobănci cu probe biologice de la modelele experimentale animale din cadrul proiectului; **(b)** realizarea unui model experimental de carcinom genital indus la șoarece; **(c)** realizarea unui amplu studiu privind comportamentul nanosistemelor *in vitro* cu celule normale și tumorale; **(d)** realizarea unui studiu privind biodistribuția nanosistemelor în model animal normal și cu tumoră

Proiect: PN 16.22.04.03

In anul 2016: Analiza efectului anti-tumoral indus de tratamentul cu doi nutrienti biologic activi, curcumin si DHA, asupra viabilitatii, proliferarii, citotoxicitatii si apoptozei pe linia celulara de glioblastom U-87 MG. Identificarea modificarilor epigenetice de la nivelul histonelor nucleozomale H3 si H4 induse de tratamentul cu cei doi nutrienti biologic activi si corelarea cu efectul anti-tumoral. Studiul expresiei unei serii de 31 de microARN-uri implicate in dezvoltarea cancerului cerebral si in mecanismele epigenetice pe celulele tratate, comparativ cu cele netratate.

In anul 2017: Au fost efectuate studii privind: **(a)** funcționalitatea microARN-urilor relevante prin transfectarea tranzientă a acestora în celule tumorale și urmărirea efectului indus asupra viabilității; **(b)** exprimarea unor microARN-uri relevante pentru studiile de epigenetica pe linii celulare tumorale; **(c)** caracterizarea expresiei acestor microARN-uri prin studii de viabilitate si proliferare celulara pentru evaluarea efectului anti-tumoral; **(d)** caracterizarea fenotipica a liniilor celulare ce exprima microARN-uri relevante; **(e)** analiza expresiei genice si a proteinelor implicate in mecanisme epigenetice.

Performanțele realizate constau în realizarea de studii privind: **(a)** efectul anti-tumoral al compusilor biologic activi (curcumi si DHA) pe linii celulare maligne, prin studii de proliferare si viabilitate celulara, videomicroscopie; **(b)** corelarea efectului anti-tumoral cu modificarile epigenetice induse de compusii biologic activi la nivelul unor proteine implicate in mecanismele epigenetice celulare; **(c)** modularea epigenetica la nivelul expresiei microARN-urilor, induse de tratamentele cu nutrienti biologic activi cu efect anti-tumoral pe celulele de glioblastom; **(d)** efectul anti-proliferativ indus de supraexprimarea a doua microARN-uri din clusterul 143/145 pe linii celulare tumorale de tip adenocarcinom de san (MCF-7) si glioblastom (U-87MG); **(e)** obținerea de date de optimizare a transfectiei cu oligo ARN-uri dublu catenare pentru supraexprimarea acestora pe linii celulare tumorale; **(f)** efectul supraexprimării microARN-urilor din clusterul 143/145 asupra proteinelor de tip DNMTs, implicate in mecanismele epigenetice de metilare a ADN-ului genomic; **(g)** 2 comunicări științifice, 1 lucrare publicată în străinătate; 2 propuneri de proiecte PN III depuse

Proiect: PN 16.22.04.04

In anul 2016: Au fost analizate populatiile de celule NK provenite de la doua linii de șoareci, șoareci C57BL/6 - șoareci sălbatici și linia de șoareci modificali genetic B6.129S7-Rag1tm1Mom/J - șoareci care nu au limfocite B si T. Celule NK au fost izolate de la soareci sănătoși, care au fost caracterizate fenotipic prin citometrie in flux. Izolarea populatiei de celule NK s-a realizat printr-o tehnica ce foloseste microsferes (para)magnetice cuplate cu anticorpi caracteristic populatiilor celulare. Procedura a fost aplicată suspensiilor celulare obtinute din splina. Markerii investigati au fost: NK1.1, CD49b, CD69, CD28, gp49R, CD27, CD11b, CD43, CD25, CD122, CD132, CD360. A fost testat in vitro efectul

citokinelor (IL-15 și IL-21) asupra celulelor NK splenice privind proliferarea, viabilitatea și citotoxicitatea celulară. Populația de celule NK provenită de la soareci B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J a fost modulate *ex vivo* cu interleukine, singure și în combinație. Multiplicarea și supraviețuirea celulară au fost evaluate prin determinarea proliferării celulare și supraviețuirii celulare, iar activarea celulară a fost evaluată prin determinarea citotoxicității celulare. Celulele splenice NK îmbogățite prin selecție negativă de la soareci Rag1^{-/-}, au fost cultivate în prezenta combinației de citokine și analizate pentru evidențierea expresiei fenotipice. A fost investigat un panel larg de proteine de suprafață pentru a determina fenotipic și funcțional posibilele modificări suvenite în urma modularii celulelor NK cu citokinele, și anume: markeri de linie: CD161 (NK1.1), CD49b (DX5); markeri de activare și maturare: CD69, CD28, gp49R, CD27, CD11b, CD43; markeri pentru receptori de citokine: CD25(IL-2R α), CD122(IL-2R/IL-15R β), CD132(lantul comun γ), CD360(IL-21R α).

In anul 2017: A fost obținută o populație pură de celule NK de la șoareci purtători de tumoră și caracterizarea fenotipică prin citometrie în flux a celulelor NK. S-au obținut date privind efectul modulator al citokinelor pe celule NK provenite de la șoareci purtători de tumoră, prin studii de proliferare, viabilitate și citotoxicitate celulară. Au fost realizate celule NK activate *ex vivo* cu citokine, viabile și proliferative, cu potențial citotoxic intensificat și s-a realizat un protocol de transfer adoptiv la șoareci purtători de tumoră al celulelor NK activate *ex vivo* cu citokine. A fost efectuată caracterizarea fenotipică a celulelor NK transferate adoptiv.

Performanțele realizate constau în: **(a)** obținerea de celule NK activate *ex vivo* cu citokine, viabile și proliferative, cu potențial citotoxic intensificat, destinate transferului adoptiv la animale purtătoare de tumoră; **(b)** realizarea unui protocol de terapie celulară bazată pe celulele NK, capabil să încetinească progresia tumorală, cu efecte adverse acceptabile. În ceea ce privește diseminarea rezultatelor punctăm: **(a)** 1 articol cu rezultate originale, 1 articol de tip review și 4 abstracte publicate în țară și străinătate; **(b)** 8 participări la conferințe naționale și 1 participare la o conferință internațională în domeniul imunologiei, sănătății și experimentării pe animale și **(c)** promovarea proiectului într-o pagină web (<https://www.ivb.ro/v3/ro/ongoing-pn-projects/>). De asemenea, a fost realizată instruirea membrilor tineri ai echipei (doctoranzilor) în domeniul metodologiei de cercetare preclinică în terapii celulare;

Proiect: PN 16.22.04.05

In anul 2016: Au fost efectuate cercetări privind: **(a)** caracterizarea lotului de studiu; **(b)** stabilirea metodologiei și a protocoalelor de investigare a leziunilor genitale; **(c)** debutul constituirii lotului de studiu

In anul 2017: Activitatea s-a concentrat pe rezolvarea următoarelor aspecte: (a) analiza imunohistochimică a cazurilor selectate. Au fost investigați imunohistochimic markeri uzuali și markeri de stres oxidativ exprimați la nivelul țesutului tumoral sau peritumoral, relativ la peroxidarea lipidică (malon dialdehidă, MDA), oxidarea ADN (8-oxoguanine, 8-OHdG) și nitrozilarea proteinelor (nitrotirozina, 3-NT). În urma acestui studiu, tumorile au fost clasificate în funcție de intensitatea stresului oxidativ; (b) realizarea unui screening al gradului de expresie al genelor care codifica pentru molecule implicate în stresul oxidativ și răspunsul antioxidant; (c) realizarea unui screening al gradului de expresie al genelor care codifica pentru molecule implicate în stresul oxidativ și răspunsul antioxidant utilizând kitul Human Oxidative Stress Plus PCR Array (Qiagen) utilizând probele tumorale și peritumorale selectate; (d) evidențierea imunohistochimică și cuantificarea prin Western blotting a proteinelor codificate de genele distinctiv supra- sau subexprimate în țesutul tumoral comparativ cu cel peritumoral în vederea validării rezultatelor

Performanțele realizate pot fi rezumate astfel: Utilizarea unor markeri imunohistochimici de stres redox prin optimizarea metodelor de lucru. Menționez că fiind foarte important faptul că pentru fragmentele cervicale, există un grad variabil, dar în general avansat de marca electrică, ceea ce ridică mari probleme în realizarea tehnicilor de biologie moleculară, de aceea extracția ADN în aceste cazuri este laborioasă și necesită protocoale optimizate. Pentru cazurile cu artefacte marcate, atât de tip electrocoagulare cât și de tip ischemic, sunt necesare noi optimizări pentru obținerea rezultatelor

multumitoare. De asemenea, în cadrul proiectului au fost elaborate două comunicări științifice prezentate la manifestări naționale de profil.

Proiect: PN 16.22.05.01

In anul 2016: Dezvoltarea unui nucleu de cercetare vizând analiza și managementul datelor obținute prin aplicații genomice de tipul hibridizare genomica comparativa bazata pe array (aCGH) și secvențiere de noua generație (NGS). Astfel, în acest an (2016) s-au desfășurat activități de evaluare comparativa a bazelor de date/ programelor/aplicațiilor de analiza genomica publice și comerciale, precum și configurarea de algoritmi bioinformatici de prelucrare a datelor de aCGH, NGS utilizând datele proprii și/sau date publice.

In anul 2017: Activitatea s-a concentrat pe rezolvarea următoarelor aspecte: **(a)** stabilirea de modele de analiză, evaluare și interpretare a variațiilor genomice / genice în afecțiunile cu modificări genetice dobândite; **(b)** stabilirea de modele de analiza, evaluare și interpretare a variațiilor genomice / genice în afecțiunile cu modificări genetice constituționale; **(c)** realizarea de protocoale validate de analiza și interpretare a datelor obținute cu tehnici genomice; **(d)** realizarea design-ului pentru baza de date

Performanțele realizate constau în: **(a)** configurarea de algoritmi bioinformatici de prelucrare a datelor de aCGH și NGS utilizând datele proprii și/sau date publice și au fost create protocoale de prelucrare și analiza de date genomice pentru patologia constituțională și pentru cea oncologică; **(b)** 8 lucrări comunicate la manifestări științifice naționale (5) și internaționale (3)

Proiect: PN 16.22.05.02

In anul 2016: Proiectul investighează prin secvențiere de generație următoare un lot de pacienți cu boli de neurodezvoltare (dizabilitate intelectuală, tulburări de spectru autist), confirmați genetic fără anomalii asociate sindromului X fragil sau cromozomiale (cariotip în bandare GTG și cariotip molecular normal), în vederea detectării modificărilor cauzative, cu descrierea arhitecturii genomice și mecanismelor patogenetice și, respectiv, a realizării de corelații genotip-fenotip per pacient și per grup de fenotipuri. Astfel, în primul an a fost constituit lotul preliminar de studiu și a fost realizat designul experimental pentru evaluarea statutului X fragil (evaluarea propriu-zisă urmand a fi realizată în fază consecutivă).

In anul 2017: Activitatea s-a concentrat pe rezolvarea următoarelor aspecte: **(a)** realizarea unui protocol optimizat pentru testul X fragil. Lot preliminar de pacienți caracterizați pentru statutul X fragil; **(b)** realizarea unui protocol optimizat de NGS; **(c)** obținerea unui set de date brute NGS; **(d)** interpretarea datelor brute NGS; **(e)** realizarea unui set de corelații genotip-fenotip

Performanțele realizate pot fi prezentate, în rezumat, astfel: **(a)** au fost implementate, în arsenalul Laboratorului de Genetică Medicală, tehnici de investigație a repetițiilor trinucleotidice de pe cromozomul Xq28 responsabile pentru sindromul X fragil; **(b)** a fost investigat defectul genetic cauzativ al tulburărilor de neurodezvoltare cu un panel de gene implicate în dezvoltarea sistemului nervos, în scopul facilitării managementului clinic; **(c)** a fost obținut un lot de pacienți analizat pentru sindromul X fragil, potențial disponibil pentru studii ulterioare de tipul WES, WGS sau pentru studii epigenetice; **(d)** Au fost elaborate 2 comunicări științifice prezentate la manifestări naționale de profil

Proiect: PN 16.22.05.03

In anul 2016: Studiu de optimizare, în vederea alegerii condițiilor optime experimentale prin realizarea mai multor variante experimentale: tipuri de chipuri CM 10 și Q10 utilizând soluții tampon diferite. A fost definit protocolul necesar achiziției de date cu ajutorul programului "Protein Chip DATA Manager" și a fost dezvoltată metoda specifică de analiză proteomică prin tehnologia - SELDI-TOF MS.

In anul 2017: Activitatea în cadrul proiectului a presupus: **(a)** caracterizarea profilului proteic de referință în cancer prin spectrometrie de masă SELDI-TOF MS la nivel seric; **(b)** integrarea rezultatelor obținute în urma realizării profilului proteic prin spectrometrie de masă SELDI-TOF MS; **(c)** optimizare protocol experimental pentru evaluarea profilului proteomic prin tehnologia 2D-DIGE; **(d)** corelarea rezultatelor obținute în urma evaluării profilului proteomic prin 2D-DIGE; **(e)** utilizarea unor instrumente bioinformaticice specifice (Biomarker Pattern Software) în vederea configurării panelului de biomarkeri

Performanțele realizate constau în: **(a)** dezvoltarea metodei specifice de analiza proteomica prin tehnologiile avansate - SELDI-TOF MS; **(b)** Integrarea rezultatelor obținute în urma realizării profilului proteic prin spectrometrie de masă SELDI-TOF MS; **(c)** Optimizare protocol experimental pentru evaluarea profilului proteomic prin tehnologia 2D-DIGE; **(d)** Corelarea rezultatelor obținute în urma evaluării profilului proteomic prin 2D-DIGE; **(e)** Utilizarea unor instrumente bioinformaticice specifice (Biomarker Pattern Software) în vederea configurării panelului de biomarkeri

2.2. Proiecte contractate:

Cod obiectiv	Nr. proiecte contractate	Nr. proiecte finalizate	Valoare (mii lei)		Total (lei)
			2016	2017	
1. PN 16.22.01. Medicina de precizie în patologia tumorală	4	4	900,000	1.232,500	2.132,500
2. PN 16.22.02 Medicina de precizie în procesele degenerative și regenerative	5	5	1.500,000	1.274,000	2.774,000
3. PN 16.22.03. Rolul medicinei de precizie în procesele inflamatorii	5	5	1.300,000	1.538,804	2.838,804
4. PN 16.22.04. Terapia țintită ca instrument în implementarea medicinei de precizie	5	5	1.300,000	1.432,000	2.732,000
5. PN 16.22.05. Tehnologiile omice în diagnosticul de precizie	3	3	450,182	1.068,500	1.518,682
Total:	22	22	5.450,182	6.545,804	11.995,986

2.3 Situația centralizată a cheltuielilor privind programul-nucleu : Cheltuieli în lei

	2016	2017	Total
I. Cheltuieli directe	4.291.349	4.656.996	8.948.345
1. Cheltuieli de personal	2.105.509	2.723.360	4.828.869
2. Cheltuieli materiale și servicii	2.186.439	1.933.636	4.119.476
II. Cheltuieli Indirecte: Regia	1.072.833	1.862.808	2.935.641
III. Achiziții / Dotări independente din care:	86.000	26.000	112.000
1. pentru construcție/modernizare infrastructura	0	0	0
TOTAL (I+II+III)	5.450.182	6.545.804	11.995.986

3. Analiza stadiului de atingere a obiectivelor programului (descriere)

Temele abordate în cadrul programului s-au încadrat în următoarele obiective:

1. **Medicina de precizie în patologia tumorală.** În cadrul obiectivului 1 au fost derulate următoarele teme:
 - a) Descifrarea arhitecturii moleculare a leucemiilor acute – markeri de prognostic și orientare terapeutică
 - b) Markerii moleculari noi în diagnosticul pozitiv și diferențial al tumorilor maligne epiteliale intestinale: expresia SATB2 și BRAF în tumorile tractului gastro-intestinal și comparativ cu alte tipuri de adenocarcinoame

- c) Transportul miRNA prin ectozomi în patologii hematologice maligne
 - d) Micro-ARN – ținta terapeutică în cancerul colorectal cu mutații la nivelul familiilor de oncogene *ras* și *raf*
2. **Medicina de precizie în procesele degenerative și regenerative.** Pentru cel de-al doilea obiectiv cercetările au abordat următoarele teme:
- a) Alterarea barierei hemato-nervoase în diferite tipuri de neuropatii periferice: modificarea expresiei proteinelor joncțiunilor strânse ca marker diagnostic
 - b) Implicarea telocitelor în procesul de regenerare
 - c) Biomarkeri proteomici și epigenetici în miozite și distrofii musculare, importanța lor în diagnosticul de precizie și ca posibile ținte terapeutice
 - d) Studiul capacității regenerative a glandelor salivare
 - e) Identificarea de interacțiuni moleculare implicate în regenerarea mușchiului distrofic
3. **Rolul medicinei de precizie în procesele inflamatorii.** Acest obiectiv a investigat următoarele teme:
- a) Expresia ARNm a mediatorilor modulatori ai inflamației în bolile inflamatorii cronice intestinale în fazele de activitate și de remisiune clinică și endoscopică
 - b) Rețele moleculare care conectează inflamazomul NLRP3 și semnalizarea redox în artrita reumatoidă
 - c) Aspecte fenotipice și moleculare ale unor subseturi limfocitare implicate în infecțiile recurente la copii: B de memorie, plasmocite, T dublu-negative
 - d) Arhitectura moleculară a membranei filtrante în patologia imună glomerulară
 - e) Set de biomarkeri, anticorpi anti-alotip și profilul microparticulelor serice în artrita reumatoidă tratată cu agenți biologici anti-TNF
4. **Terapia țintită ca instrument în implementarea medicinei de precizie.** Abordările din cadrul acestui obiectiv s-au orientat către următoarele teme:
- a) Modularea semnalizării intracelulare - țintă terapeutică în medicina de precizie
 - b) Implicațiile terapeutice ale stresului oxidativ în tumorile aparatului genital feminin
 - c) Identificarea de biomarkeri epigenetici prin modularea mecanismelor epigenetice cu compuși biologic activi pe linii celulare tumorale
 - d) Imunoterapie țintită în cancer bazată pe profilul molecular al tumorii
 - e) Nanosisteme pentru aplicații medicale. Candidați pentru terapia adjuvantă în cancer
5. **Tehnologiile omice în diagnosticul de precizie.** Pentru dezvoltarea eficientizării diagnosticelor, acest obiectiv a abordat următoarele teme:
- a) De la aspecte patogenetice ale neurodezvoltării la entități clinice - caracterizarea moleculară a bolilor neuropsihiatrice rare
 - b) Semnătura proteică stabilită prin tehnologii proteomice în diagnosticul de precizie în cancer
 - c) Aplicații genomice și postgenomice de analiză și management al datelor – instrumente esențiale în medicina de precizie

Ținte stabilite pentru atingerea obiectivelor: Țintele urmărite de program se potențează reciproc și se încadrează în domeniile și tematicile științifice de dezvoltare viitoare a institutului pe termen mediu și lung. Ele se corelează cu orientările SNDCl 2014-2020 din domeniile **Sănătate** și **Bioeconomie** prezentând coerență și interrelație în cadrul Programului nucleu ofertat și cu scopul vizat de temă – **medicina de precizie**. Aceste ținte sunt corelate și cu orientarea generală a activității de cercetare a institutului, prezentând complementaritate cu proiectele aflate în derulare, oferite și/sau câștigate prin competiție în alte programe de cercetare naționale (Programele Idei, Parteneriate, Tinere

echipe, PED, Proiecte complexe, Proiecte Sectoriale) sau cu finanțare europeană (Horizon 2020, ERANET, POC, SANCO, COST, proiecte bilaterale).

Aceste ținte se pot sistematiza prin următoarele:

- ❖ Stabilirea de noi seturi de biomarkeri moleculari în patologia tumorală (obiective 1, 2, 3, 5)
- ❖ Descifrarea unor mecanisme patogenice prin abordări inovatoare bazate pe identificarea unor dereglări ale rețelelor de semnalizare precum și a unor modificări (epi)genetice sau proteomice (obiective 1, 2, 3, 4, 5)
- ❖ Definirea relațiilor genotip-fenotip relevante farmacologic în vederea unor noi abordări terapeutice (obiective 1, 3, 4)
- ❖ Comunicarea celulară în definirea/păstrarea/reprogramarea identității celulare/tisulare (obiective 1, 2, 3)

Indicatorii asociați pentru atingerea acestor ținte au fost:

- publicații: articole ISI (minim 4 per obiectiv), articole BDI (minim 6 per obiectiv)
- comunicări: manifestări interne (minim 8 per obiectiv), manifestări internaționale (minim 4 per obiectiv)
- organizare de manifestări științifice/simpozioane – 1 per an:
 - ❖ În perioada **24 – 26 noiembrie 2016** a fost organizată **Sesiunea Științifică Anuală a institutului (AI 9-lea Simpozion Național de Patologie)**
 - ❖ În perioada **23 – 25 noiembrie 2017** a fost organizată **Sesiunea Științifică Anuală a institutului (AI 10-lea Simpozion Național de Patologie)**
 - ❖ participare la organizarea Conferinței Societății de Imunologie din România, sesiunea 2017
- inițierea de colaborări interne și internaționale în vederea unor propuneri de proiecte – minim 1 per obiectiv. Astfel, în cei doi ani de derulare a Programului Nucleu s-a realizat, inițierea a peste 50 de colaborări naționale în vederea participării la ofertarea a 18 proiecte complexe precum și peste 20 de colaborări în vederea participării la ofertarea a 2 proiecte sectoriale. Toate aceste colaborări au drept parteneri universități, institute naționale de cercetare, institute de cercetare ale Academiei Române precum și parteneri din mediul privat. De asemenea colaborări din anul precedent (2016) au fost fructificate prin demararea activităților de cercetare în cadrul proiectelor PED. De asemenea au fost inițiate colaborări internaționale în vederea participării la rețele de cercetare de tip COST pentru elaborarea de propuneri de proiecte HORIZON 2020 și/sau bilaterale ori alte tipuri de proiecte europene / internaționale pe termen mediu sau lung.

Din cele prezentate se poate constata că indicatorii asumați au fost realizați în totalitate în perioada de derulare a acestui Program Nucleu.

4. Prezentarea rezultatelor (a se vedea materialul din website)

7. Alte rezultate: (a se specifica, dacă este cazul).

8. Aprecieri asupra derulării programului și propuneri:

Din cele prezentate în acest raport reiese că temele din cadrul programului au fost derulate cu succes, reprezentând un mijloc de obținere a unor rezultate științifice ce vor argumenta credibilitatea și fezabilitatea proiectelor ce se vor depune în viitoare competiții, naționale și internaționale, de finanțare a cercetării. Obiectivele au fost îndeplinite astfel încât indicatorii asumați prin oferta de Program Nucleu au fost realizați în totalitate. Fondurile alocate au fost judicios utilizate, după cum se dovedește prin rezultatele prezentate în rapoartele anuale de activitate aferente anilor 2016 și 2017.

Punctăm doar câteva dintre realizările pe care finanțarea acestui Program Nucleu le-a făcut posibile:

- ❖ 118 lucrări elaborate reprezentând lucrări publicate în țară și străinătate ori comunicări științifice la manifestări naționale și internaționale;
- ❖ inițierea a peste 50 de colaborări naționale în vederea participării la ofertarea a 18 proiecte complexe precum și peste 20 de colaborări în vederea participării la ofertarea a 2 proiecte sectoriale. Toate aceste colaborări au drept parteneri universități, institute naționale de cercetare, institute de cercetare ale Academiei Române precum și parteneri din mediul privat. În acest ultim caz se pot crea premisele realizării, pe termen mediu și lung, unor parteneriate public/privat.
- ❖ 13 proiecte internaționale și 41 proiecte naționale oferite (în cei doi ani de derulare a temelor) având ca bază de plecare date experimentale și studii ce valorifică avansat cercetările efectuate în cadrul Programului Nucleu. Apreciem că integrarea Institutului în consorții internaționale (cca. 25% din totalul ofertelor de proiecte de cercetare) este de natură a crește vizibilitatea cercetării biomedicale românești pe plan european și internațional.

Având în vedere cele prezentate, considerăm că, o finanțare care să permită reunirea unor proiecte de cercetare sub o tematică complexă, conducând la o amplă colaborare între structurile de cercetare ale institutului (colective, laboratoare, secții), valorificând la cote avansate infrastructura și baza logistică este benefică creșterii performanței și competitivității. În plus, continuarea unor finanțări de impact la nivel instituțional va avea ca efect atragerea de tineri cercetători și atingerea masei critice de resurse umane înalt specializate permițând dezvoltarea și valorificarea la cote avansate a rezultatelor cercetării în domeniul sănătății, domeniu prioritar la nivel european și național.

DIRECTOR GENERAL
Prof. Dr. Mihail Eugen **HINESCU**

DIRECTOR DE PROGRAM
Dr. Mircea **LEABU**

DIRECTOR ECONOMIC
Ec. Mariana **GEORGESCU**