

# **Creșterea capacității de cercetare științifică și de intervenție medico-militară în managementul consecințelor unor incidente/accidente cu agenți CBRN**

## **Cod PN 23 44 02 01**

### **Faza 1/2023: Identificarea și optimizarea unor metode de testare, diagnostic și/sau strategii terapeutice aplicabile în cazul expunerii experimentale la simulatori/agenți chimici, biologici și radiologici**

#### **Obiective fază 1/2023:**

- realizarea unui set de metode de diagnostic analitic de identificare a unor compuși chimici specifici și un model experimental antidot preventiv complex cu efect neuroprotector;
- realizarea unui portofoliu de simulanți/agenți biologici și toxine, utilizabil în omologarea unor echipamente militare pentru detecție și avertizare biologică;
- realizarea de metode de dozimetrie biologică și identificare de produse/compuși cu potențial radioprotector;
- realizarea de strategii terapeutice experimentale în vederea reducerii neurotoxicității și identificarea unor potențiali neuroprotectori și a unor biomarkeri specifici asociați gradului de neurotoxicitate;
- dezvoltarea unui portofoliu de metode de medicină regenerativă folosind celule stem în vederea îmbunătățirii terapiilor celulare unor afecțiuni induse de agenți din spectrul CBRN;
- corelații clinico-paraclinice și abordare terapeutică în intoxicațiile acute cu substanțe neurotoxice inhibitoare de colinesterază;
- realizarea de metode experimentale pe model animal, îmbunătățite ca relevanță și valoare de translaționare sau aplicare directă, în vederea validării cercetărilor din domeniile specifice proiectului.

#### **Rezultate fază 1/2023:**

#### **Activitatea 1:**

#### **Studiu de documentare pentru definirea designului experimental de investigare în laborator după expunerea la pesticidele organofosforice (OP).**

Pentru astfel de investigații s-a observat că se manifestă trei căi biochimice principale: *activitatea colinesterazei este inhibată (ChE), esteraza țintă a neuropatiei este inhibată (NTE) și grupările alchil atașate la atomul de fosfor sunt eliberate*. Grupările alchil active libere pot provoca alchilarea macromoleculilor de ADN și ARN, dar mecanismul principal și specific al toxicității OP este inhibarea ChE. Neurotransmițătorul acetilcolina este hidrolizat prin catalizare în colină și acid acetic în prezența familiei de enzime numite colinesteraze. Enzimele implicate sunt acetilcolinesteraza (AChE) și butirilcolinesteraza (BChE). *Standardul de aur pentru monitorizarea activității enzimelor AChE și BChE este analiza colorimetrică Ellman sau analiza electrometrică Michel folosind sânge integral, plasmă, ser și pete de sânge uscat*. Estimarea

activității colinesterazei poate fi stabilită prin determinarea acidului acetic utilizând metode manometrice, potențiometrice și titrimetrice și prin detectarea tiocolinei sau a altor substraturi folosind metode de spectrofotometrie, fluorimetrie și chemiluminiscentă.

O altă abordare este **detectarea directă a substanțelor toxice și a metaboliților acestora**, prin spectrometria de masă cuplată cu cromatografia gazoasă (GC-MS) și spectrometria de masă cuplată cu cromatografia lichidă (LC-MS). *Activitatea neurotransmițătorului acetilcolină (ACh)* este reglată de AChE atât în sistemul nervos periferic, cât și în cel central, astfel inhibarea AChE duce la acumularea de ACh în joncțiunile sinaptice colinergice. Datorită stimulării persistente a receptorilor colinergici, toxicitatea acută a OP se manifestă prin suprastimularea și desensibilizarea ulterioară a situsurilor receptorilor colinergici periferici și centrali. Structura enzimei este permanent alterată în timp din cauza procesului de îmbătrânire care implică dezalchilarea radicalului fosforil al AChE. Radicalul încărcat negativ rezultat este stabilizat prin interacțiunea cu His440 catalitic și niciun reactivator nucleofil nu poate restabili AChE la starea sa originală. Panelul clinic este legat de structura și, de asemenea, cantitățile de OP care au fost implicate în expunerea indivizilor. Colinesterazele sunt codificate de gene diferite și au specificitate diferită de substrat. *BChE* este prezentă în mai multe țesuturi, inclusiv în plasmă, iar rolul său fiziologic nu este încă pe deplin elucidat.

**Activitățile AChE și BChE au fost utilizate ca biomarkeri ai expunerii la OP.** Chiar dacă au fost măsurate în celule roșii din sânge sau în plasmă, o activitate scăzută va indica o expunere anterioară la o substanță din clasa OP. Din păcate, nu există o corelație specifică între compusul chimic și un anumit nivel de inhibare a AChE eritrocitară sau a BChE plasmatică. Pentru a monitoriza recuperarea după o expunere inițială, trebuie efectuate mai multe determinări repetate la intervale de timp diferite pentru a observa dacă are loc o creștere semnificativă a activității enzimatică. Măsurarea activității colinesterazei este importantă în examinările preliminare ale persoanelor expuse la pesticide. Studiile au arătat că BChE este mai sensibilă la unii dintre inhibitori, așa că s-a propus doar testarea BChE pentru monitorizarea reactivării în timpul tratamentului. Cu toate acestea, BChE plasmatic nu este un indicator mai bun al expunerii pentru toți compușii OP. Mai mult, variabilitatea sa poate fi determinată de alte condiții patologice, fiziologice, factori exogeni și/sau fondul genetic (sarcină, afectarea hepatică, medicamente).

## **Activitatea 2:**

### **Testarea *in vitro* a inhibiției colinesterazei centrale și periferice datorată toxicității unor simulatori de agenți chimici.**

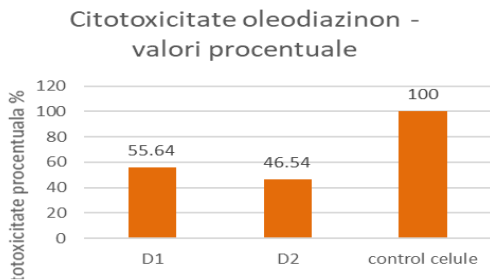
A fost realizat un **model experimental *in vitro* de evaluare a toxicității** prin incubarea unei culturi de fibroblaste NHDF ( $10^6$  celule/ml) cu **Dimpylate (oleodiazinon)** (insecticid organofosforic membru al clasei pirimidinelor cu proprietăți toxicologice similare agenților chimici neurotoxici)

- **Testarea citotoxicității** a presupus prepararea în soluții de lucru de concentrații de 0,8 și respectiv 0,08  $\mu\text{M}/\text{ml}$ .

- **Evaluarea citotoxicității** a fost realizată prin determinarea creșterii celulare cu **kitul MTT (Sigma)** care conține soluția MTT (5 mg/ml MTT în RPMI-1640 fără roșu fenol) și solventul MTT

(0.1 N HCl în isopropanol anhidru). Testul se bazează pe *măsurarea conversiei MTT într-un produs colorat în celulele vii*.

Valorile procentuale ale citotoxicității celulare induse asupra fibroblastelor umane corespunzătoare celor două concentrații (0,8 și respectiv 0,08  $\mu\text{M/ml}$ ) ale compusului organofosforic testat, au fost de **55,64 %** și respectiv **46,54 %**.



	Citotoxicitate %	Concentrație micromolara toxic
D1	55.64	0.8
D2	46.54	0.08
control celule	100	0

### Concluzii

- Mecanismul citotoxicității oleodiazinonului (Dimpylat) asupra liniei celulare de fibroblaste umane constă în inhibiția acetilcolinesterazei din fibroblaste, agresiune oxidativă și apoptoză.
- Citotoxicitatea compusului mai sus este evidentă la concentrații micromolare și se corelează direct proporțional cu acestea.
- Valoarea de 0,8  $\mu\text{M/ml}$  este apropiată de concentrația inhibitorii 50% (CI 50) pentru acest toxic la care a fost expusă linia de fibroblaste umane NHDF.

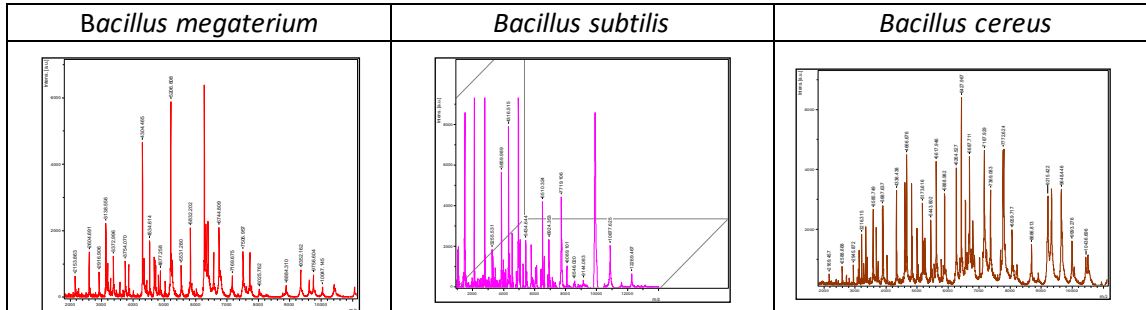
### Activitatea 3:

#### Investigarea microbiologică a simulanților pentru agenți biologici bacterieni.

Armele biologice pot conține agenți biologici vii (bacterii, virusuri) „militarizați” denumiți Agenți Biologici de Război (ABR) și agenți biologici nevii (toxine microbiene, vegetale etc.) care acționează ca și substanțele toxice, dar sunt obținute prin biosinteză (STANAG NATO 4632)

Agenții biologici cu importanță medico-militară cauzează boli infecțioase contagioase sau necontagioase, letale sau incapacitante, pentru care există tratament specific sau nu. În acest context, este foarte important să fim pregătiți cu mijloace specifice pentru detecție timpurie și avertizare. În astfel de condiții, existența portofoliului de simulanți/agenți biologici bacterieni și toxine, utilizabil în omologarea unor echipamente militare pentru detecție și avertizare biologică, dezvoltat în cadrul studiului, poate fi un instrument extrem util pentru Sistemul Național de Apărare.

Dintre toți acești agenți infecțioși, bacteriile sunt cel mai ușor de manipulat în vederea utilizării ca arme biologice. De aceea, studiile au fost realizate pe tulpini bacteriene aparținând genului *Bacillus*, ca și **simulanți de agenți biologici bacterieni** și analizate prin spectrometrie de masă cu echipamentul MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight).



Au fost optimizate condițiile de cultivare a microorganismelor selectate în vederea realizării unei fișe de tulpină cu caracteristicile fiecăreia în parte. Acestea conțin date cu caracterele mediilor utilizate pentru revitalizare și cultivare, temperaturile optime de cultivare pentru a obține o reproductibilitate fidelă și termeni egali de comparare între tulpini, caracteristicile morfotinctoriale asociate cu imaginile de frotiu pentru documentarea purității acestora și spectrele de masă obținute cu picurile caracteristice pentru fiecare identificare în parte.

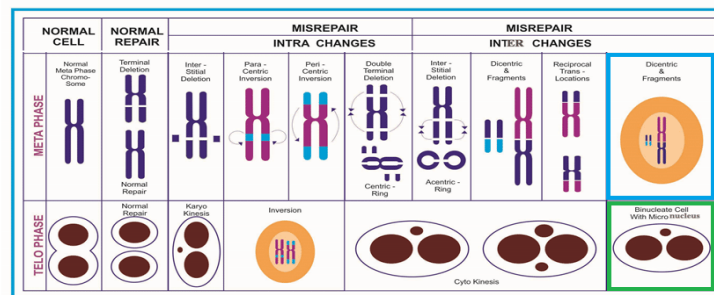
### Concluzii

- ❑ Tulpinile au fost stocate în medii de crioconservare pentru a putea fi utilizate în vederea realizării portofoliului de simulanți de tulpini bacteriene propus.

### Activitatea 4:

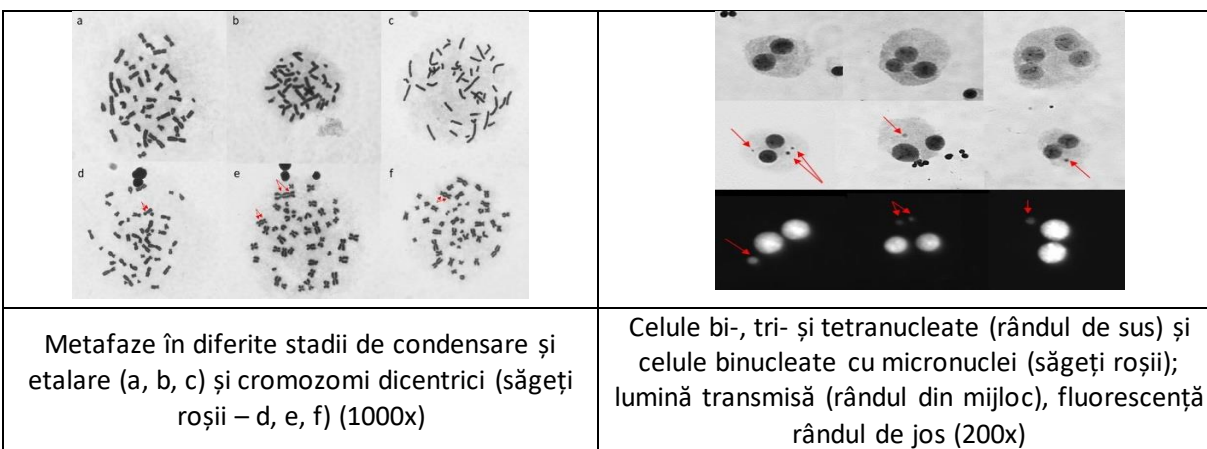
#### Estimarea dozei absorbite de raze X prin tehnica micronucleilor și a cromozomilor dicentrici.

Dozimetria biologică reprezintă o metodă esențială și recunoscută la nivel internațional pentru evaluarea expunerii la radiații și estimarea dozelor în urma unei presupuse supraexpuneri. Această metodă se bazează pe măsurarea modificărilor biologice care apar în organism în urma expunerii la radiații ionizante. Radiațiile ionizante au capacitatea de a provoca rupturi în molecula de ADN. În timpul ciclului celular, aceste rupturi pot fi observate în metafază sub forma cromozomilor anormali, care prezintă doi centromeri (cromozomi dicentrici) și a fragmentelor acentrice, în timp ce în telofază aceste modificări se manifestă sub forma micronucleilor. În cadrul proiectului s-au efectuat *optimizări ale metodelor de lucru pentru cuantificarea cromozomilor dicentrici și a micronucleilor în limfocite umane expuse la radiații ionizante.*



Pentru analiza cromozomilor dicentrici, cele mai bune rezultate au fost obținute pentru hipotonizare timp de 15 de minute, uscare la 60°C cu căldură uscată timp de 1 oră, și colorare timp

de 5 minute cu soluție 3:1 Gurr buffer:Giemsa R66. Pentru analiza micronucleilor, cele mai bune rezultate au fost obținute pentru hipotonizare timp de 10 minute și colorare timp de 5 minute cu soluție 3:1 Gurr buffer:Giemsa R66. Preparatele colorate fluorescent au fost analizate în sistemul automat Metafer5. Aceste analize au implicat probe de sânge periferic uman recoltat pe anticoagulant (litiu-heparină), iradiate cu radiații X între 0 Gy și 4 Gy, cu o perioadă de incubare de 37°C/2 ore. În final, testele cromozomilor dicentrici și micronucleilor cu blocarea citochinezei au furnizat imagini de microscopie detaliată, oferind o perspectivă asupra stadiilor de condensare și etalare ale cromozomilor (Figura 3), precum și asupra indicelui de diviziune (celule bi-, tri- și tetranucleate) și a formării micronucleilor.



### Concluzii

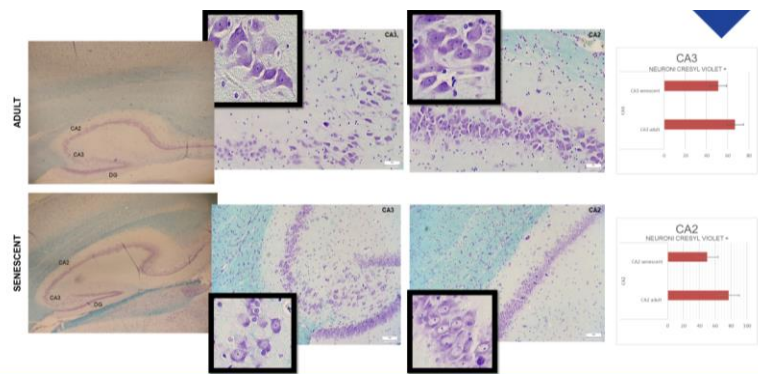
- ❑ Optimizările efectuate în cadrul proiectului au contribuit la obținerea de preparate potrivite pentru cuantificarea cromozomilor dicentrici și a micronucleilor. Aceste îmbunătățiri pun bazele dezvoltării unor proceduri operaționale standard pentru întărirea capacității laboratorului de Radiobiologie Experimentală de intervenție în contextul accidentelor sau incidentelor radiologice/nucleare prin evaluarea și monitorizarea expunerii la radiații a persoanelor afectate.

### Activitatea 5:

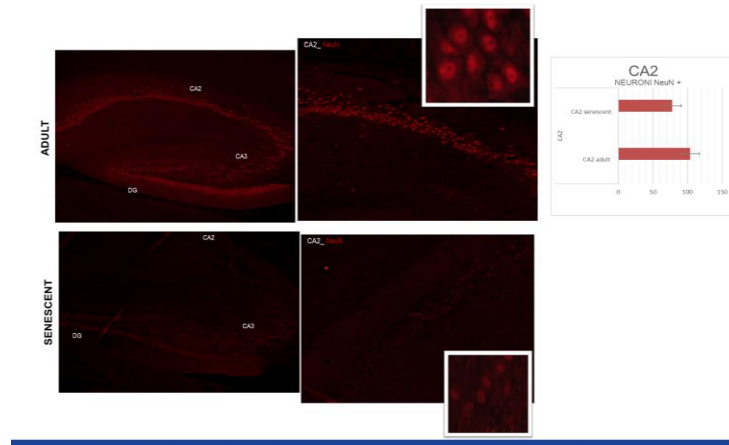
#### Evaluare in vivo a modificărilor morfologice cerebrale, a gradului de degenerare neuronală și a permeabilității la nivelul barierei hemato-encefalice.

S-au folosit piese biologice din histoteca laboratorului de Neurobiologie. Pentru stabilirea celei mai eficiente metode de fixare a țesutului cerebral, analiza s-a realizat pe piese biologice fixate în 10% formalină și respectiv, 4% paraformaldehidă. În ambele situații, creierul a fost recoltat de la șobolani albi Wistar adulți și senescenti. După fixare, țesutul cerebral a fost procesat în vederea includerii la parafină și secționării seriate la microtom. Pentru evaluarea degenerării neuronale s-a optimizat metoda Luxol Fast Blue (colorează mielina în albastru) / Cresyl violet (colorează corpii neuronali în mov). Bariera hemato-encefalică (BBB) a fost evaluată prin teste de

imunofluorescență utilizând anticorpi specifici pentru evidențierea fiecărei componente a BBB: anti-PDGFRbeta-pericit, CD31/PECAM1-celula endotelială, GFAP-astrocit. Slide-uri au fost prelucrate pentru evidențierea mielinei și a neuronilor (copusculi Nissl). Pentru validarea metodei Luxol/ Cresyl, alte slide-uri au fost folosite pentru marcarea imunofluorescentă și evaluarea expresiei marker-ului neuronal NeuN. După vizualizare la microscop, s-a cuantificat numărul neuronilor colorați cu Cresyl violet și, respectiv NeuN. Alte slide-uri au fost marcate fluorescent pentru evidențierea componentelor BBB. Analiza Cresyl violet s-a realizat prin evaluarea morfologiei și a densității neuronale la nivelul hipocampului, în ariile hipocampice CA2 și CA3. Atât în CA2, cât și în CA3 s-au observat modificări morfologice ale neuronilor la șobolanii senescenti comparativ cu șobolanii adulți. De asemenea, în ambele regiuni hipocampice, densitatea neuronală a fost mai redusă la senescenti față de adulți.



Colorația Luxol Fast Blue / Cresyl violet. Magnificare (10x, 20x)



Marcare imunofluorescentă a neuronilor pentru NeuN - validarea metodei Cresyl violet (10x, 20x)

### Concluzii

- Analiza comparativă a slide-urilor obținute din piesele biologice selectate a evidențiat o mai bună conservare a morfologiei cerebrale (secțiunile nu s-au deteriorat/ desprins de pe lame pe parcursul procedurilor de colorare/ marcarea imunofluorescentă) pentru piesele biologice

fixate în 4% paraformaldehidă. În acest sens, am considerat optimă pentru țesutul cerebral fixarea cu 4% paraformaldehidă

- ❑ Deși colorația Cresyl violet (Nissl) este cea mai comună metodă de cuantificare a densității neuronale, specificitatea metodei Nissl este redusă deoarece Cresyl violet colorează și alte tipuri celulare precum celulele gliale. Prin urmare, detecția NeuN (marker neuronal specific) prin teste de imunofluorescență/ imunohistochimie validează metoda Nissl, fiind necesară pentru analiza degenerării neuronale în diverse neuropatologii.
- ❑ Colorația Luxol Fast Blue este o metodă eficientă pentru evaluarea mielinei. \*Rezultatele obținute pentru șobolanii senescenti reprezintă controale pozitive pentru studiile de neurodegenerare ulterioare.

**Rezultatele obținute în faza 1/2023 au asigurat îndeplinirea integrală a a obiectivului asumat în ceea ce privește rezultatele estimate, verificabile ale activităților.**

**Țintele stabilite și indicatorii asociați pentru monitorizare și evaluare:**

*Țința stabilită:* Identificarea și optimizarea unor metode de testare, diagnostic și/sau strategii terapeutice aplicabile în cazul expunerii experimentale la simulatori/agenți chimici, biologici și radiologici

*Indicatorii asociați pentru monitorizare și evaluare:*

- 1 raport științific documentar: *Investigarea consecințele toxicologice și metabolice ale expunerii la pesticide organofosforice prin tehnici de laborator*
- 1 Raport de evaluare: *Analiza și cuantificarea efectelor toxice ale unor simulatori ai agenților chimici/ neurotoxici*
- 4 Protocol de lucru: \**Metode de investigare microbiologică a simulatorilor de agenți biologici bacterieni*; \**Obținerea de preparate pentru analiza cromozomilor dicentrici*; \**Obținerea de preparate pentru testul micronucleilor cu blocarea citochinezei*; \* *Protocol de lucru pentru analiza morfologiei cerebrale, degenerării neuronale - Metoda Luxol fast blue/ Cresyl violet*
- 1 Instrucțiuni de utilizare: *Instrucțiune de utilizare - Modul Metafer5 – MicroNuc, pentru analiza micronucleilor în fluorescență*
- 1 Metodă de testare: *Metodă de testare pentru evaluarea viabilității pe culturi celulare*

### ***Rezultate publicate/diseminate***

#### *1 Articol științific:*

Andreea-Camelia Hîrjău, Ilinca-Mihaela Marandiuc, Ștefania Mădălina Negrea, Gabriel-Lucian Radu, Paraclinical studies to monitor the activity of cholinesterases in the clinical evolution in the case of dimpilate poisoning - acceptat la publicare în revista Farmacia, vol. 72. Nr. 6/2023, ID 832

#### *Comunicări științifice la conferințe naționale:*

- 1 Comunicare orală la Conferința la Conferința științifică anuală a institutului „Cantacuzino” - Cercetare aplicată și protecție medicală, 21-23 noiembrie 2023, Cercul Militar Național

- Lucia Elena IONESCU, Cristina Anca SECARĂ, Sonia SPANDOLE-DINU, Ana-Maria CATRINA, Diana Mihaela POPESCU, Andreea Camelia HÎRJĂU, Marius NECȘULESCU, Claudia Valentina POPA, Speranța RADU, Alina ANDONE, Octavian CĂLBOREAN, Cerasela HAIDOIU, Răzvan NEAGU, Vladimir SUHĂIANU, Dida ARDELEANU, Ilinca Mihaela MARANDIUC, Ștefania Mădălina NEGREA, Multidisciplinary Research of Testing, Diagnostic and/or therapeutic strategies for experimental exposure to CBRN simulators/agents, ROMANIAN ARCHIVES OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, VOLUME 82 – Special Issue, ISSN 2601-9418 (Online), ISSN-L 1222-3891

#### *Comunicări științifice la conferințe internaționale:*

- 1 Comunicare orală la „25th Balkan Military Medical Committee Congress, 28-31 May 2023, Albena, Bulgaria
- Andreea-Camelia HÎRJĂU, Ilinca-Mihaela MARANDIUC, Ștefania Mădălina NEGREA, Dida ARDELEANU, *Paraclinical studies and medical management of dimpilate poisoning*, LXXV Supplement 1/2023, Military Medicine