

Rezultatele Proiectului Nucleu
Creșterea capacității de cercetare științifică și de intervenție medico-militară
în managementul consecințelor unor incidente/accidente cu agenți CBRN
Cod PN 22 44 02 01

Faza 2/2024: Cercetare experimentală avansată și metode de testare preclinică pentru dezvoltarea unor contramăsuri medicale de intervenție în caz de incident /accident CBRN.

Descriere activitate și rezultate

În această fază s-a urmărit realizarea de cercetări experimentale avansate și metode de testare preclinică pentru dezvoltarea unor contramăsuri medicale de intervenție în caz de incident/accident CBRN.

Activitățile realizate au fost următoarele:

Înaintarea documentelor pentru obținerea autorizațiilor de lucru cu animale de laborator de la Consiliul de etică al INCDMM "Cantacuzino" și ANSVSA.

În vederea realizării testărilor preclinice ale antidotului preventiv a fost întocmită documentația specifică pentru obținerea avizului Comisiei de Etică a INCDMM „Cantacuzino” în vederea depunerii la ANSVSA (2025) a dosarului de autorizare pentru studiile *in vivo* care se vor desfășura în Faza3/2025.

Proiectarea și realizarea modelului experimental al antidotului complex, studii de stabilitate și identificarea compușilor activi prin metode HPLC.

În cadrul acestei activități au fost realizate cercetări care au analizat *posibilitatea utilizării rivastigminei*, un inhibitor reversibil de colinesterază cu proprietăți neuroprotectoare, *ca alternativă terapeutică superioară piridostigminei*, în vederea susținerii contramăsurilor medicale în cazul expunerii la agenți chimici neurotoxici. Pentru aceasta a fost analizată *rivastigmina folosind metoda HPLC-PAD cu sistemul de cromatografie de lichide Arc HPLC (Waters, Milford, MA, USA)* și a fost proiectat și realizat modelul experimental al *antidotului preventiv complex* pentru administrare orală.

Identificarea toxinelor de interes medico-militar din subcolecția laboratorului și caracterizarea prin experimente in vivo și metode rapide imunocromatografice.

Activitatea a urmărit realizarea de cercetări pentru definirea unui portofoliu de simulatori de agenți biologici toxine, potențial utilizabile în testarea/omologarea unor echipamente pentru detecție și avertizare biologică. Simulatorii/agenții biologici investigați au fost în conformitate cu recomandările STANAG 4632 și AEP-7. Studiul a urmărit investigarea posibilității utilizării unor agenți biologici (AB) nepatogeni ca simulatori de AB în vederea validării funcționalității unor sisteme dezvoltate pentru monitorizarea și avertizarea prezenței amenințărilor biologice din aer. În testare au fost introduse concentrații variabile de AB bacterieni și toxine. Fiecare variantă a fost testată pe un sistem de detecție și avertizare biologică. Validarea s-a realizat prin cuantificarea timpului de detecție ulterior aerosolizării AB. Analiza datelor a arătat că timpul de răspuns al sistemului s-a încadrat în parametrii care îi califică drept candidați pentru realizarea portofoliului de simulatori de AB dezvoltat în cadrul studiului.

Optimizarea unor metode de dozimetrie biologică pentru expunerea la agenți radionucleari, independente de cultivarea celulelor din sânge.

Metodele de dozimetrie biologică se bazează pe măsurarea modificărilor biologice induse în organism de expunerea la radiații ionizante. Radiațiile ionizante au capacitatea de a provoca rupturi în molecula de ADN. Activitățile realizate au presupus iradierea *ex vivo* a unor probe de sânge venos periferic cu doze de radiații X cuprinse între 0 și 3 Gy, prelucrarea limfocitelor izolate pentru fixarea pe lamă și marcarea imunofluorescentă a focilor γ -H2AX pentru analizarea la microscopul cu fluorescență folosind un software automat. Rezultatele au arătat o corelație între doza de raze X încasată și numărul mediu de foci γ -H2AX, sugerând un efect cumulativ al radiației asupra ADN. Totuși, deviațiile standard relativ mari au sugerat o variabilitate în răspunsul celular ceea ce recomandă realizarea de teste suplimentare. Astfel, prin optimizare s-au obținut preparate potrivite pentru cuantificarea focilor γ -H2AX. Rezultatele vor contribui la întărirea capacității laboratorului de a evalua expunerea la radiații în caz de accidente radiologice.

Obținerea unei curbe proprii doză-efect în vederea estimărilor de doză pentru expuneri la radiații X.

Studiul a avut ca scop evaluarea modului în care diferitele metode de extracție a ARN și alegerea genelor de referință influențează fiabilitatea și acuratețea analizei expresiei genice (analiza genelor DDB2 și FDXR) în probe de sânge uman iradiat. Aceste gene își modifică expresia ca răspuns la radiațiile ionizante, într-un mod dependent de doză. Rezultatele au evidențiat faptul că prin excluderea extracției din sânge integral și evitarea normalizării cu ARNr 18S, s-au obținut rezultate consecvente, ceea ce face ca aceste protocoale optimizate să fie mai adecvate pentru dozimetria biologică în evaluarea expresiei genice după expunerea la radiații.

Dezvoltarea de abordări terapeutice noi prin investigarea markerilor mitocondriali/disfuncției mitocondriale (plasmă vs creier), raportat la doză, durata expunerii și integrarea rezultatelor.

În cadrul activității a fost inițiat un studiu pilot pe șobolani Wistar femele pentru a evalua modificările mitocondriale ca răspuns la hipoxie vs asfixie. Scopul a fost evidențierea mitocondriilor active prin marcarea cu MitoTracker Red CMXRos, cuantificarea prin citire pe Multimode Plate Reader, PerkinElmer și vizualizarea cu CELENA Imaging System. Metoda dezvoltată poate fi folosită pentru investigarea funcției mitocondriale aceasta fiind esențială pentru răspunsul la hipoxie/asfixie, fiind un indicator al influențelor factorilor externi asupra organismului.

Demonstrarea potențialei eficacități terapeutice sau profilactice a produselor terapeutice dezvoltate prin proiect prin metode de testare in vitro, pe culturi celulare.

În cadrul studiului pilot au fost investigate mitocondriile, urmând ca eficacitatea terapeutică a unor produse să fie investigată ulterior.

Optimizarea parametrilor de investigare prin analiza cromatografică a efectelor expunerii la agenți chimici inhibitori de colinesteraze.

Studiul a monitorizat evoluția activității enzimatică în cazul unei intoxicații voluntare cu dimpilat prin cuantificarea nivelurilor serice de acetilcolinesterază (AChE) și butirilcolinesterază (BChE) prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS/MS). A fost identificat din urină pesticidul organofosforic, dimpilat, au fost determinate din probele de sânge total AChE și BChE și a fost monitorizată BChE din plasmă. A fost elaborat un diagnostic de precizie prin identificarea atât a compusului de bază, dimpilatului (diazinonul), cât și a metabolitului acestuia defosforilat din proba de urină prin tehnica GC-MS/MS. Au fost utilizate două tehnici colorimetrice pentru monitorizarea activității enzimatică a AChE și BChE cu scopul optimizării

protocolului de antidotism cu atropină și plasmă pe întreaga perioadă de spitalizare. Nivelele celor două enzime au avut o evoluție similară cu excepția momentelor administrării plasmei când AChE a crescut față de BChE. Enzimele au atins aproximativ simultan pragul de stabilitate. A fost observată o concordanță între rezultatele obținute pentru BChE măsurată din sângele total și cea din plasmă, evidențiind potențialul ambelor metode în managementul medical.

Descriere activitate și rezultate Faza 2b

S-a urmărit extinderea cercetărilor pentru dezvoltarea de contramăsuri medicale de intervenție în caz de incident /accident CBRN.

Activitățile realizate au fost următoarele:

Screening in vivo pentru evaluarea toxicității acute a simulanților de toxine bacteriene din subcolecția laboratorului.

În vederea realizării screening-ului *in vivo* a fost realizată documentația necesară și s-au stabilit metodele de testare. Ulterior a fost redactată o instrucțiune de lucru, care a fost înregistrată ca rezultat al cercetării pentru această fază, urmând ca testarea *in vivo* să se realizeze ulterior.

Evaluarea gradului de neuroinflamație și a markerilor inflamatori raportat la doză și durata expunerii.

În vederea realizării evaluării gradului de neuroinflamație și a markerilor inflamatori raportat la doză și durata expunerii a fost realizată documentația necesară și s-au stabilit metodele de testare. Ulterior a fost redactată o instrucțiune de lucru, care a fost înregistrată ca rezultat al cercetării pentru această fază. Testările *in vivo* se vor realiza în faza 3 a proiectului (2025). Activitatea se va desfășura în cadrul unui studiu pilot. Ulterior, în funcție de rezultatele obținute se va elabora o cerere de autorizare pentru o cercetare extinsă.

Stadiul de atingere a obiectivelor

Obiectivul fazei a fost realizarea de cercetări experimentale avansate și metode de testare preclinică pentru dezvoltarea unor contramăsuri medicale de intervenție în caz de incident/accident CBRN. Pentru atingerea acestuia în faza 2/2024 au fost realizate activități care au condus la îndeplinirea aproape în integralitate a obiectivului asumat.

Rezultatele obținute în faza 2a/2024 au asigurat îndeplinirea în procent de 95% a obiectivului asumat în ceea ce privește rezultatele estimate, verificabile ale activităților. Procentul de 5% nerealizat a făcut obiectul unor cercetări pe culturi celulare și a unor teste de investigare a eficacității terapeutice a unor produse.

Rezultatele obținute în faza 2b/2024 au permis îndeplinirea parțială a obiectivului asumat în ceea ce privește metodele de testare din cadrul activităților. Procentul nerealizat nu impactează nefavorabil realizarea obiectivelor proiectului și este reprezentat de testele *in vivo* care se vor realiza în 2025.

Rezultate publicate/diseminate

- 1 articol științific într-o revistă indexată ISI;
- 5 comunicări științifice la conferințe de specialitate (2 naționale și 3 internaționale).

Responsabil Proiect
CSIII Dr. Lucia IONESCU