

RECEȚIONAT

Agencia Națională pentru Cercetare
și Dezvoltare _____

_____ 2022

AVIZAT

Secția AȘM _____

_____ 2022


RAPORT ȘTIINȚIFIC ANUAL 2022
privind executarea proiectului multilateral
21.80013.8007.2M. Prophylactic and therapeutic use of regulatory T cell derived
exosomes in murine models of multiple sclerosis and psoriasis

Perioada de implementare a proiectului – mai 2021-mai 2023, 24 de luni

Prioritatea Strategică „Maladiile netransmisibile”

Rectorul USMF „Nicolae Testemițanu”

CEBAN Emil



Președintele Consiliului Științific

GROPPA Stanislav



Conducătorul proiectului

COREȚCHI Ianoș





Chișinău 2022

1. Scopul general al proiectului conform formularului de aplicare

Expansiunea antigen-specifică a celulelor Treg policlonale, izolarea și caracterizarea exosomilor prin microscopie electronică, analiză de urmărire a nanoparticulelor.

2. Obiectivele proiectului conform formularului de aplicare

1. Stimularea proliferării celulelor Treg specifice MOG35-55 la șoareci Foxp3 YFP
2. Expansiunea celulelor Treg specifice
3. Purificarea exosomilor
4. Identificarea exosomilor
5. Caracterizarea exosomilor

3. Acțiunile planificate pentru realizarea scopului și obiectivelor proiectului

1. Șoarecilor raportori Foxp3 YFP li se va administra cu hrana MOG35-55 timp de 10 zile pentru a stimula proliferarea (expansiunea) Treg specifice MOG35-55. Ulterior celulele Treg din ganglionii limfatici vor fi sortate.
2. Expansiunea celulelor Treg specifice antigenului va fi realizată prin adăugarea de celule MOG35-55 (100ug / ml) și dendritice (1×10^6) și celule Foxp3YFP + Treg (1×10^6) cu CD3 (1ug / ml), IL-2 (unitate 2000) și cultivarea pentru 15-30 zile. Apoi celulele CD4 + Treg vor fi resortate fie cu utilizarea godeurilor Miltenyi CD4, fie prin sortatorul FACSAriaIII.
3. Celulele Treg sortate vor fi reactivate pe godeuri Miltenyi Treg CD3 / CD28 / IL-2 timp de 24-48 de ore în mediu complet fără ser. Exosomii vor fi purificați și utilizați pentru experimente.
4. Exosomii vor fi identificați cu utilizarea markerilor marker CD63 +, ulterior confirmat prin citometrie de flux; Imagini SEM și potențial Zeta exosom. Concentrația de proteine exosomice va fi cuantificată. După fracționarea electroforetică a proteinelor și transferul acestora pe o membrană de nitroceluloză, acestea din urmă vor fi colorate cu anticorpi împotriva CD9, CD63 și CD81. CYCS, o proteină mitocondrială cunoscută, va fi utilizată ca control negativ. Membrana va fi apoi incubată cu anticorpi secundari corespunzători conjugați cu peroxidază de hrean. Detectarea va fi efectuată de un kit ECL Plus (GE Healthcare, Marea Britanie). Semnalul va fi înregistrat de un sistem de documentare Gel Doc System XRS (Bio-Rad, Statele Unite).
5. Morfologia exosomilor va fi vizualizată prin microscopie electronică cu scanare (SEM, GEMINI-500). Dimensiunile exosomilor izolați vor fi evaluate cu utilizarea Zetasizer (Malvern). Pentru aceasta, exosomii vor fi dispersați într-o soluție hidrică. Ulterior suspensia obținută va fi diluată la 1:1000 (v / v) în dH₂O și după omogenizare, 1 mL din această suspensie va fi adăugat în cuva de cuarț pentru măsurare. Indicele de refracție (RI) este 1,38.

4. Acțiunile realizate pentru atingerea scopului și obiectivelor proiectului

1. Șoarecilor raportori Foxp3 YFP li s-au administrat hrana MOG35-55 timp de 10 zile pentru a stimula proliferarea (expansiunea) Treg specifice MOG35-55. Ulterior celulele Treg din ganglionii limfatici și din splină au fost sortate.

2. Expansiunea celulelor Treg specifice antigenului a fost realizată prin adăugarea de celule MOG35-55 (100ug / ml) și dendritice (1x10⁶) și celule Foxp3YFP + Treg (1x10⁶) cu CD3 (1ug / ml), IL-2 (unitate 2000) și cultivarea pentru 15-30 zile. Apoi celulele CD4 + Treg au fost resortate fie cu utilizarea godeurilor Miltenyi CD4, fie prin sortatorul FACSAriaIII.

3. Celulele Treg sortate au fost reactivate pe godeuri Miltenyi Treg CD3 / CD28 / IL-2 timp de 24-48 de ore în mediu complet fără ser. Exosomii au fost purificați și utilizați pentru experimente.

4. Exosomii au fost identificați cu utilizarea markerilor marker CD63 +, ulterior confirmat prin citometrie de flux; Imagini SEM și potențial Zeta exosom. Concentrația de proteine exosomice a fost cuantificată. După fracționarea electroforetică a proteinelor și transferul acestora pe o membrană de nitroceluloză, acestea din urmă au fost colorate cu anticorpi împotriva CD9, CD63 și CD81. CYCS. Membrana ulterior a fost incubată cu anticorpi secundari corespunzători conjugați cu peroxidază de hrean. Detectarea a fost efectuată cu kitul ECL Plus (GE Healthcare, Marea Britanie). Semnalul a fost înregistrat cu sistemul de documentare Gel Doc System XRS (Bio-Rad, Statele Unite).

5. Morfologia exosomilor a fost vizualizată prin microscopie electronică cu scanare (SEM, GEMINI-500). Dimensiunile exosomilor izolați au fost evaluate cu utilizarea Zetasizer (Malvern). Pentru aceasta, exosomii au fost dispersați într-o soluție hidrică. Ulterior suspensia obținută a fost diluată la 1:1000 (v / v) în dH₂O și după omogenizare, 1 mL din această suspensie s-a adăugat în cuva de cuarț pentru măsurare. Indicele de refracție (RI) este 1,38.

5. Rezultatele obținute

In vivo, prin administrarea timp de 10 zile cu hrana a MOG35-55 la șoareci Foxp3 YFP a fost stimulată proliferarea celulelor Treg specific. Ulterior din ganglionii limfatici și din splină au fost extrase celulele Treg (figura 1) din care ulterior au fost izolați și purificați exosomii.

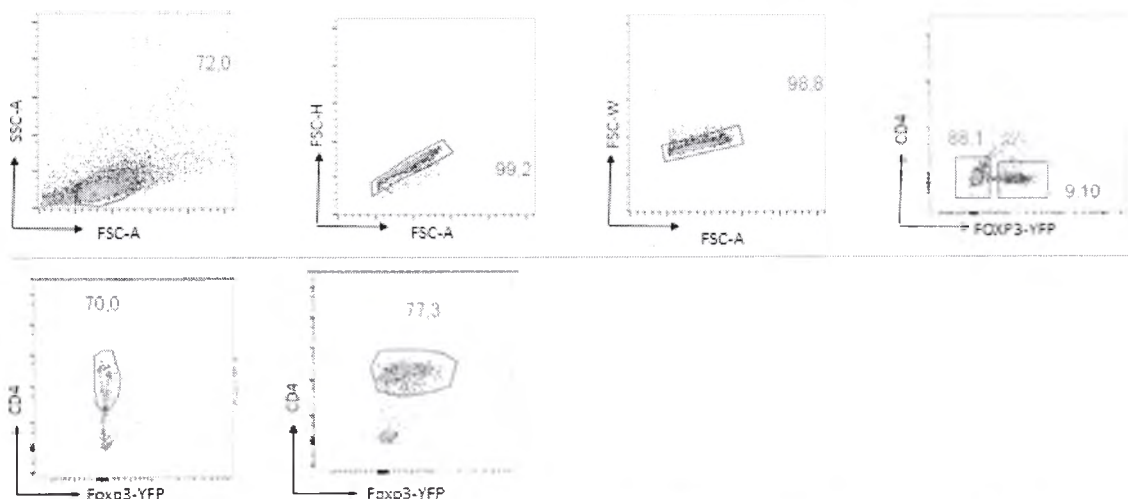


Figura 1. Diagrame de flux care arată strategia noastră utilizată în timpul sortării și cantitatea

de puritate după sortare. A) Colorarea suprafeței limfocitelor ligate și procesate din splina unui șoarece reporter Foxp3yfp înainte și după ce este prezentată sortarea. Este un plot reprezentativ. B) Sunt prezentate procentele de celule CD4+ și celule Treg după sortarea din ganglionii limfatici de la un singur șoarece reporter Foxp3YFP.

In vitro, proliferarea antigen-specifică a celulelor Treg a fost indusă prin adăugarea la celule a MOG35-55 (100ug/ml), iar a celor dendritice (1×10^6) și Foxp3YFP+ Treg (1×10^6) – cu CD3 (1ug/ml), IL-2 (2000). Ulterior cultivare pentru 15-30 zile.

Din celulele Treg sortate, după reactivare cu CD3/CD28/IL-2 și cultivare timp de 24-48 de ore în mediu complet fără ser, au fost obținuți și purificați exosomii (figura 2).

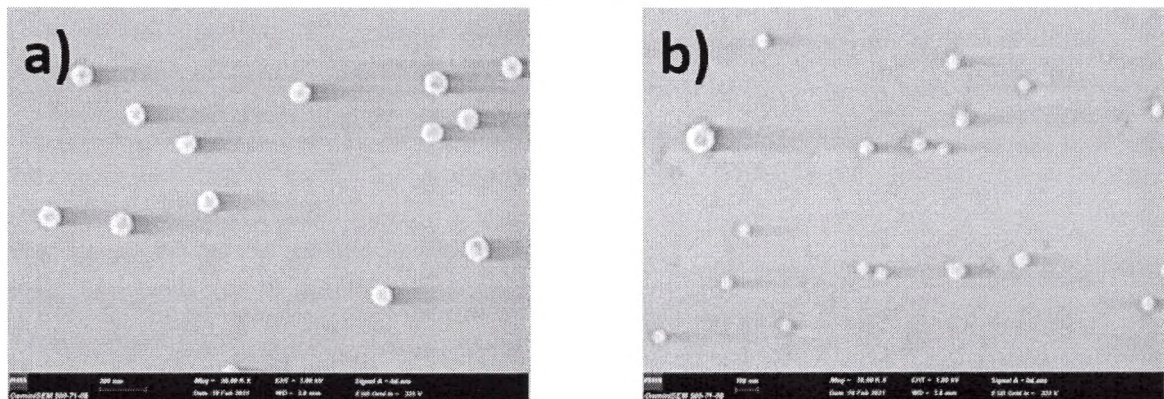


Figura 2. a): Dimensiunile exozomilor Treg obținuți din celulele splinei de șoarece analizate prin SEM b): Dimensiunile exozomilor Treg obținuți din celulele ganglionilor limfatici de șoarece analizate prin SEM (Scale bar 200 nm)

Este în proces caracterizarea exosomilor.

Experimental a fost indus psoriazisul (figura 3). Inducerea modelului de psoriazis a fost efectuată cu imiquimod (Aldara). Pentru a evalua efectul profilactic al grupelor de exozomi administrați intradermic și topic, exosomii au fost administrați împreună cu aldara timp de 7 zile. Țesuturile au fost colectate după sacrificare în a 7-a zi. În prezent se desfășoară evaluare țesuturilor colectate.

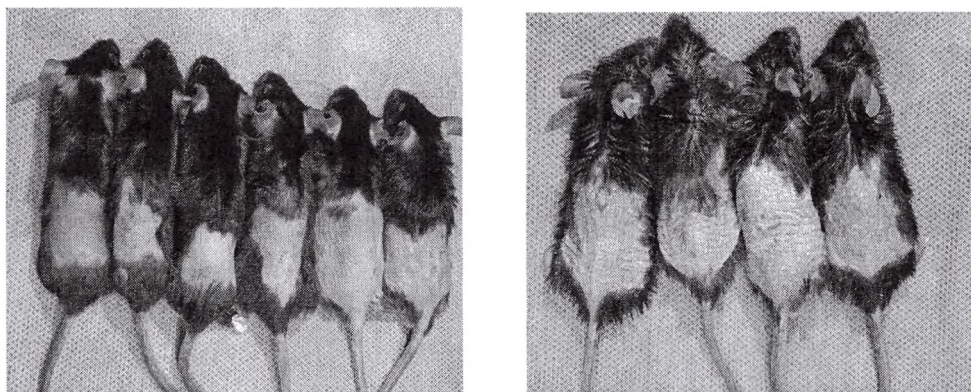


Figura 3. În stânga – aspectul pielii șoarecilor naivi; în dreapta – afectarea psoriatică a pielii indusă de imiquimod.

De către membrii echipelor de proiect a fost pregătit și înaintat spre publicare un articol.

6. Descrierea colaborării între organizația din RM și organizațiile partenere după caz (specificul și continuitatea colaborării)

7. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de publicații

A fost pregătit și înaintat spre publicare un articol

8. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de prezentări (comunicări, postere, teze/rezumat/abstracte) la foruri științifice

9. Protecția rezultatelor obținute în formă de obiecte de proprietate intelectuală

10. Materializarea rezultatelor obținute

11. Colaborări cu organizații de cercetare internaționale, proiecte de cercetare/activități comune cu parteneri externi

1. Erciyes University, Betül Ziya Erden Genome and Stem Cell Research Center (GENKÖK)
2. Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Sechenov Biomedical Science & Technology Park

12. Dificultățile în realizarea proiectului

Procedura de achiziție a reactivelor – îndelungată, intermediari. Ca consecință – întârzierea îndeplinirii obiectivelor, prețuri și cheltuieli exagerate.
Situția epidemiologică și geopolitică actuală instabilă, mai ales în contextul originii partenerilor implicați în implementarea proiectului – întârzierea implementării proiectului.

13. Concluzii

Activitățile de cercetare în cadrul proiectului sunt în desfășurare, obiectivele trasate preconizate a fi îndeplinite conform planului aprobat (mai 2023).

Au fost obținuți exosomii cu posibilă eficacitate în tratamentul și/sau profilaxia psoriazisului și a sclerozei multiple, ce va fi cercetat în etapele ulterioare ale proiectului.

Au fost caracterizați exosomii.

Experimental a fost indus psoriazisul și este în proces cercetarea eficacității profilactice și terapeutice a exosomilor în această patologie

De către membrii echipelor de proiect a fost pregătit și înaintat spre publicare un articol.

Research activities within the project are ongoing, the outlined objectives expected to be met according to the approved plan (May 2023).

Exosomes with possible efficacy in the treatment and/or prophylaxis of psoriasis and multiple sclerosis were obtained, which will be investigated in the later stages of the project.

Exosomes were characterized.

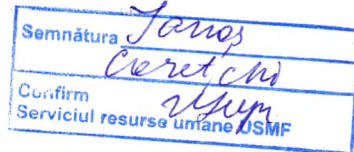
Psoriasis has been experimentally induced and the prophylactic and therapeutic efficacy of

exosomes in this pathology is being investigated
An article was prepared and submitted for publication by members of the project teams.

Conducătorul de proiect  / CORETCHI Ianoș

Data: 14.11.2022

LȘ



Executarea devizului de cheltuieli, conform anexei nr. 2.3 din contractul de finanțare

(la data raportării)

Cifrul proiectului:21.80013.8007.2M

Cheltuieli, mii lei				
Denumirea	Cod		Anul de gestiune	
	Eco (k6)	Aprobat	Modificat +/-	Precizat
Remunerarea muncii angajaților conform statelor	211180			
Contribuții de asigurări de stat obligatorii	212100			
Deplasări în interes de serviciu peste hotare	222720	35,1		35,1
Servicii medicale	222810			
Servicii de editare	222910			
Servicii de protocol	222920			
Servicii de cercetări științifice contractate	222930			
Procurarea materialelor de uz gospodăresc și rechizite de birou	316110			
Procurarea activelor nemateriale	317110			
Procurarea combustibilului, carburanților și lubrifianților	331110			
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri	335110			
Procurarea medicamentelor și materialelor sanitare	334110			
Procurarea materialelor de uz gospodăresc și rechizitelor de birou	336110			
Total		35,1	0,0	35,1

Notă: În tabel se prezintă doar categoriile de cheltuieli din contract ce sunt în execuție și modificările aprobate (după caz)

Conducătorul organizației *E. Ceban* / Ceban Emil

Economist șef *S. Lupasco* / Lupasco Svetlana

Conducătorul de proiect *I. Corețchi* / Corețchi Ianoș

Data:

LȘ



Componența echipei proiectului

Cifrul proiectului 21.80013.8007.2M

Echipea proiectului conform contractului de finanțare pentru anul 2022 (la semnarea contractului)						
Nr	Nume, prenume (conform contractului de finanțare)	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării	Data eliberării
1	Corețchi Ianoș	1984	Dr.șt.med.	Fără remunerare	-	-
2	Todiraș Mihail	1966	Dr.hab.șt.med	Fără remunerare	-	-
3	Vorojbit Valentina	1964	Dr.șt.med.	Fără remunerare	-	-
4	Galea-Abdușa Daniela	1988	Dr.șt.biol.	Fără remunerare	-	-
5	Ulinici Mariana	1987	-	Fără remunerare	-	-
6	Toma Alina	1992	-	Fără remunerare	-	-
7	Malcova Tatiana	1992	-	Fără remunerare	-	-

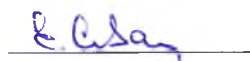
Pondereea tinerilor (%) din numărul total al executorilor conform contractului de finanțare	57%
---	-----

Modificări în componența echipei pe parcursul anului 2022					
Nr	Nume, prenume	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării
1					

Pondereea tinerilor (%) din numărul total al executorilor la data raportării	57%
--	-----

Rector

CEBAN Emil



Economist șef

LUPAȘCO Svetlana



Conducătorul de proiect

COREȚCHI Ianoș



Data: 14.02.2022

LS





EXTRAS DIN DECIZIE

16.11.2022

nr. 10/7

Cu privire la aprobarea rapoartelor anuale de implementare a proiectelor multilaterale, pentru anul 2022, din cadrul apelului ERA.Net RUS Plus 2019 pentru perioada (2021-2023)

În conformitate cu prevederile Ordinului Agenției Naționale pentru Cercetare și Dezvoltare nr. 99 din 5 noiembrie 2020 *cu privire la aprobarea Instrucțiunii privind raportarea anuală a implementării proiectelor din domeniile cercetării și inovării*, precum și în rezultatul audierii publice a rapoartelor anuale de implementare a proiectelor, Consiliul științific

A DECIS:

1. A aproba raportul anual pentru anul 2022, de implementare a proiectului multilateral „*Prophylactic and Therapeutic Use of Regulatory T Cell Derived Exosomes in Murine Models of Multiple Sclerosis and Psoriasis*”, cifrul 21.80013.8007.2M, din cadrul apelului ERA.Net RUS Plus 2019 pentru perioada (2021-2023), responsabil de proiect dl Ianoș Corețchi, dr. șt. med., conferențiar universitar.
2. A prezenta raportul anual pentru anul 2022, de implementare a proiectului multilateral „*Prophylactic and Therapeutic Use of Regulatory T Cell Derived Exosomes in Murine Models of Multiple Sclerosis and Psoriasis*”, cifrul 21.80013.8007.2M, din cadrul apelului ERA.Net RUS Plus 2019 pentru perioada (2021-2023), responsabil de proiect dl Ianoș Corețchi, dr. șt. med., conferențiar universitar, Agenției Naționale pentru Cercetare și Dezvoltare.

Secretar al Consiliului științific,
dr. șt. med., conf. univ.

Diana Calaraș

