

INSTITUTUL DE



VIRUSOLOGIE  
BUCUREȘTI

ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE  
“ȘTEFAN S. NICOLAU”

Șos. Mihai Bravu, 285, 030304, sect. 3, București, ROMÂNIA  
Telefon: +40 (21) 324.25.90, Fax: +40 (21) 324.25.90



## Raport activitate pentru anul 2021 - Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau”

### RAPORT SINTETIC

Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau”, fondat în 1949 de Prof. Ștefan S. Nicolau în jurul nucleului uneia din primele discipline de inframicrobiologie din lume, înființată la Facultatea de Medicină, București, disciplina din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" de care este indisolubil legat și în prezent, a continuat și în anul 2021 promovarea cercetării de excelență în domenii prioritare de cercetare fundamentală și aplicativă în cadrul departamentelor: Viroze Emergente, Virusologie Moleculară, Patologie Celulară și Moleculară și Strategie, educație, documentare, IT.

IVN reprezintă acea componentă de cercetare fundamentală și aplicativă a Academiei Române care desfășoară activități în: cercetarea virusologică, medicină moleculară și celulară, învățământ universitar și post-universitar de virusologie, imunologie și biotehnologii.

În ceea ce privește vizibilitatea internațională, în anul 2021 cei 32 de cercetători (28 echivalenți normă întreaga) au ridicat indexul **H la valoarea de 35** (de la 28 în 2018) iar lucrările publicate până în prezent însumează un factor de impact (FI) de 2143,431, numai cele publicate în acest an având un **FI de 93, 378**. Multe din lucrările institutului au peste 100 de citări în Web of Science (Clarivate Analytics), o lucrare publicată în jurnalul LANCET (IF 79,323) atingând 528 citări. În anul 2021 **numarul de citari a fost de 712** iar doua dintre lucrările publicate au atins peste 40 de citari în acest an.

Printre rezultatele importante este de menționat contribuția Prof. Simona Ruta cu capitoul: **Perspectivile vaccinării împotriva COVID-19 în monografia: Pandemia COVID-19 în**

**România vol. II, Aspecte patogenice, clinice și farmacoterapeutice"**, Editura Academiei Române 2021, sub coordonarea Acad V. Voicu, I Popescu și lucrările:

- D'haese S, Lacroix C, Garcia F, Plana M, **Ruta S**, Vanham G, Verrier B, Aerts JL. Off the beaten path: Novel mRNA-nanoformulations for therapeutic vaccination against HIV. *J Control Release*. 2021; 330:1016-1033. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.11.009. **FI 8.66**;

- Asprițoiu VM, Stoica I, **Bleotu C**, **Diaconu CC**, Epigenetic Regulation of Angiogenesis in Development and Tumors Progression: Potential Implications for Cancer Treatment, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021 ; <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689962> **IF=6.684**;

- Visan AI, Ristoscu C, Popescu-Pelin G, Sopronyi M, Matei CE, Socol G, Chifiriuc MC, **Bleotu C**, Grossin D, Brouillet F, Grill SL, Bertrand G, Zgura I, Cristescu R, Mihailescu IN. Composite Drug Delivery System Based on Amorphous Calcium Phosphate-Chitosan: An Efficient Antimicrobial Platform for Extended Release of Tetracycline. *PHARMACEUTICS*. 2021 Oct 11;13(10):1659. doi: 10.3390/pharmaceutics13101659. PMID: 34683952, **IF=6.321**

- Popescu CP, Cotar AI, Dinu S, Mihaela Zaharia, Gratiela Tardei, Emanoil Ceausu, Daniela Badescu, **Simona Ruta**, Cornelia S Ceianu, Simin A Florescu. Emergence of Toscana Virus, Romania, 2017-2018. *Emerg Infect Dis*. 2021; 27(5):1482-1485. doi:10.3201/eid2705.204598 **FI=6,25**;

- **Bostan M**, **Mihaila M**, Petrica-Matei GG, Radu N, Hainarosie R, Stefanescu CD, **Roman V**, **Diaconu CC**: Resveratrol Modulation of Apoptosis and Cell Cycle Response to Cisplatin in Head and Neck Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* 22(12): 6322. 2021.doi: 10.3390/ijms22126322 **IF=5.924**;

- Păvăloiu RD, Sha'at F, Neagu G, Deaconu M, Bubueanu C, **Albulescu A**, Sha'at M, Hlevca C. Encapsulation of Polyphenols from Lycium barbarum Leaves into Liposomes as a Strategy to Improve Their Delivery. *NANOMATERIALS* 2021;11(8):1938. <https://doi.org/10.3390/nano11081938> . **IF = 5.346**

- **Chivu-Economescu M**, **Necula L**, **Matei L**, **Dragu D**, **Bleotu C**, **Diaconu CC**. Clinical Applications of Liquid Biopsy in Gastric Cancer. *Front Med* (Lausanne). 2021 Sep 28;8:749250. doi: 10.3389/fmed.2021.749250. eCollection 2021. PMID: 34651002, **IF=5,093**;

- **Fudulu A**, Olar R, Maxim C, Scaeteanu, GV, **Bleotu C**, **Matei L**, Chifiriuc C, Badea M, New Cobalt (II) Complexes with Imidazole Derivatives: Antimicrobial Efficiency against Planktonic and Adherent Microbes and In Vitro Cytotoxicity Features, *MOLECULES*, 2021, 26, DOI: 10.3390/molecules26010055 **IF=4,412**.

- **Iancu IV**, **Botezatu A**, **Pleșa A**, **Huică I**, **Fudulu A**, **Albulescu A**, **Bostan M**, **Mihăilă M**, **Grancea C**, Manda DA, Dobrescu R, Vlădoiu SV, **Anton G**, Badiu CV. Alterations of regulatory factors and DNA methylation pattern in thyroid cancer. *CANCER BIOMARKERS*, 2020, 28: 255–268. DOI: 10.3233/CBM-190871. **IF=4.388**

Fiind o perioada marcata de Pandemia **COVID-19**, cercetătorii Institutului de Virusologie "Stefan S. Nicolau", **s-au oferit să servească sistemul național de sănătate publică**, iar în urma Ordinului Ministrului Sănătății nr. 639/21.04.2020, Institutul de Virusologie fost integrat în **lista**

**unităților de specialitate care implementează Programul Național de supraveghere și control al bolilor transmisibile prioritare. Din martie 2021, prin Ordinului Ministrului Sănătății nr. 383/18.03.2021, a fost nominalizat ca laborator regional (jumătate din regiunea de sud-est) pentru screening-ul de variante virale SARS-CoV-2.**

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" a participat și în anul 2021 la programul multicentric al OMS de certificare externă **"WHO Influenza"** în cadrul Programului Organizației Mondiale a Sănătății de evaluare a calității pentru determinarea virusului gripal tip A prin metode moleculare - **WHO External Quality Assessment Project (EQAP)**, și de asemenea, la **Programul multicentric al OMS de certificare externa pentru WHO SARS-CoV-2 EQAP.**

In acest context, în Institutului de Virusologie s-a inițiat și se derulează **programul fundamental: Boli transmisibile prioritare - diagnosticarea infecției cu coronavirusul SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), investigarea variantelor virale circulante în România și a unor potențiale strategii terapeutice.**

Departamentele: **Viroze Emergente, Virusologie Moleculară, Patologie Celulară și Moleculară, Strategie, educație, documentare, IT, Centrul de Imunologie** și chiar structurile financiare și administrative, s-au implicat activ în testarea SARS-CoV-2 atât pentru Direcția de Sănătate Publică, cât și în diferite proiecte inițiate de autoritățile naționale, având în prezent o biobancă de peste 4400 de probe care a constituit materialul de baza pentru cercetările de identificare prin **secvențiere de nouă generație (NGS) a variantelor SARS-CoV-2 circulante.**

Până în prezent au fost testate prin NGS, peste 50 de izolate virale, prin **atragera de donații** de la **"Fundatia Mereu Aproape"** și **"Fundatia pentru Medicina Moleculară și Celulară"**, o mare parte dintre aceste secvențe fiind deja **diseminate către comunitatea internațională prin publicarea în GISAID**, cea mai importantă bază de date de secvențe SARS-CoV-2 și date clinice și epidemiologice asociate acestora.

De asemenea, în urma actualizării și validării laboratorului de biosecuritate 3 (BSL-3), cu **sprijinul Academiei Romane**, au putut fi **izolate și caracterizate mai multe variante virale SARS-CoV-2 din probele biologice din banca noastră de probe**, tulpini care în urma secvențierii întregului genom viral pe platforma noastră NGS (Illumina) au fost asociate următoarelor variante virale: a) B.1.408; B.1.258; B.1.88; b) începând din martie 2021, varianta (VOC) B.1.1.7., c) din iulie 2021 exclusiv varianta B.1.617.2 (delta).

Ca urmare a începerii campaniei naționale de vaccinare, având ca grupă prioritară inițială personalul medico-sanitar, a fost inițiată o colaborare cu **Institutul Național de Sănătate Publică** și 3 mari spitale din Capitală (**Spitalul de Boli Infecțioase și Tropicale Victor Babeș**, **Spitalul Universitar de Urgență**, **Spitalul de Nefrologie Carol Davila**) pentru **evaluarea longitudinală a statusului imun post-vaccinare și a dinamicii anticorpilor anti-SARS-CoV-2 la personalul medical vaccinat anti-COVID-19**. Au fost înrolate peste 400 de persoane, imunizate cu schema completa de 2 doze vaccin ARNm Pfizer/BioNtech. Studiul urmărește persistența răspunsului imun după vaccinare, factor important în strategia de imunizare.

Un alt proiect important aflat în desfășurare în cadrul Programului de cercetare curentă al Academiei Române pentru anul 2021, este direcționat asupra **studiului factorilor de prognostic ai evoluției COVID-19**. În cadrul acestuia, a fost deja creată o serotecă de la peste 500 de pacienți internați în **Spitalul Victor Babeș** cu diagnostic de infecție SARS-CoV-2, care au beneficiat de diferite scheme terapeutice. Se evaluează **asocierea între evoluția severă și nivelul unor citokine și chemokine proinflamatorii**, precum și **eficacitatea unor terapii țintite** (anticorpi monoclonali inhibitori ai receptorilor IL-6 sau IL-1). De asemenea, au fost investigate **corelațiile dintre severitatea infecției cu SARS-CoV-2, variantele virale și markeri moleculari specifici gazdei**.

IVN a promovat **colaborarea internațională și cercetările inter- și pluridisciplinare** câștigând împreună cu parteneri internaționali prestigioși, proiecte cu finanțare europeană. Astfel, în prezent se derulează proiectul **EU-Horizon 2020 STAMINA** – "Demonstration of intelligent decision support for pandemic crisis prediction and management within and across European borders" și proiectul **EU-Horizon 2020 – PERISCOPE** – "Pan-European Response to the ImpactS of COVID-19 and future Pandemics and Epidemics".

Proiectul **EU-Horizon 2020 - STAMINA** dezvoltă într-un parteneriat multinațional un set de instrumente inteligente de suport decizional pentru predicția și managementul pandemiilor, precum și ghiduri de implementare eficientă a principiilor și bunelor practici ce trebuie aplicate în comunicarea riscurilor și în planurile de pregătire și răspuns. **STAMINA aspiră la o schimbare de paradigmă în gestionarea crizelor pandemice și își propune să îmbunătățească securitatea sănătății în Europa și nu numai, oferind practicienilor instrumente noi, ușor de utilizat, care**

**vor facilita consolidarea capacității și cooperarea transfrontalieră la nivel național și regional.**

Proiectul **EU-Horizon 2020 – PERISCOPE**, într-un parteneriat cu 32 de țări, **analizează impactul pandemiei COVID-19 asupra grupurilor vulnerabile și a grupurilor supraexpuse, angajate în "prima linie"**. În condițiile în care pe perioada pandemiei COVID-19 s-au experimentat la nivel internațional diferite soluții politice pentru a ieși din blocaj și a evita daune masive aduse economiei, **proiectul a început o evaluare mai sistematică, cuprinzătoare și holistică a abordărilor guvernamentale care au avut succes în gestionarea crizei, și o analiza multidisciplinară teoretică și experimentală în vederea înțelegerii dinamicii pandemice, considerând atât abordările clinice și epidemiologice cât și cele psihologice, socio-economice, politice, statistice și tehnologice**. În final, PERISCOPE va crea **o platforma de modelare și analiză a datelor științifice obținute din multiple surse, un Atlas COVID, cu scopul de a identifica modele recurente, politici de succes și bune practici dar și o sursă dinamică de informații pentru diseminare** către specialiști dar și către publicul larg.

În cadrul acestui proiect desfășurăm studiu prospectiv care vizează atât determinarea în dinamică a **capacității neutralizante a anticorpilor specifici anti-Spike tip IgG și IgA**, cât și **raspunsul imun celular** la persoanele la care există o diminuare semnificativă în timp a răspunsului imun umoral pe un lot reprezentat de personalul implicat în testarea SARS-CoV-2 din Institutul de Virusologie Stefan S Nicolau. Rezultatele obținute până în prezent sunt submise spre publicare (în evaluare) la Journal of Cellular and Molecular Medicine, Ed. Wiley-Blackwell. Tot în cadrul acestui proiect contribuim împreună cu Dr. Maria Serbanescu de la Spitalul Clinic "Prof A. Obregia" la analiza impactului COVID-19 asupra unui alt grup de persoane vulnerabile, pacienții cu boli mintale. Analizând modificările privind spitalizările pentru toate maladiile psihiatrice (considerate global) atât la adulți cât și la copii și adolescenți în 2020 comparativ cu anii 2019 și 2018, s-a putut observa o scădere semnificativă a acestora în anul 2020. Studiul nostru a relevat însă faptul că pandemia nu a avut un impact similar asupra psihozelor majore, bolii bipolare, maladiilor schizo-afective și schizofreniei probabil datorită severității clinice a acestor maladii dar și a determinismului lor genetic. La copii și adolescenți nu au putut fi observate diferențe între spitalizările pentru ADHD, tulburări emotionale și de alimentație între anii 2020 și 2019. Numărul de spitalizări aproape s-a dublat însă, în 2020 comparativ cu 2019 pentru tulburările de spectru autist probabil datorită închiderii centrelor educationale speciale. Pentru a putea

extinde studiile pe o populație reprezentativă pentru România, recent am inițiat o colaborare cu Centrul Național pentru Evaluarea și Promovarea Sănătății Mintale.

În paralel, în **Departamentele: Viroze Emergente, Virusologie Moleculară, Patologie Celulară și Moleculară (incluzând și Biobaza)** s-au mai derulat **alte 8 proiecte de cercetare** finanțate din: **Fonduri Structurale - Programul Operațional Competitivitate, Programul PNIII** și au fost trimise spre evaluare alte 12 propuneri de proiecte la competițiile din Programul PNIII.

Pe lângă implicarea activă în programul fundamental prezentat mai sus, în **Departamentul Viroze emergente (DVE)** au fost continuate studiile legate de impactul factorilor de risc virali și de gazda pentru evoluția severă a infecțiilor virale neutrotrope, în particular a encefalitelor arbovirale în cadrul Proiectului PNIII P1-1.2-PCCDI nr. 57/2018- Platformă "One Health" multidisciplinară de excelență pentru studiul bolilor vectoriale neglijate și emergente (VectExcel)- o colaborare cu Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară Cantacuzino, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, fiind realizată împreună cu partenerii din Spitalul Victor Babes și INCDMM Cantacuzino caracterizarea clinică, serologică și virusologică a primelor 8 cazuri de infecții cu virus Toscana identificate în România și evidențierea unor markeri de neurovirulență în tulpinile virale provenite de la pacienți cu infecție severă West Nile.

**DVE** a participat la proiectul "OPEN-TEST: una nuova strategia per migliorare e favorire l'accesso al test HIV ed HCV in Romania (O nouă strategie pentru îmbunătățirea și facilitarea accesului la testele HIV și VHC în România)" - grant OPM/2018/01274, partener principal ANLAIDS Sezione Lombardia, Milano, Italia. A fost organizată o campanie de testare și informare pentru infecțiile cu virusul hepatitic C (VHC) și virusul imunodeficienței umane dobândite (HIV/SIDA) în rândul tinerilor și al populației aflate la risc, aplicând un chestionar detaliat asupra datelor demografice, epidemiologice și a factorilor de risc. Au fost testate 475 de persoane pentru infecția VHC și pentru infecția HIV, provenind din populația generală și din cadrul grupelor de risc (MSM, utilizatori de droguri injectabile, prizonieri). Rata de pozitivitate mare în grupele de risc arată importanța prevenției în profilaxia bolilor cu transmitere parenterală.

A fost inițiată o colaborare cu Administrația Națională a Penitenciarelor în vederea monitorizării seroprevalenței infecției cu virus hepatitic B la persoanele private de libertate (posibili consumatori de droguri injectabile IV, persoane cu comportament sexual la risc, persoane infectate HIV, persoane cu tatuaje). În conformitate cu recomandările OMS, extinderea programelor de screening este necesară pentru creșterea accesului la tratament a persoanelor infectate cu VHB și reducerea complicațiilor determinate de această infecție: ciroza, carcinom celular și boala hepatică terminală.

O activitate importantă în Departamentul Viroze emergente este reprezentată de activitatea de formare. În departament își desfășoară activitatea Disciplina de Virusologie a UMF Carol Davila. Trei dintre membrii departamentului sunt cadre didactice titulare și instruiesc studenții din Facultatea de Medicină (în limba română și în engleză) și rezidenții din specialitățile microbiologie medicală și boli infecțioase. La activitățile departamentului au participat și studenții doctoranzi Diana Iacob, Carmen Cristescu, Catalin Tucureanu, Raluca Hrisca, aflați în coordonarea Prof. Dr. Simona Ruta.

Simona Ruță a participat la activitățile comisiilor naționale de specialitate ale Ministerului Sănătății – Comitetul Național de Vaccinologie (vicepreședinte), comisia de microbiologie medicală (președinte), Comisia tehnică de evaluare a capacității unităților de specialitate care realizează testarea RT-PCR pentru detecția virusului SARS-CoV-2 și secvențiere pentru identificarea și caracterizarea virusului SARS-CoV-2, Comisia pentru supravegherea rujeolei, Comitetul Național pentru Certificarea Eradicării Poliomielitei. De asemenea, a participat la organizarea celei de-a 9a ediții a Congresului Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila (on line 25-27 noiembrie 2021) și celei de a 14 -a Conferințe de Microbiologie și epidemiologie (București-online, 4-6 noiembrie 2021). Este membru în subcomitetul pentru Educație medicală al Societății Europene de Microbiologie Clinică și Boli Infecțioase (ESCMID) și în grupurile de lucru pentru diagnostic molecular și pentru hepatite virale ale aceleiași societăți.

În afara implicării intensive în realizarea programului fundamental prezentat mai sus, contribuind la screening-ul de variante virale SARS-CoV2 și testarea prin secvențiere de nouă generație (NGS), **Departamentul Virusologie Moleculară** a realizat obiectivele propuse în cadrul planului de cercetare aprobat de Academia Română pentru anul 2021, derulând programele de cercetare:

**Translatarea algoritmului identificat *in silico* în diagnosticul patologiei colului uterin,** tema care a avut în vedere integrarea rezultatelor obținute în etapa anterioară într-un model multifactorial de predicție pentru apariția și progresia displaziei cervicale. S-a utilizat algoritmul de predicție GeneMANIA (<http://www.genemania.org>), acesta permițând formarea de rețele pentru a explora relațiile dintre seturile de gene cu profil mutațional selectate pentru carcinoamele scuamoase (SCC) și adenocarcinoame (AC), luând în calcul diferiți parametri precum: interacțiuni fizice, co-localizare, co-expresie, predicție de interacțiune moleculară, domenii proteice partajate, interacțiuni genetice și căi de semnalizare. Au fost selectate pentru investigații suplimentare genele care fac parte din căi de semnalizare comune pentru cele două simulări de date, genele de interes fiind LRP1B și ARID1A.

Potențialul de diagnostic și prognostic al markerilor selectați a fost testat pe probe biologice provenind de la paciente diagnosticate cu leziuni displazice și cancer cervical, rezultatele dovedind că ambele gene testate prezintă un nivel de expresie semnificativ scăzut în probele tumorale comparativ cu leziunile displazice.

**Corelația mutațiilor în gena TADA3 cu evoluția leziunilor HPV induse.** Proteinele E6 și E7 ale virusului papiloma uman joacă un rol important în oncogeneza cervicală, acestea interacționând cu numeroase ținte celulare, cele mai importante fiind p53 și pRB. O metodă alternativă de a inactiva p53 este degradarea co-activatorului TADA3 mediată de E6. Studiul s-a realizat pe probe biologice (lavaje vaginale) provenite de la paciente HPV pozitive cu citologie diversă (NILM, LSIL, HGSIL) și un lot control iar mutațiile în gena TADA 3 s-au determinat prin secvențiere Sanger ținând regiuni ale genei care codifică pentru reziduuri susceptibile la modificări post-translaționale (ubiquitinări, acetilări, fosforilări sau sumoilări). Rezultatele obținute au arătat că 2/3 din pacientele cu genotipul 16 prezintă mutații punctiforme în situsul 9781190 (ceea ce conduce la o modificare a aminoacidului fenil-alanină în serină) iar cele cu genotipul 66 prezintă o mutație a genei TADA3 cu deplasarea cadrului de citire în situsul 9789766. Aceste mutații nu au mai fost raportate în literatură până în prezent.

**Rolul metilomului HPV în patogenie.** Virusul papilloma uman (HPV) reprezintă factorul etiologic al neoplaziei genitale și testarea virală este astăzi curent folosită în screening-ul de col uterin, alături de investigația citologică (Papanicolau). Deoarece testarea virală nu poate discrimina între leziunile transiente și cele persistente (care conduc la cancer) iar examenul citologic are o specificitate relativ scăzută, metilarea ADN viral a fost propusă ca o metodă de screening în triajul

femeilor HPV pozitive. Studiul a avut ca scop investigarea capacității metilomului HPV de a distinge între diferite tipuri de leziuni și s-a realizat pe specimene de lavaj cervical de la paciente cu citologie diver, HPV 16 pozitive. Alterări ale metilomului HPV 16 s-au evidențiat prin secvențierea Sanger a izolatelor ADN tratate cu bisulfit, regiunile țintite fiind gena virală E6, promotorul și enhancerul. Analiza rezultatelor probelor secvențiate, realizată cu BioEdit și BlastN, a arătat o creștere a numărului de situsuri metilate odată cu severitatea leziunii. Situsul frecvent metilat este C37 în LGSIL și HGSIL. Pentru HGSIL, în probele studiate este frecvent întâlnită metilarea la C31, C37, C43 și C58 iar pentru LSIL la situsurile C31 și C52. Stratificarea pe baza histologiei probelor din lotul HGSIL în CIN1, CIN2 și CIN3 a evidențiat faptul că odată cu progresia leziunilor crește și numărul de situsuri metilate în cadrul regiunilor promotor. În enhancer a fost observată metilarea doar în cazul probelor cu CIN3.

De asemenea, în cadrul **Departamentului Virusologie Moleculară** s-au derulat și proiectele castigate prin competiție. Astfel, proiectul **PN-III-P1-1.1-TE-2019 – TE 39/2020 - Corpusculii ND10, structuri dinamice în remodelarea cromatinei virale în infecția timpurie cu virusurile papilloma umane de risc crescut (NOVO)** - are ca scop descifrarea mecanismelor epigenetice care stau la baza controlului transcripției virale ale genotipurilor HPV de risc înalt și care conduc la eludarea sistemului imun al gazdei. În cadrul etapei din 2021 s-au inițiat liniile celulare provenite din keratinocite umane (HaCaT, HEKa 293TT) și s-au generat genoame HPV16 mutante pentru blocarea transcrierii genelor virale timpurii (E1<sup>Δ</sup>E4, E5, E6, E7). S-au confirmat mutațiile prin secvențiere de tip Sanger și s-au obținut pseudogenoamele HPV16 mutante prin restricție, purificare și ligare. În același timp s-a stabilit protocolul de producere a pseudovirionilor mutanți.

Proiectul **PN-III-P2-2.1-PED-2019 – PED 544/2020 - Algoritmi de inteligență artificială în diagnosticul infertilității masculine bazati pe noi abordări moleculare (ARIAMIND)** - urmărește elaborarea, pe baza unor modificări epigenetice și a unor investigații specifice, a unor algoritmi de inteligență artificială (IA) pentru diagnostic și decizie (DSS) în vederea selecției pentru tehnicile de reproducere asistată (ART). În această etapă s-a demarat înrolarea subiecților, evaluarea lor clinică și paraclinică, alcătuirea bazei de date și îmbogățirea biobăncii cu probe, izolarea acizilor nucleici, testarea microbiologică, interogarea bazelor de date și stabilirea unor gene țintă. În același timp, prin folosirea programelor de bioinformatică, s-au selectat regiunile care vor fi țintite prin PCR multiplex și s-a demarat construcția primerilor

necesari pentru secvențierea de nouă generație. Baza de date preliminară a fost utilizată pentru demararea algoritmului de IA

**Departamentul Virusologie Moleculară** a fost implicat în multiple activități de formare, Dr Botezatu și Dr Iancu VI au asigurat instruirea în tehnici de biologie moleculară și tehnici de secvențiere de nouă generație a unor medici rezidenți specialitatea microbiologie și epidemiologie, repartizați în instituția noastră și a doctoranzilor și postdoctoranzilor care și-au desfășurat stagiile de pregătire în cadrul SCOSAR – Domeniul Medicina.

De menționat că în anul 2021 a fost susținută teza: Studiul unor mecanisme celulare și moleculare implicate în răspunsul la acțiunea unor compuși cu activitate antivirală; Student-doctorand: Ioana-Mădălina ALDEA (PITICĂ); Conducător științific: CS I Dr. Gabriela ANTON. Teza a evaluat activitățile biologice (citotoxice, imunomodulatorii și antitumorale) ale extractului hidro-alcoolic de *Tamarix gallica*, activitatea virucida, antivirala și profilactica a extractului precum și rolul acestui extract în modularea activității antivirale prin investigarea mecanismelor de imunitate antivirala activate în urma tratamentului. Nota de originalitate rezidă în caracterizarea *in vitro* a efectului imunomodulator și antiviral al extractului de *T. gallica* folosind un model de studiu inovativ, care a permis evaluarea semnalizării intercelulare prin care două tipuri de celule pot modula răspunsul la infecția virală precum și la tratamentul cu extractul hidro-alcoolic de *T. gallica*.

**Departamentul Patologie Moleculară și Celulară** prin **Laboratorul de diagnostic** a fost implicat activ în testarea SARS-CoV-2 și screening-ul variantelor virale, dar și în realizarea programelor prioritare aprobate de Academia Română și a proiectelor obținute în competiții naționale și internaționale.

Menținând obiectivele generale, de dezvoltare a activităților de cercetare în domenii de interes global și de creștere a capacității de cooperare cu sectorul privat, în cadrul departamentului s-a derulat în continuare proiectul finanțat din fonduri structurale în cadrul POC A 1.1.4.-E: **Stabilirea Profilului Molecular al Neoplasmelor Mieloproliferative și al Leucemiei Acute Mieloide pentru Designul unor Strategii de Diagnostic Precoce, Prognostic și Tratament**, (Director științific: Prof. Ștefan N Constantinescu; Coordonator executiv: Dr. Carmen C. Diaconu).

Pana in prezent a fost constituita o biobanca pentru neoplasme mieloproliferative si alte neoplazii mieloidale, de peste 400 de probe și a fost analizat profilul molecular al acestora prin tehnologii de ultima ora: secventiere de noua generatie (NGS), analiza de fragmente prin electroforeza capilara, analiza curbilor de disociere de inalta rezolutie, etc. Astfel, analiza mutațiilor driver la pacienții cu diagnostic sau suspiciune NMP (atât în faza cronică cât și în faza leucemică) evaluați până în prezent, a arătat că 44,94% prezintă mutația JAK2 V617F, aprox. 9% prezintă diferite mutații în gena CALR, 1,24 % prezintă mutații în MPL și 0,49 % prezintă o deleție în gena JAK2 exon 12. De asemenea, s-a continuat implementarea unei strategii de screening pentru inhibitori specifici și selectivi pentru ținte cunoscute, punand la punct pe diferite sisteme model, metode de screening ce vor putea fi utilizate în analiza high-throughput. Un rezultat important al acestui an a fost stabilirea condițiilor de obtinere a unui model animal pentru leucemia acuta mieloida secundara în cadrul BIOBAZEI care activeaza în cadrul departamentului PCM. Studiile în cadrul acestui proiect, au fost publicate în 2 articole WOS/ISI: *INT J MOL SCI* (FI 5,923) și *FRONT CELL DEV BIOL* (FI 6,684) și au fost prezentate 4 conferinte.

Proiectul **complex de cercetare de frontieră (PCCF- PNIII – tip P4) - Mecanisme și biomarkeri de răspuns și rezistența la terapiile curente țintite ale cancerului gastric / (THERRES)** - obținut de IVN (responsabil Dr. Mihaela Economescu) în parteneriat cu CEMT /IC Fundeni (coordonator Prof. Irinel Popescu) și UMF Craiova (partener) Are ca obiectiv principal identificarea și caracterizarea reglatorilor activării funcției imunitare (immune checkpoints) în cadrul unui sistem, actualizat de clasificare pe baze moleculare a cancerului gastric, pentru implementarea unui tratament personalizat în scopul îmbunătățirii ratei de supraviețuire a pacienților. În cadrul etapei curente s-au realizat studii funcționale *in vitro* implicând țintele imune identificate la nivelul celulelor tumorale gastrice. Experimentele realizate atât pe linii celulare cât și pe culturi primare tumorale cu expresie diferențiată a țintelor imune au implicat testarea reacției limfocitelor T la celulele tumorale gastrice, în prezența sau absența unor inhibitori țintiți. Rezultatele au demonstrat că în prezența inhibitorilor interacției PD1/PD-L1, limfocitele T se activează și secretă citokine cu rol anti-tumoral de tip IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , etc. În paralel, s-a demonstrat apoptoza celulelor tumorale prin determinarea caspazei 3, în cadrul testului de citotoxicitate mediată celular. Datele au fost valorificate prin publicarea unui articol în

**Frontiers in Medicine (IF= 5.093/2020)** si sustinerea a 2 conferinte cu abstract publicat in **Annals of Oncology (IF = 32.976)**.

**Proiectul PN-III-P1-1.1-TE-2019-1864 - Evaluarea COL10A1 ca potențială țintă terapeutică și biomarker de diagnostic precoce în cancerul gastric (COL-DIA-THER)** coordonat de IVN (Dr. Laura Necula), urmărește evaluarea gradului de implicare al proteinei COL10A1 in carcinogeneza gastrica in scopul analizării potențialului de biomarker pentru diagnosticul cancerului gastric si tinta moleculara in tratamentul acestei boli maligne. Obiectivele proiectului includ validarea COL10A1 ca posibila tinta terapeutica prin analiza capacității oncogenice, folosind experimente de inhibare si supraexpresie a genei ținta în celule normale si tumorale gastrice si analiza nivelului circulant de COL10A1 in plasma pacienților cu tumori gastrice. Rezultatele obținute in urma supraexprimării COL10A1 arata o creștere semnificativa a capacitatii de migrare si proliferare, scăderea apoptozei și creșterea expresiei principalilor markeri de tranziție epitelial-mezenchimala la nivelul liniei celulare tumorale HS746T tratata cu adenovirus COL10A1, sugerând implicarea acestei proteine in procesele de oncogeneza la nivelul țesutului gastric.

**Proiectul PN-III-P2-2.1-PED524/2020 Evaluarea potentialului de exploatare a materialelor poroase in tratarea disbiozelor microbiotei (PREMISE)** – coordonat de Dr. Coralia Bleotu, are ca obiectiv dezvoltarea de noi materiale micro și mezoporoase (MMM) folosind metode de sinteză recente și de a funcționaliza aceste materiale pentru aplicații biomedicale: sisteme cu eliberare controlată, în special pentru bolile asociate microbiotei. In cadrul proiectului au fost utilizate substanțe naturale, ca agenți biologici activi, care au fost încărcate în platformele poroase, cu un sistem de pori îmbunătățit, capabil să găzduiască și să elibereze agenți biologici activi (quercetina, acid galic, acid cafeic, acid trans-ferulic, acid cumaric, catechină și epicatechină) pentru tratamentul bolilor asociate microbiotei intestinale. Testarea si eficienta acestor sisteme inovative de eliberare controlată dopate cu antibiotic și polifenoli s-a realizat pe un model de studiu al disbiozei *in vivo* (soareci Balb c prin administrarea antibioticului prin gavaj pe o perioadă de 14 zile).

**Unul din proiectele de cercetare curentă aprobate pentru anul 2021 de Academia Româna** a ținut analiza cancerului pancreatic (CP), o afecțiune cu prevalență redusă, dar mortalitate mare, cu o rată de supraviețuire la 5 ani a pacienților de aproximativ 7%. Screening-ul expresiei unor proteine solubile a arătat o creștere semnificativă a leptinei (o adipokină asociată cu creșterea tumorii și metastazarea), IL-1 R4, IL-1RA, alături de IL-1 alfa și alți factori de creștere (PDGF, BDNF, G-CSF) precum și MMP-9 au prezentat niveluri crescute în cancerul de pancreas (de cel puțin 2 ori). Utilizând miRNA-qPCR array s-au decelat o serie de miRNAs care au prezentat expresie crescută în cancerul de pancreas: miR-34a-5p, miR-100-5p, miR-193a-5p, miR-122-5p, miR-885-5p. Experimentele de validare prin PCR au confirmat creșterea acestor miRNA asociată cancerului pancreatic susținând posibilitatea utilizării acestora ca biomarkerii cu utilitate clinică în această patologie.

O altă direcție investigată de **Departamentul PCM în cadrul programelor Academiei Române** a fost **studiul mecanismelor moleculare în patogeneza mielomului multiplu (MM)**, o afecțiune clonală a limfocitelor B ce rezultă în urma proliferării de plasmocite maligne în măduva osoasă (MO). În acest studiu au fost identificați potențiali biomarkeri neinvazivi asociați cu stadiile de boală: proteina Dickkopf-related protein 1 (Dkk-1) corelat anterior cu prezența leziunilor osteolitice; ST2/IL1 R4, receptorul pentru interleukina IL-33, cu rol în modularea micromediului tumoral, a cărei asociere cu MM nu a fost raportată până în prezent; growth differentiation factor 15 (GDF15) ale cărei niveluri serice au fost asociate anterior cu afectarea osoasă în MM; chemokina CXCL9 (MIG), un posibil factor de prognostic independent în ceea ce privește supraviețuirea la pacienții cu MM la diagnostic; trefoil factor 3 (TFF3) ale cărei niveluri serice au fost corelate pozitiv cu severitatea bolii cronice de rinichi și care ar putea reprezenta un biomarker pentru afectarea renală în MM, nefiind investigat în această patologie; leptina ale cărei niveluri crescute au fost descrise anterior în MM; factorul de stimulare al coloniilor granulocitare (G-CSF) al cărei concentrație serică a fost asociată cu leucocitoza persistentă la pacienții cu MM. Pe altă parte, între probele pacienților cu MM la diagnostic și cei aflați în faza de recădere a bolii s-au observat diferențe de expresie de cel puțin 1.5 FC, în sensul creșterii pentru interleukinele IL-6, IL-12 p70, IL-15, IL-34 și în sensul scăderii nivelului de expresie pentru brain-derived neurotrophic factor (BDNF) și pentru growth-related oncogene-alpha (GRO-alpha). În concluzie,

nivelurile de citokine circulante și alte proteine solubile prezintă modificări complexe în mielomul multiplu, existând diferențe importante între momentul diagnosticului și faza de recădere a bolii.

**Studiul răspunsului la hipoxie pentru celule neuronale și gliale expuse la etanol,** Consumul de alcool etilic este un factor de risc pentru producerea traumatologiei vertebro-medulare (TVM), iar recuperarea postraumatică a pacienților consumatori de etanol în mod cronic prezintă particularități surprinzătoare (fiind uneori mai eficientă comparativ cu cea a pacienților tratați pentru deficite post TVM și fără consum abuziv de alcool în antecedente). Studii *in vitro* utilizând linia celulară tumorală de neuroblastom HTB 11 supusă tratamentului cronic /acut cu alcool etilic au urmărit evaluarea răspunsului celular la hipoxie indus de  $\text{CoCl}_2$  și deferal. S-a constatat creșterea nivelului de expresie al HIF-1 $\alpha$  în celulele expuse la etanol și tratate cu desferoxamina comparativ cu cele neexpuse dar asociate cu creșterea proteinelor implicate blocarea apoptozei (Bcl-2) și a ciclului celular pentru repararea /eliminarea celulelor afectate (Phospho-p53, PHospho-Rad17). S-a observat activarea piroptozei/inflamazomului (creșterea nivelului de expresie a Caspazei 7, NLRP, RIPK1) în celulele expuse acut/cronic la etanol, precum și o creștere a nivelului Caspazelor 3, 8 și 10 în celulele expuse o perioadă scurtă la etanol și o scădere a expresiei acestor molecule în celulele expuse cronic asociată apariției toleranței la etanol. Particularitățile moleculare ale răspunsurilor posthipoxemice ale celulelor medulare (expuse și neexpuse la etanol) pot sta la baza alcătuirii unor strategii terapeutice potențial benefice în recuperarea suferințelor produse de traumatismele vertebro-medulare.

**Cercetări comparative privind comunitățile de diatomee benthice în ape dulci din Larsemann Hills, Antarctica de Est, și lacuri glaciare din munții Făgărași, România”** s-a înscris în programele aprobate de Academia Romană în 2021. Prin analiza SEM s-a realizat identificarea și descrierea speciilor de diatomee a sedimentelor din probele acvatice recoltate din Antarctica de Est (dintr-un pârâu rezultat din topirea zăpezii în zona de captare a Lacului Scandrett, Dealurile Larsemann) și din România (lacurile glaciare Bălea și Capra, Munții Făgăraș) și anume: 4 specii (*Psammothidium stauroneioides*, *Craspedostauros britannicus*, *Diademesis perpusilla* și *Luticola muticopsis*) în Antarctica și a 3 specii (*Fragilaria capucina*, *Amphora ovalis* și *Hantzschia amphioxys*) în România (Lacul Capra). Analiza comparativă a rezultatelor în cele două medii distincte, antarctic și temperat, sugerează că taxonii specifici din Antarctica și Lacul glaciare Capra

ar putea fi mai sensibili sau chiar vulnerabili la încălzirea regională și globală a mediului înconjurător, spre deosebire de taxonii din genurile comune, prezente în Antarctica (în vecinătatea a două stații de cercetare) și în Lacul glaciari Bâlea (frecventat turistic) care par a fi mai puțin sensibili la schimbările climatice și mai puțin vulnerabili la poluarea mediului prin turism.

Trei cercetători din departamentul DPCM sunt membri ai unor colective editoriale: **Dr. Carmen Cristina Diaconu** - Journal of Cellular and Molecular Medicine (**IF 5,31**), Romanian Biotechnological Letters, Journal of Contemporary Clinical Practice; BioAccent BAOJ HIV; Herald Scholarly Open Access Journal of Virology and Antivirals; **Dr. Coralia Bleotu** - Journal of Contemporary Clinical Practice; Romanian Archives of Microbiology and Immunology; Letters in Applied NanoBioScience. **Dr. Economescu Mihaela** - World Journal of Stem Cells; IF: 5,326. Trends in Immunotherapy, și International Journal of Gastroenterology. Iar **Dr. Cristina Mambet** face parte din structura consiliului director al Asociației de Medicină de Laborator din România (AMLR) în calitate de președinte.

Rezultatele cercetărilor din DPCM au fost valorificate în 14 articole publicate în anul 2021 în reviste cotate Clarivate Analytics (WOS), care totalizează un **factor de impact cumulat de 49,721**. Numai în acest an, articolele publicate de membrii departamentului de Patologie Celulară și Moleculară au fost **citate de un număr de 501 publicații din WOS**. Doua articole au avut peste **40 citări în anul 2021**.

**Institutul de Virusologie** a lansat servicii de expertiză virusologică, serologică, moleculară și celulară, la solicitarea clinicienilor, beneficiarilor privați, Direcției de Sănătate Publică, atragând peste **141.375 lei** la bugetul institutului.

Este important de menționat că în anul 2021 s-au putut achiziționa cu sprijinul ACADEMIEI ROMANE sau din proiectele PN III, unele echipamente moderne, necesare activității de cercetare. Astfel, au fost achiziționate: o unitate de monitorizare și ventilație IVC, Smart flow (TECNIPLAST) pentru modernizarea BIOBAZEI (48.492,50 LEI); un sistem purificare apă (MILLIPORE), MilliQ Direct Q8UV (29.274,00 LEI); un Bioruptor Pico Ultrasonicator de nouă generație cu răcire (153.484 lei); o balanță analitică Kern, ATB 220-5DNM, omologată și verificată metrologic (11.455,24 lei).