

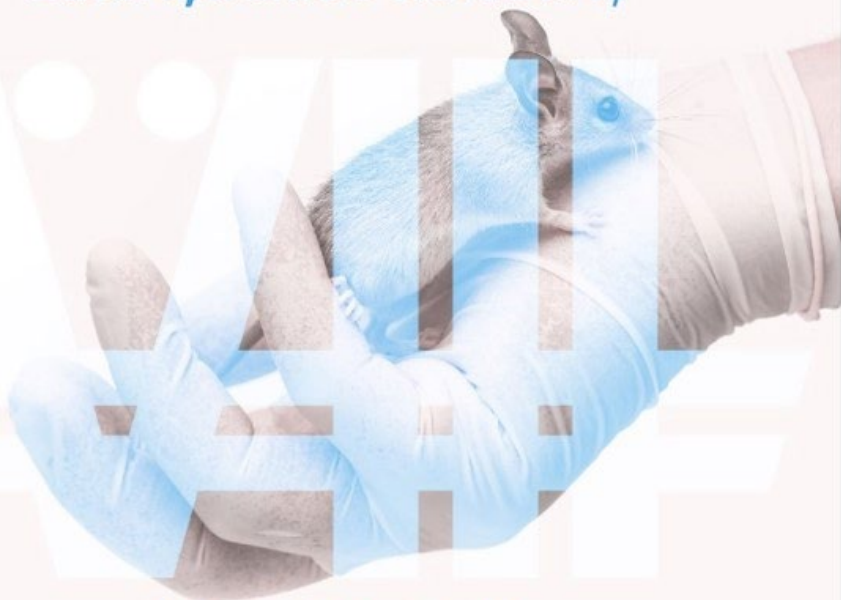
29 martie 2024

AL VIII-LEA SIMPOZION NAȚIONAL

CU PARTICIPARE INTERNAȚIONALĂ

EVALUAREA SEVERITĂȚII ȘI CONCEPTULUI 3R ÎN
PROIECTELE CE FOLOSESC ANIMALE ÎN EXPERIMENTARE

București I.N.C.D Victor Babeș



ARSAL

ASOCIAȚIA ROMÂNĂ PENTRU
ȘTIINȚA ANIMALELOR DE LABORATOR

www.arsal.ro



ARSAL

Asociația Română pentru Știința Animalelor de Laborator



București, 2024

ISSN 2066 - 2599

ISSN-L 2066 – 2599

Registratura

Registratura este amplasată lângă amfiteatrul „Prof. Univ. Ioan Moraru”, Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale “Victor Babeș”.

Program: 08.00 – 12.30

SPONSORI



Cuvânt înainte

Dragi colegi

Am deosebita onoare și plăcere să vă întâmpinăm la cel de-al VIII-lea Simpozion Național al Asociației Române pentru Știința Animalelor de Laborator (ARSAL).

Simpozionul este găzduit de Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale “Victor Babeș” din București.

Tematica simpozionului din acest an este concentrată pe evaluarea relevanței experimentelor pe animale ținând cont de avansul luat de metodele alternative: culturi celulare, organoizi, organ-on-chip, meta-analize etc. și de presiunea organizațiilor care militează pentru drepturile animalelor și a politicului care reglementează mai strict experimentarea pe animale.

O altă parte a simpozionului este dedicată modului în care se poate evalua și reduce severitatea experimentelor pe animale, dar și a posibilităților de instruire.

Nu în ultimul rând, dar în același spirit 3R, o sesiune este dedicată prezentării unor noi abordări în testele comportamentale.

Lectorii sunt personalități din toate domeniile conexe experimentării pe animale: din instituții de învățământ superior, cercetători, manageri de centre de experimentare.

O sesiune de postere cu rezultate din diferite studii de medicină experimentală completează lucrările simpozionului.

Avem certitudinea că programul pe care îl vom realiza va satisface cele mai multe așteptări, precum și nevoia de instruire și de informare a persoanelor care activează în acest domeniu.

Vă întâmpinăm cu aceeași ospitalitate într-o ambianță elegantă și somptuoasă, sperând să vă oferim un eveniment științific memorabil.

Mulțumim sponsorilor noștri care au făcut posibilă această manifestare științifică :

SAPACO 2000 – Director General Adrian BURCEA

COMSERVICE COMPANY - Director General Cătălin PIU

Sunt mai mult decât onorat să vă spun : Bun Venit !

Cristin COMAN,

Președinte ARSAL

COMITET DE ORGANIZARE

Președinte:

Dr. Gina ISVORANU – Institutul „Victor Babeș” București

Membri:

- **Dr. Cristin COMAN – Institutul „Cantacuzino” București**
- **Dr. Laurențiu Anghelache – Institutul „Victor Babeș” București**
- **Ing. Cristian ZINCA – SC SAPACO S.A.**
- **Dr. Diana ANCUȚA - Institutul „Cantacuzino” București**

COMITET ȘTIINȚIFIC

Președinte:

Dr. Cristin COMAN – Institutul „Cantacuzino” București

Membri:

- **Prof. Univ. Dr. Gabriel COTOR – Facultatea de Medicină Veterinară, București**
- **Prof. Univ. Dr. Bogdan SEVASTRE – Facultatea de Medicină Veterinară, Cluj-Napoca**
- **Conf Univ. Dr. Șerban MOROȘAN – Faculté de Médecine, Universitatea Sorbonna, Paris, Franța**
- **Conf. Univ. Dr. Ioana-Cristina ANDRONIE - Facultatea de Medicină Veterinară, Universitatea „Spiru Haret” București**
- **Dr. Diana ANCUȚA - Institutul „Cantacuzino” București**

PROGRAM ȘTIINȚIFIC

09.00 – Prof. Univ Dr. Mihaela GHERGHICEANU, Director Științific INCD „Victor Babeș”

09-11 Sesiunea I: Cercetarea translațională și conceptul 3R– noi paradigme și perspective în contextul extinderii metodelor alternative

Alexandra
NĂȘCUTIU

Cercetările realizate pe animale de laborator:
adevăruri și interpretarea lor

Gheorghîța
ISVORANU

Credibilitatea și validarea modelelor de înlocuire a
animalelor în cercetarea științifică

Ioana – Cristina
ANDRONIE

Credibilitatea și validarea modelelor de înlocuire a
animalelor în cercetarea științifică

11.00 – 11.30 – Pauză

11.30 – 13.00 Sesiunea II: Prezentarea celor mai recente tehnologii de cercetare și analiză comportamentală animală – sesiune susținută de firma ALIANT/NOLDUS

Cătălin PIU

Integrator Tehnologiei IT pentru Cercetare
Observațională în Medicină și Biologie

Tom PUDIL

Behavioral Neuroscience, beyond video
tracking with EthoVision XT (prezentare în
limba engleză)

13.00-14.00 – Pauza de prânz

14.00 – 15.30 Sesiunea III : Reducerea severității experimentelor pe animale – tendințe și educație

Cristin COMAN	Evaluarea gradelor de severitate în funcție de modelul animal și gradul de specializare a procedurilor
---------------	--

Fabiola IONIȚĂ	Agresivitatea la șoarecii masculi utilizați în experimente. Există soluții?
----------------	---

Bogdan SEVASTRE	Educația și instruirea în știința animalelor de laborator, actualități și perspective
-----------------	---

15.30. – Încheierea simpozionului

15.30 – 16.00 Adunarea Generală a Membrilor ARSAL

Postere:

Sevastre-Berghian Alexandra-C., Ielciu Irina, Olah Neli-Kinga, Barbălată Cristina, Tomuța Ioan, Toma Ioana, Claudia-Andreea Moldoveanu, Toma Vlad, Sevastre Bogdan, Hasas Alina D, Hanganu Daniela, Bodoki Andreea, Roman Ioana, Simona Clichici, Baldea Ioana - *Studii preliminare privind efectele extractelor de cynara scolymus L. pe șobolani injectati cu amiloid β (A β 1-42).*

Văduva Mariana, Ioniță Fabiola, Tubac Ruxandra, Ancuța Diana Larisa, Coman Cristin - *Limitări ale defectelor dentare la iepure pentru testarea materialelor de uz stomatologic.*

Gheorghîța Isvoranu, Mihaela Surcel, Adriana Munteanu, Carolina Constantin, Monica Neagu, Marioara Chirițoiu-Butnaru - *Efectele dietei bogate în grăsimi asupra celulelor imune la șoareci purtători de tumori.*

Ancuța Diana Larisa, Călborean Octavian, Coman Cristin - *Investigarea efectelor comportamentale ale efectului dizocilpinei (MK-801) asupra șoarecilor GPR 75 WT și KO*

Mihaela Surcel, Adriana Narcisa Munteanu, Gheorghîța Isvoranu, Diana Antonia Costea, Elena Georgiana Dobre, Carolina Constantin, Monica Neagu - *Modelul experimental de dermatită psoriaziformă este caracterizat de dereglări majore ale subpopulațiilor limfocitare*

Marioara Chirițoiu-Butnaru, Gabriela Chirițoiu, Mihaela Surcel, Gheorghîța Isvoranu - *Evaluarea imunologică a modificărilor induse de dieta bogată în grăsimi la șoareci GRASP55-/-.*

Raluca Tutuianu, Daniela Madalina Ghetu, Irina Titorencu, Ana Maria Rosca - *Mediul conditionat derivat de la fibroblaste cultivate in sferoizi promoveaza regenerarea pielii pe un model murin de rana cutanata*

Index rezumate:

Cercetările realizate pe animale de laborator: adevăruri și interpretarea lor

Alexandra NĂȘCUȚIU

Cercetarea pe animale salvează vieți

Gina ISVORANU

Credibilitatea și validarea modelelor de înlocuire a animalelor în cercetarea științifică

Ioana-Cristina ANDRONIE

Integrator Tehnologii IT pentru Cercetare Observațională în Medicină și Biologie

Cătălin PIU

Behavioral Neuroscience, beyond video tracking with EthoVision XT

Tom PUDIL

Evaluarea gradelor de severitate în funcție de modelul animal și gradul de specializare a procedurilor

Cristin COMAN

Agresivitatea la șoarecii masculi utilizați în experimente. Există soluții?

Fabiola IONIȚĂ

Educația și instruirea în știința animalelor de laborator, actualități și perspective

Bogdan SEVASTRE

Studii preliminare privind efectele extractelor de cynara scolymus L. pe șobolani injectați cu amiloid β ($A\beta$ 1-4)

Sevastre-Berghian Alexandra-C., Ielciu Irina, Olah Neli-Kinga, Barbălată Cristina, Tomuță Ioan, Toma Ioana, Claudia-Andreea Moldoveanu, Toma Vlad, Sevastre Bogdan, Hasas Alina D, Hanganu Daniela, Bodoki Andreea, Roman Ioana, Simona Clichici, Baldea Ioana

Limitări ale defectelor dentare la iepure pentru testarea materialelor de uz stomatologic

Văduva Mariana, Ioniță Fabiola, Tubac Ruxandra, Ancuța

Diana Larisa, Coman Cristin

Efectele dietei bogate în grăsimi asupra celulelor imune la șoareci purtători de tumori

Gheorghîța Isvoranu, Mihaela Surcel, Adriana Munteanu, Carolina Constantin, Monica Neagu, Marioara Chirițoiu-Butnaru

Investigarea efectelor comportamentale ale dizocilpinei (MK-801) asupra șoarecilor GPR 75 WT și KO

Ancuța Diana Larisa, Călborean Octavian, Coman Cristin

Modelul experimental de dermatită psoriaziformă este caracterizat de dereglări majore ale subpopulațiilor limfocitare

Mihaela Surcel, Adriana Narcisa Munteanu, Gheorghîța Isvoranu, Diana Antonia Costea, Elena Georgiana Dobre, Carolina Constantin, Monica Neagu

Evaluarea imunologică a modificărilor induse de dieta bogată în grăsimi la șoareci GRASP55-/-

Marioara Chirițoiu-Butnaru, Gabriela Chirițoiu, Mihaela Surcel, Gheorghîța Isvoranu

Mediul conditionat derivat de la fibroblaste cultivate in sferoizi promoveaza regenerarea pielii pe un model murin de rana cutanata

Raluca Tutuianu, Daniela Madalina Ghetu, Irina Titorencu, Ana Maria Rosca

INSTITUTUL NATIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE IN DOMENIUL PATOLOGIEI SI STIINTELOR BIOMEDICALE VICTOR BABES RA:



Institutul Național de Patologie Victor Babeș din București (www.ivb.ro) a fost înființat în 1887 și, de atunci, este un centru de referință în cercetarea medicală din România. Misiunea noastră este de a descoperi mecanismele moleculare și celulare implicate în patologii variate, de la boli necomunicabile la patologie tumorală. Eforturile noastre sunt concentrate la identificarea unor tehnici de diagnostic precoce cât mai precis pentru ca pacienții să poată beneficia de terapii personalizate. IVB asigură servicii de diagnostic specializat pentru pacienți și servicii de cercetare pentru companii și alte instituții.

Institutul Național de Patologie Victor Babeș are o biobază acreditată și laboratoare moderne de patologie, genetică, biologie moleculară, biochimie, microscopie electronică. Tehnici complementare sunt disponibile pentru imagistica celulară și moleculară: cryo-EM, CEMOVIS, CLEM, single particle, microscopie confocală, microscopie de super-rezoluție STED (<https://www.cell-imaging.ro>). Analiza genomică (ddPCR, RT-PCR, qRT-PCR, secvențierea Sanger și next-gen) și tehnologiile proteomice (xMAP/platformă Luminex 200, microarray de proteine) sunt de asemenea disponibile.



...

INSTITUTUL NATIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE IN DOMENIUL PATOLOGIEI SI STIINTELOR BIOMEDICALE VICTOR BABES RA:

The Victor Babeş National Institute of Pathology in Bucharest (www.ivb.ro) was founded in 1887 and, since then, it has been a reference center for medical research in Romania. Our mission is to discover the molecular and cellular mechanisms involved in various pathologies, from non-communicable diseases to tumor pathology. Our efforts are focused on identifying early diagnosis techniques as precisely as possible so that patients can benefit from personalized therapies. IVB provides specialized diagnostic services for patients and research services for companies and other institutions

The National Institute of Pathology Victor Babeş has modern laboratories for pathology, genetics, molecular biology, biochemistry, electron microscopy and an authorized animal facility. Complementary techniques are available for cellular and molecular imaging at high resolution: cryo-EM, CEMOVIS, CLEM, single particle, confocal microscopy, STED super-resolution microscopy (<https://www.cell-imaging.ro>). Genomic analysis (ddPCR, RT-PCR, qRT-PCR, Sanger and NextGen sequencing) and proteomic technologies (xMAP array/Luminex 200 platform, protein microarray) are also available.



REZUMATE/ABSTRACTS

PREZENTĂRI

CERCETARILE REALIZATE PE ANIMALE DE LABORATOR: ADEVĂRURI ȘI INTERPRETAREA LOR

Alexandra-Maria Nășcuțiu

Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară
„Cantacuzino”,
Microstructura Biobancă
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București

nascutiu.alexandra@cantacuzino.ro; alexandra.nascutiu@umfcd.ro

Cuvinte cheie : testări pe animale, controversate, dezinformare, aspecte etice

Rezumat:

Cu siguranță unul din subiectele cele mai dezbătute în lumea cercetării medicale, testarea pe animale a ridicat în ultimele trei secole foarte multe probleme de morală și etică. Controversele foarte aprinse dintre cei pro- și cei anti-testare au oscilat între argumente (științifice) bine documentate și informații false. Jocul s-a purtat întotdeauna între puterea argumentării, puterea contra-argumentării și puterea

dezinformării. Supraspecularea și exagerările apărute în media în ambele direcții au împiedicat soluțiile constructive.

Trunchierea informațiilor, scoaterea lor din context sau omisiuni în relatarea anumitor situații sunt cele mai frecvente arme de luptă verbală ale militanților pentru încetarea utilizării animalelor de laborator. La acestea se adaugă amenințările și incitățile la acte de extremism. Ca răspuns, lumea științifică ar trebui să se preocupe de introducerea unui alt sistem 3R: *responsabilizare, regândire, redimensionare* pentru a putea continua să-și desfășoare activitatea la standardele impuse de etica în cercetare în vederea progresului în domeniul medical.

Prezentarea de față – o abordare care se dorește obiectivă – surprinde câteva din punctele vulnerabile ale testărilor pe animale.

Bibliografie selectivă:

Atalić B - Historical development and ethical considerations of vivisectionist and antivivisectionist movement – *JAHR*, 2012; 3(6): 399-414

Bailey J, Balls M – Clinical Impact of high-profile animal-based research reported in the UK national press - *BMJ Open Science* 2020;4:e100039. doi:10.1136/bmjos-2019-100039

Bates A.W.H. - Anti-Vivisection and the Profession of Medicine in Britain. A Social History, The Palgrave Macmillan Animal Ethics Series, London: Palgrave Macmillan; 2017.

Holder T - Standing up for science: The antivivisection movement and how to stand up to it – *EMBO rep*, 2014, 15: 625-630

Marks J - Animal Abolitionism Meets Moral Abolitionism. Cutting the Gordian Knot of Applied Ethics - *Bioethical Inquiry*, DOI 10.1007/s11673-013-9482-3 Published online 04.10.2013

Nășcuțiu A-M – „De la șoarece la om”, comunicare în cadrul Simpozionului “Bioetica în experimentarea pe animale”, INCDMM Cantacuzino, 14.10.2022.

<http://www.ansvsa.ro>

Finanțare: ”Dezvoltarea biobăncii INCDMM Cantacuzino în scopul asigurării unui management performant al materialului biologic disponibil pentru cercetarea biomedicală (ResB-Bank)”, proiect finanțat prin PSCD al MAPN.

Despre vorbitor:

Dr. Alexandra-Maria Nășcuțiu, medic specialist medicină de laborator și microbiologie medicală, doctor în medicină, CS III, Președinte al Comisiei de etică și deontologie profesională a INCDMM Cantacuzino.

**ANIMAL TESTING: TRUE FACTS AND THEIR
INTERPRETATION**

Alexandra-Maria Nășcuțiu

“Cantacuzino” National Institute of Medical Military Research and
Development, Biobank

“Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest

nascutiu.alexandra@cantacuzino.ro; alexandra.nascutiu@umfcd.ro

Key words: animal testing, controversies, disinformation, etical aspects

Abstract :

Definitely one of the most debated medical research topics, animal testing has been subject to several problems of morality and ethics in the past three centuries. Fiercely contested between those pro-testing and those against testing swunged between well-documented (scientific) arguments and fake information. The game was always played between the power of argumentation, the power of counter-argumentation and the power of disinformation. Media

overspeculation and exaggerations, in both directions, impeded constructive solutions.

Cropping information, taking it out of its context and omissions in relating facts are the most frequent verbal weapons of the militants for the banning of animal use in the laboratories. To these, threats and incitement to acts of extremism are being added. In response, the scientific world should focus on introducing another 3R system - *responsibility, rethinking, redimensioning* - in order to pursue its activity at standards imposed by research ethics, in view of achieving progress in the medical field.

This presentation - that aims to bring an objective approach – captures some of the vulnerable issues of animal testing.

Selective bibliography:

Atalić B - Historical development and ethical considerations of vivisectionist and antivivisectionist movement – *JAHR*, 2012; 3(6): 399-414

Bailey J, Balls M – Clinical Impact of high-profile animal-based research reported in the UK national press - *BMJ Open Science* 2020;4:e100039. doi:10.1136/bmjos-2019-100039

Bates A.W.H. - *Anti-Vivisection and the Profession of Medicine in Britain. A Social History*, The Palgrave Macmillan Animal Ethics Series, London: Palgrave Macmillan; 2017.

Holder T - Standing up for science: The antivivisection movement and how to stand up to it – *EMBO rep*, 2014, 15: 625-630

Marks J - Animal Abolitionism Meets Moral Abolitionism. Cutting the Gordian Knot of Applied Ethics - *Bioethical Inquiry*, DOI 10.1007/s11673-013-9482-3 Published online 04.10.2013

Născuțiu A-M – „De la șoarece la om”, comunicare în cadrul **Simpozionului “Bioetica în experimentarea pe animale”, INCDMM Cantacuzino, 14.10.2022.**

<http://www.ansvs.ro>

Funding: "Development of the INCDMM Cantacuzino biobank in order to ensure a high-performance management of the biological

material available for biomedical research (ResB-Bank)", project financed by the PSCD of MAPN.

About the speaker: Dr. Alexandra-Maria Născutiu, specialist in laboratory medicine and medical microbiology, doctor of medicine, CS III, President of the Ethics and Professional Deontology Commission of INCDMM Cantacuzino.

CERCETAREA PE ANIMALE SALVEAZĂ VIETI

Gheorghia ISVORANU

INCD „Victor Babeș”, București, România,

gina.isvoranu@ivb.ro

Cuvinte cheie: cercetarea pe animale

Rezumat

Cercetarea pe animale a contribuit la multe progrese medicale care îmbunătățesc sănătatea oamenilor, cât și a animalelor, iar rolul animalelor de laborator continua să fie crucial în înțelegerea proceselor fundamentale ale vieții și în dezvoltarea de noi tratamente. O mulțime de descoperiri s-au bazat pe cercetarea pe animale, de exemplu descoperirea antibioticelor, anestezicele, transplanturile de organe, insulina, vaccinurile și alte numeroase tratamente pentru diferite boli. Herceptin, primul anticorp monoclonal descoperit care blochează o proteină care induce cancer, a fost dezvoltat și testat pe șoareci și salvează viața a numeroase femei cu cancer de sân, fiind de asemenea eficient și la pacienții cu cancer gastric HER2-pozitiv. Vaccinul împotriva meningitei, vaccinul împotriva poliomielitei, doar câteva exemple, au salvat milioane de vieți. Pentru a dobândi toate aceste cunoștințe, animalele chiar suferă și din acest motiv bunăstarea animalelor de laborator este foarte importantă. Animalele sunt îngrijite

corespunzător de personal bine pregătit și supravegheate de medici veterinari nu numai pentru binele lor, dar și pentru a obține cele mai bune rezultate din cercetare. Nu numai publicul larg, dar și oamenii de știință sunt îngrijorați de suferința animalelor utilizate în proceduri și încearcă să găsească modalități de a reduce testarea pe animale și de a descoperi alternative fezabile pentru a le înlocui. Într-adevăr, nu toate cercetările științifice dau rezultate remarcabile, iar activiștii pentru drepturile animalelor au dreptate când susțin că cercetarea pe animale nu poate fi întotdeauna translatată la oameni. Este posibil ca unele studii să nu aibă un impact imediat asupra progresului medical, dar pot oferi informații neprețuite pentru cercetarea fundamentală. Aproximativ 85% dintre premiile Nobel pentru medicină sau fiziologie au implicat utilizarea animalelor de laborator. În plus, cercetarea veterinară se bazează de asemenea pe cercetarea pe animale. În viitor, cu tot efortul de a găsi noi metode alternative la cercetarea pe animale, vor exista domenii de cercetare fundamentală sau comportamentală care s-ar putea să nu fie complet înlocuite. Deși este o dilemă etică dificilă, cercetarea pe animale este încă indispensabilă pentru cercetarea fundamentală, medicina umană și veterinară și necesară dacă dorim să salvăm vieți.

Finanțare. Această lucrare a fost parțial susținută de MCID, prin intermediul proiectelor PN 23.16.02.02 și 31PFE/2021.

Gheorghița Isvoranu, Doctor în Biologie, CSIII, Șef de laborator Biobază INCĐ Victor Babeș.

ANIMAL RESEARCH SAVES LIVES

Gheorghita ISVORANU

„Victor Babeş” National Institute of Pathology, Bucharest, Romania,

gina.isvoranu@ivb.ro

Key words: animal research

Abstract

Animal research has contributed to many medical advances that improve the health of both humans and animals and the role of laboratory animals continue to be crucial in understanding the fundamental processes of life and in developing new treatments. A lot of breakthroughs were relied on animal research, such as antibiotics, anaesthetics, organ transplants, insulin, vaccines, and other numerous treatments for various diseases. Herceptin, the first monoclonal antibody that blocks a cancer-causing protein, was developed and tested in mice and saves the life of many women with breast cancer, being also effective in patients with HER2-positive gastric cancer. The meningitis vaccine, the polio vaccine, only a few examples, saved millions of lives. To gain all this knowledge, animals do suffer and for this reason the welfare of laboratory animals is very important. Animals are properly cared for by well-trained staff and overseen by veterinarians not only for their own good, but also to get the best results from the research. Not only the people, but also scientists are concerned about the suffering of animals used in the procedures and try to find ways to reduce animal tests and discover feasible

alternatives to replace them. Indeed, not all scientific research yields remarkable results and animal rights activists are right when claim that the outcomes from animal research cannot always be applied to humans. Some studies may not have an immediate impact on medical progress, but they can provide invaluable information for fundamental research. Around 85% of the Nobel prizes in medicine or physiology have involved the use of laboratory animals. Furthermore, the veterinary research is also based on animal research. In the future, with all the effort to find new alternative methods to animal research, there will be areas of basic or behavioural research that may never be completely replaced. Although it is a hard ethical dilemma, the animal research is still indispensable for basic research, human and veterinary medicine, and is necessary if we want to save lives.

Funding. This work was partially supported by MRID, through projects nos. PN 23.16.02.02 and 31PFE/2021.

Gheorghita Isvoranu, PhD in Biology, CSIII, Head of Animal Facility, INCD Victor Babeş.

CREDIBILITATEA ȘI VALIDAREA MODELELOR DE ÎNLOCUIRE A ANIMALELOR ÎN CERCETAREA ȘTIINȚIFICĂ

Ioana Cristina ANDRONIE

Universitatea Spiru Haret din București, Facultatea de Medicină
Veterinară

ushmv_andronie.ioana@spiruharet.ro

Încă din antichitate, oamenii de știință au folosit diferite specii de animale în studiile lor și aproape tot de atunci există și împotrivirea față de uciderea și rănirea animalelor în numele științei.

Chiar dacă astăzi este încă necesară folosirea animalelor în cercetarea științifică, este la fel de necesară și importantă cunoașterea de către societate a celor mai recente evoluții și inovații medicale fără utilizarea animalelor, verificate și validate din punct de vedere științific. Pașii mari făcuți în ultimii zeci de ani în domeniul cercetării pentru a găsi și utiliza alternative la folosirea animalelor, trebuie să fie știuți și recunoscuți de noi toți. Astăzi, existența colaborărilor strânse între organizații guvernamentale, mediul academic și sectorul privat sunt concretizate prin programe inovatoare fără utilizarea animalelor, ce contribuie la accelerarea tranziției către tehnologiile fără animale. Printre metodele de ultimă generație care nu folosesc animale în cercetarea științifică, sunt modele derivate din celule stem care înlocuiesc testarea pe

animale privind toxicitatea și eficacitatea medicamentelor noi, testele sofisticate care utilizează celule și tesuturi umane (metode in vitro), tehnicile avansate de modelare pe computer (modele in silico) și studiile cu voluntari umani folosite în evaluarea siguranței medicamentelor, a substanțelor chimice, cosmeticelor, etc..

Și cu toate acestea, va mai dura încă mult timp până când animalele vor putea fi înlocuite complet în cercetarea științifică. Dar oare putem ști câți ani ?

Cuvinte cheie: animale de laborator, cercetarea științifică, Înlocuirea, principiile celor 3R.

Ioana Cristina ANDRONIE este conferențiar universitar la Universitatea Spiru Haret din București, Facultatea de Medicină Veterinară, cadru didactic la disciplina de „Igiena și bunăstarea animalelor”, dar mai predă și disciplinele de „Istoria medicinei veterinare” și „etică și integritate academică”. Membru fondator a platformei „One Health”.

CREDIBILITY AND VALIDATION OF ANIMAL REPLACEMENT MODELS IN SCIENTIFIC RESEARCH

Ioana Cristina ANDRONIE

Spiru Haret University Bucharest, Faculty of Veterinary Medicine

ushmv_andronie.ioana@spiruharet.ro

Since ancient times, scientists have used different species of animals in their studies, and almost ever since then there has been opposition to killing and harming animals in the name of science. Even though the use of animals in scientific

research is still necessary today, it is equally necessary and important for society to know about the latest medical developments and innovations without the use of animals, scientifically verified and validated. In the last decades, the big steps made in the field of research to find and use alternatives to the use of animals must be known and recognized by all of us. Today, the existence of close collaborations between government organizations, academia and the private sector are materialized by innovative animal-free programs, helping to accelerate the transition to animal-free technologies. Among the latest methods that do not use animals in scientific research are stem cell-derived models that replace animal testing for the toxicity and efficacy of new drugs, sophisticated tests using human cells and tissues (in vitro methods), advanced modeling techniques on computer (in silico models) and studies with human volunteers are used in the safety evaluation of drugs, chemicals, cosmetics, etc. However, it will be a long time before animals can be completely replaced in scientific research. But can we know how long?

Key words: laboratory animals, scientific research, Replacement, 3R principles.

Bibliografie/References

1. Patrick Bédard, Sara Gauvin, Karel Ferland, Christophe Caneparo, Ève Pellerin , Stéphane Chabaud and Stéphane Bolduc, Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing, *Bioengineering* 2020, 7(3), 115; <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030115>

2. Sonali K. Doke, Shashikant C. Dhawale, Alternatives to animal testing: A review, Saudi Pharmaceutical Journal (2015) 23, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
3. Murata Y, Neuhoﬀ S, Rostami-Hodjegan A, Takita H, Al-Majdoub ZM, Ogungbenro K. In Vitro to In Vivo Extrapolation Linked to Physiologically Based Pharmacokinetic Models for Assessing the Brain Drug Disposition. AAPS J. 2022 Jan 13;24(1):28. doi: 10.1208/s12248-021-00675-w. PMID: 35028763; PMCID: PMC8817058.
4. Nuwer R. US agency seeks to phase out animal testing. Nature. 2022 Nov 4. doi: 10.1038/d41586-022-03569-9. Epub ahead of print. PMID: 36333602.
5. <https://www.nc3rs.org.uk/who-we-are/3rs>
6. <https://nc3rs.org.uk/events/not-just-another-nams-meeting-nams-aspiration-implementation>
7. <https://www.nc3rs.org.uk/our-portfolio/refinement-rodent-and-non-rodent-housing-during-telemetry-recordings>
8. <https://etransafe.eu/>
9. <https://www.nc3rs.org.uk/our-portfolio/review-use-two-species-regulatory-toxicology-studies>
10. https://nc3rs.org.uk/news/animal-research-debate-uk-parliament?utm_campaign=February+2024&utm_medium=email&utm_source=govdelivery
11. <https://www.npr.org/2023/01/12/1148529799/fda-animal-testing-pharmaceuticals-drug-development>
12. <https://www.peta.org/issues/animals-used-for-experimentation/alternatives-animal-testing/>
13. <https://narratives.insidehighered.com/utrecht-alternatives-to-lab-animals/index.html>
14. <https://www.euractiv.com/section/health-consumers/news/new-dutch-group-reinforces-efforts-to-replace-animal-testing/>

Ioana Cristina ANDRONIE is a university lecturer at the Spiru Haret University in Bucharest, Faculty of Veterinary Medicine, teaching staff in the discipline of "Hygiene and animal welfare", but also

teaches the disciplines of "History of veterinary medicine" and "Ethics and academic integrity" ". Founding member of the "One Health" platform.

**INTEGRATOR TEHNOLOGII IT PENTRU
CERCETARE OBSERVAȚIONALĂ ÎN MEDICINĂ ȘI
BIOLOGIE
Cătălin PIU**

ALIANTE, România
catalin.piu@aliant.tech

Aliant oferă soluții IT complete pentru cercetare observatională în medicină și biologie. Utilizând hipercomputing, platforme de date ca WEKA, IBM SPSS, Moldeller, AI, RPA și low-code, Aliant ajută organizațiile să:

- Stocazeze, proceseze și gestioneze datele în cloud și on-prem
- Alimenteze sarcinile de lucru de generația următoare
- Obține informații valoroase din datele de cercetare

Obiective:

- Prezentarea Aliant ca integrator de top al tehnologiilor IT pentru cercetare observatională
- Evidențierea beneficiilor utilizării soluțiilor Aliant
- Inspirarea participanților cu privire la potențialul tehnologiei de a transforma cercetarea medicală și biologică

Despre vorbitor:

Cătălin Piu este Sales Lead Sales Lead la Aliant (www.aliant.tech). Are o vastă experiență în domeniul IT, cu o specializare în soluții de date și AI.

ALIAN T: IT TECHNOLOGY INTEGRATOR FOR OBSERVATIONAL RESEARCH IN MEDICINE AND BIOLOGY

Cătălin PIU

ALIAN T, România
catalin.piu@aliant.tech

Summary:

Aliant provides comprehensive IT solutions for observational research in medicine and biology. Leveraging hypercomputing, data platforms such as WEKA, IBM SPSS, Moldeller, AI, RPA, and low-code, Aliant assists organizations in:

- Storing, processing, and managing data in the cloud and on-premises
- Empowering next-generation workloads
- Extracting valuable insights from research data

Objectives:

- Presenting Aliant as a top integrator of IT technologies for observational research
- Highlighting the benefits of utilizing Aliant solutions
- Inspiring participants regarding the potential of technology to transform medical and biological research

About the Speaker:

Catalin Piu is the Sales Lead at Aliant (www.aliant.tech). He has extensive experience in the IT field, specializing in data solutions and AI.

BEHAVIORAL NEUROSCIENCE, DINCOLO DE URMĂRIREA VIDEO CU ETHOVISION XT

Tim PUDIL

Noldus IT, Țările de Jos

Rezumat:

Seminarul susținut de Noldus IT va explica călătoria urmării video prin prisma EthoVision XT: software-ul de urmărire video recunoscut ca cel mai bun instrument pentru neuroștiința comportamentală în cercetarea preclinică la nivel mondial.

Conceptul de bază al tehnologiei va fi acoperit, în continuare cu exemple de caracteristici avansate care implementează AI pentru o mai bună înțelegere a comportamentului.

Discuția va merge dincolo de software-ul de urmărire video pentru a descoperi posibilitățile de automatizare a experimentelor prin combinarea urmării video și a comunicării cu dispozitive hardware care sunt necesare pentru experimentele de neuroștiință comportamentală. Se aplică și experimentelor standard, testelor pe termen lung și cercetării peștilor zebra.

Obiective:

- Conceptul de urmărire video
- Experimentează automatizarea
- AI (învățare profundă) în neuroștiința comportamentală

Bio:

Tom Pudil lucrează pentru Noldus IT ca consultant. A fost instruit ca toxicolog și a lucrat anterior la Charles Rivers Laboratories la integrarea unei soluții furnizate de Noldus IT. Noldus este o companie de software care dă putere cercetătorilor să obțină o nouă perspectivă asupra neuroștiinței comportamentale pentru a îmbunătăți sănătatea și bunăstarea umană.

BEHAVIORAL NEUROSCIENCE, BEYOND VIDEO TRACKING WITH ETHOVISION XT

Tim PUDIL

Noldus IT, Netherlands

Summary:

The seminar by Noldus IT will explain the journey of video tracking through the lens of EthoVision XT: video tracking software acknowledged as the best tool for behavior neuroscience in preclinical research worldwide.

The basic concept of the technology will be covered, following up with examples of advanced features implementing AI for a better understanding of the behavior.

The talk will go beyond video tracking software to uncover the possibilities of experiment automation by combining video tracking and communication with hardware devices that are necessary for behavioral neuroscience experiments. It applies to standard experiments, long-term testing, and zebrafish research as well.

Objectives:

- Concept of video tracking

- Experiment automation
- AI (deep learning) in behavioral neuroscience

Bio:

Tom Pudil works for Noldus IT as a consultant. He was trained as a toxicologist and previously worked at Charles Rivers Laboratories on integrating a solution provided by Noldus IT. Noldus is a software company that empowers researchers to gain new insight into behavioral neuroscience to improve human health and well-being.

30
years

ADVANCING
BEHAVIORAL
RESEARCH
SINCE 1989



Innovative solutions for zebrafish research

*Powerful software tools, fully integrated labs, and expert consultancy.
Trust our 30 years of experience to make your project a success.*

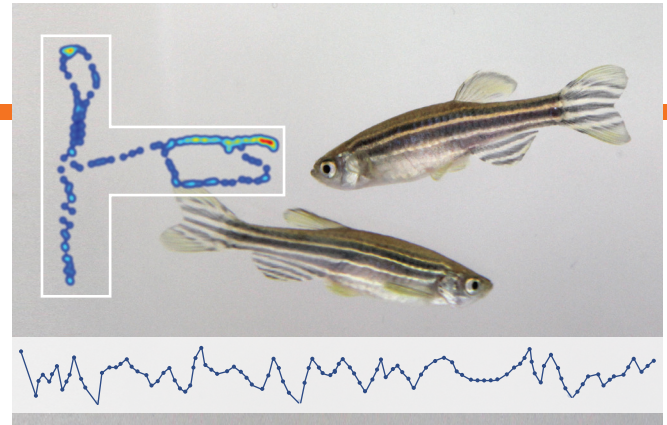
WWW.NOLDUS.COM

Noldus
Information Technology

EthoVision XT

- *Reliable tracking of any animal*
- *Cost-effective & easy-to-use software*
- *High-throughput & high-content testing*
- *Powerful analysis tools for insightful results*

EthoVision® XT is the most flexible and versatile system for highly accurate tracking, activity detection, and analysis of animal movement, activity, and behavior. A special algorithm for zebra-fish, combined with the multiple body points tracking algorithm, provides accurate data on swimming paths and patterns. You can track multiple fish together and automatically measure inter-fish distances (for shoal-density), as well as track in multiple tanks



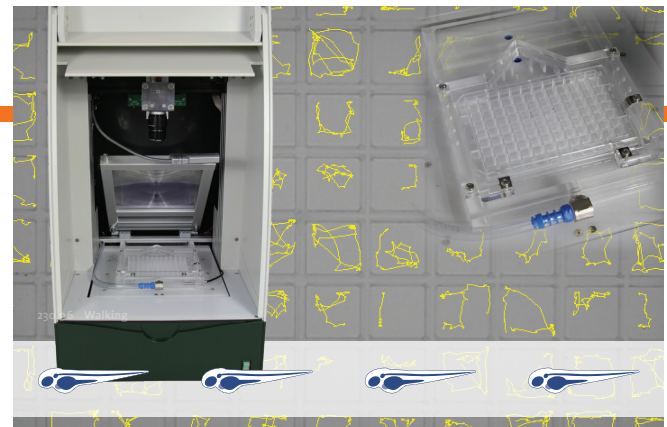
WWW.NOLDUS.COM/ETHOVISION

simultaneously. Because EthoVision XT is not limited to one specific kind of test, you can use it for multiple studies in the lab; from small to large aquaria, from T-maze to well plate, from activity measurements to learning tasks. The ideal tool!

DanioVision

- *Zebrafish larvae activity monitoring*
- *High-throughput research*
- *Controlled plug-and-play environment*
- *Powered by EthoVision XT*

DanioVision™ is a complete system designed for high throughput testing of zebrafish larvae or other small organisms. The Observation Chamber provides a controlled testing environment, with built-in IR backlit well-plate/petri dish/container holder, a high speed digital camera, specialized lens to prevent distortion in the well-plate, and a white light that is programmable in the software. There is also enough room in the cham-



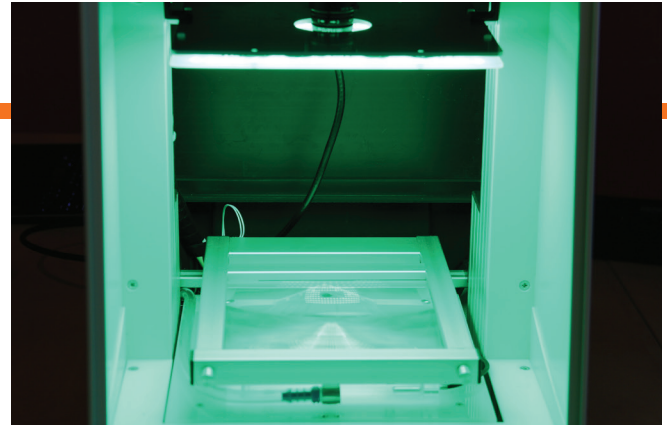
WWW.NOLDUS.COM/DANIOVISION

ber for add-ons such as the Tapping Device, colored/white LED Toplight Unit, Optogenetics equipment, or other custom options. Tracking occurs with a fully functional version of EthoVision XT, which can be used for other tracking experiments as well.

Toplight Unit

- *Add-on for DanioVision Observation Chamber*
- *Stimulus light from above*
- *Two options in one: colored or white LED sides*
- *Programmed and controlled by EthoVision XT*

The Toplight Unit is an add-on component for the DanioVision Observation Chamber. The lights provide illumination above the well-plate or arena, and do not obscure the view of the camera. For multifunctional purposes, one side consists of white LEDs, while the other contains red, green and blue LEDs. Compared to the standard white light included in the Observation Chamber, this Toplight Unit provides a more 'natural' position of light. As



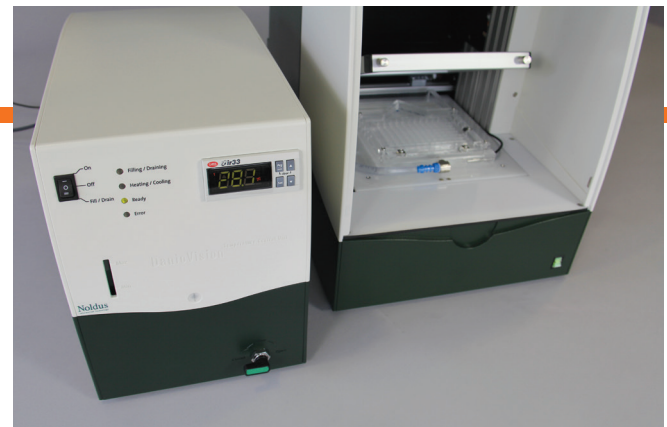
WWW.NOLDUS.COM/DANIOVISION

zebrafish see color and different strains show different color preferences, the Toplight Unit allows you to easily incorporate color stimulation into your experiments. You can pick the colors that best fit the aims of your study and zebrafish strain.

Temperature Control Unit

- *Control temperature of water surrounding the well plate*
- *Easy to install component for DanioVision*
- *Eliminates the need for climatized rooms*
- *Cooling and heating options*

Temperature has a large effect on zebrafish larvae behavior; unless this is the focus of your study, varying temperatures can have a big influence of the validity of your data. The Temperature Control Unit prevents this by controlling the temperature of the water that surrounds the well-plate in the DanioVision Observation Chamber. It is a flow-through system that does not disturb your animals and allows you to either cool or heat the water.



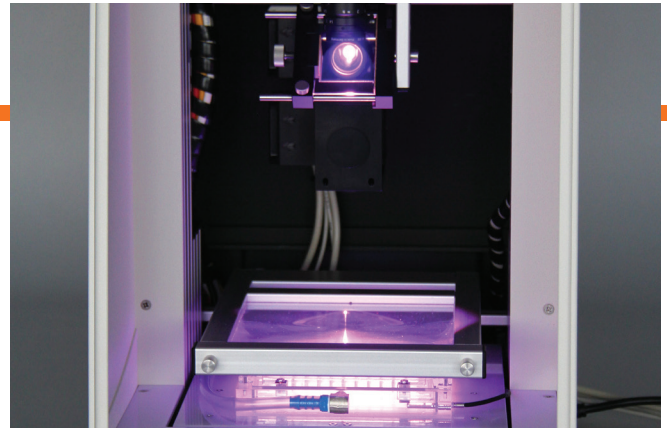
WWW.NOLDUS.COM/DANIOVISION

The unit is compact and can be placed next to the Observation Chamber or on the floor. To hook it up, simply connect two water tubes and two cables, set the desired temperature, and you are good to go!

Optogenetics Add-on

- *Add-on for DanioVision Observation Chamber*
- *Stimulate with two or three wavelengths (LED colors)*
- *Ideal for zebrafish larvae*
- *Programmed and controlled by EthoVision XT*

Because zebrafish larvae are transparent, the application of optogenetic stimulation is even more practical than in rodents, and far less invasive. With the Optogenetics Add-on, researchers can now very easily test the role of specific neurons in zebrafish larvae behavior. The add-on consists of an LED light source (Prizmatix) that can be installed in your DanioVision Observation Chamber. EthoVision XT allows for the control and programming



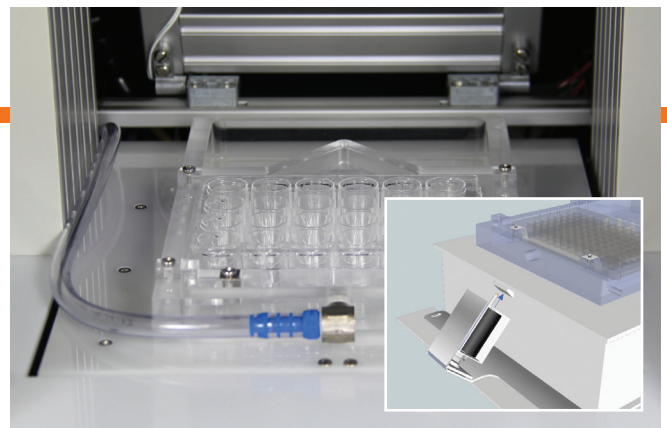
WWW.NOLDUS.COM/DANIOVISION

of the stimulation: you can set user-defined time conditions to trigger the LED light(s). In comparison to manual control, this offers far better temporal precision and adds efficiency to longitudinal studies.

Tapping Device

- *Add-on for DanioVision Observation Chamber*
- *Vibration stimulus to evoke a startle response*
- *Adjustable force and tapping rate*
- *Programmed and controlled by EthoVision XT*

Zebrafish larvae display a robust startle response which can be evoked by light or vibration. A light stimulus is part of the basic DanioVision Observation Chamber; the vibration stimulus can easily be added by installing the Tapping Device at the bottom of basin where your well plate or petri dish is placed. The taps cause vibration in the water and the intensity can be set at any of eight different levels. You can also adjust



WWW.NOLDUS.COM/DANIOVISION

the tapping rate to a maximum of three taps per second. The Tapping Device can be combined with the white light stimulus, and both are controlled via EthoVision XT software (included in the DanioVision system).

Track3D

- *Study swimming behavior in 3 dimensions*
- *Individual calibration for accurate results*
- *EthoVision XT add-on*
- *Accurate and cost-efficient solution*

When interested in the specific swimming patterns of your zebrafish, behavioral assessment in a 2-dimensional plane may be insufficient for your study. Track3D is a video-based system for automated tracking of animals in a 3D space. The 3D trajectory is based on a combination of two 2D tracks recorded by EthoVision XT via two separate high-resolution cameras. Calibration is an essential step in this procedure. To guarantee a highly accurate



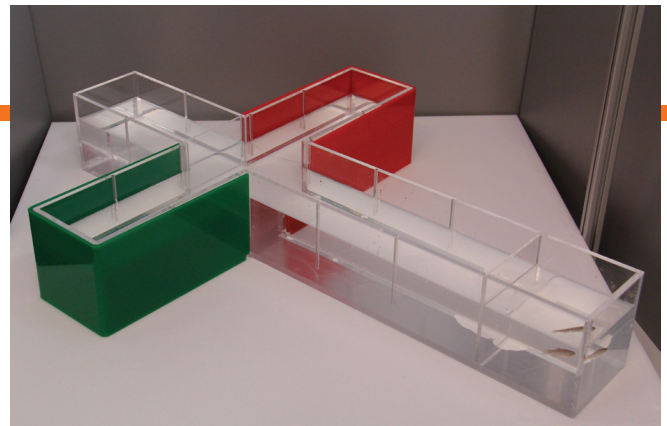
WWW.NOLDUS.COM/TRACK3D

calculation of the 3D trajectory, a custom calibration frame is built for the tank or arena in which your experiments take place. Track3D visualizes the resulting trajectory in a dynamic 3D image and calculates a number of movement-based parameters.

Mazes

- *Specifically designed for zebrafish*
- *Many custom options available*
- *Great for video tracking with EthoVision XT*
- *Package deals available*

Several behavioral paradigms are successfully translated from rodent to adult zebrafish behavioral studies. Examples includes tests for learning and memory, anxiety, and social behavior. Noldus offers several mazes specifically designed for zebrafish. A good example is the multi-purpose zebrafish maze. Shaped like a cross, it can be sectioned off to create different set-ups, including a T-maze, plus maze, and social preference configura-



WWW.NOLDUS.COM/MAZES

tion. Combined with an infrared backlight and an infrared-sensitive camera, it is ideally suited for video tracking with EthoVision XT. If needed, Noldus is also able to create custom configurations for researchers!

The Observer XT

- Describe and score behavior in detail
- Build and share your ethograms
- Collect, integrate, analyze, and manage data
- Share the work and perform reliability analysis

Some studies require a more detailed look at behavior; manual observation is therefore best. This can be a laborious process, and The Observer[®] XT is here to help streamline the process. This user-friendly event logging software helps to collect, analyze, and present your data. It supports the entire workflow of a research project, from ethogram to presentation of the results. You can score live, and even on the go with Pocket Observer on



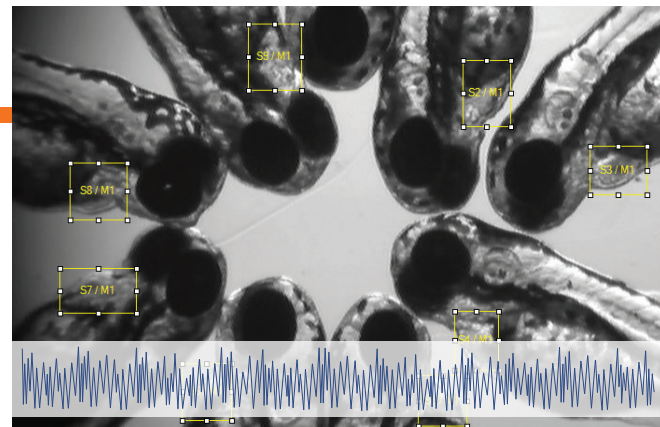
WWW.NOLDUS.COM/OBSERVER-ANIMAL

your smartphone. You can score from a single video, or multiple camera angles at once. Coding can be carried out continuously, or using instantaneous sampling, or a combination. You can also easily share the work with coding licenses.

DanioScope

- Video analysis of zebrafish embryos and larvae
- Easy and cost-effective all-in-one tool
- Non-invasive video based methods
- Activity, cardiology, flow, and morphology

DanioScope™ is a non-invasive and easy to use video-based software tool that allows you to assess and analyze zebrafish embryo and larva parameters. Embryos are automatically detected and their activity (e.g. tail coiling, convulsions) is automatically measured. To measure the heartbeat of all subjects, simply define the heart areas and DanioScope will extract the heartbeat of each one. Blood flow and gut flow activity can be



WWW.NOLDUS.COM/DANIOSCOPE

measured by indicating a circular area of interest, such as the diameter of a vein. Last but not least, still images can be used to monitor morphological parameters such as eye size, body length, malformations, or other user-defined parameters.

EVALUAREA GRADELOR DE SEVERITATE ÎN FUNCTIE DE MODELUL ANIMAL ȘI GRADUL DE SPECIALIZARE A PROCEDURILOR

Cristin COMAN

Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare Medico-Militară
„Cantacuzino,,

comancristin@yahoo.com

Una dintre afirmațiile-cheie din legislația europeană privind bunăstarea animalelor este că „nicio persoană nu poate provoca în mod voit unui animal durere, suferință, vătămare sau frică, sau să-i încalce în alt mod demnitatea” (Council Decision 78/923/EEC).

În domeniul experimentării pe animale, legea prevede, că experimentele pe animale care implică proceduri asupra animalului, proceduri care duc la durere, suferință, vătămare sau frică, afectează în mod semnificativ starea generală a animalului sau încalcă în alt mod demnitatea acestuia trebuie să se limiteze la necesitatea indispensabilă. Ordonanța ANSVSA 97/2015 precizează condițiile de aprobare a experimentelor pe animale. Un experiment pe animale poate fi aprobat doar dacă experimentul este indispensabil, nu a mai fost făcut, nu există metode alternative și dacă ponderea răului produs animalelor în raport cu beneficiile este mai mic.

Pentru fiecare experiment individual pe animale și pentru fiecare intervenție genetică asupra animalelor, gradul de severitate pe care experimentul îl impune animalelor asupra cărora se desfășoară este evaluat calitativ și, pe cât posibil, cantitativ, după criteriile standardizate. Criteriile de clasificare

sunt enumerate în descrierea generală a gradelor de severitate. Temeiul legal pentru aceasta este Legea 43/2014.

În planificarea și desfășurarea experimentelor pe animale, persoanele care efectuează sau dispun efectuarea unor astfel de experimente trebuie să fie răspunzătoare față de ei înșiși și față de autorități pentru magnitudinea durerii, vătămării, fricii și suferinței cauzate animalelor. Acest lucru se aplică și oricăror modificări pe care animalele le suferă ca urmare a intervențiilor genetice. Durerea, vătămarea, anxietatea și suferința provocate animalelor ar trebui să pună la îndoială și să revizuiască modelele animale sau procedurile experimentale noi, existente sau utilizate în mod obișnuit, în vederea perfecționării acestora (reducerea severității).

Gradul de severitate al unui experiment este determinat atunci când este depusă o cerere de aprobare pentru efectuarea de experimente pe animale, adică înainte de începerea experimentului. Experimentului i se atribuie severitatea maximă la care se așteaptă să fie expus un animal din experimentul planificat (severitatea potențială).

După efectuarea experimentului, gradele de severitate pentru animalele individuale sunt înregistrate în funcție de severitatea reală cauzate, ținând cont de eventualele evenimente neprogramate, în raportul intermediar sau final sau în evaluarea retrospectivă. Atunci când se atribuie un grad de severitate unui experiment pe animale înainte de a începe, severitatea maximă așteptată este determinată de grupul care suferă cele mai severe proceduri.

Clasificarea severității unui experiment pe animale înainte de a începe experimentul se face cu ipoteza că experimentul va fi condus în mod optim. Factorii de risc trebuie să fie luați în considerare pentru a decide dacă experimentele nu se clasifică sau se clasifică în gradul de severitate superficial, moderat sau sever. Orice procedură care este în sine nedureroasă, dar dificil de efectuat fără greșală, este clasificată ca și grad de severitate

superficial dacă aceasta prospectiv duce la un grad scăzut de severitate. Intervențiile care provoacă durere trebuie efectuate numai cu ameliorarea durerii. Trebuie demonstrată necesitatea științifică de a utiliza grupuri de control fără terapie pentru durere sau pentru a renunța complet la terapia durerii la toate animalele. Ameliorarea durerii trebuie făcută în conformitate cu cele mai recente descoperiri. Efectul tratamentului durerii trebuie monitorizat continuu și îmbunătățit dacă este necesar. Administrarea de analgezice mai puțin puternice trebuie justificată. Renunțarea parțială sau completă la tratamentul durerii conduce la un grad de severitate mai mare. Anxietatea și stresul cauzate animalelor trebuie reduse la minimum prin măsuri adecvate. Modificările genetice trebuie de asemenea luate în considerare la determinarea clasificării gradului de severitate și pot avea ca rezultat un grad de severitate mai mare.

Criteriile de clasificare enumerate în Legea 43/2014 sunt folosite pentru a diferenția între categoriile de severitate. Gradul real de severitate poate fi însă, influențat de câțiva alți factori, cum ar fi:

- punctul final al experimentului (criteriile de finalizare)
- modificările genetice
- caracterul invaziv al procedurilor și intervențiilor
- calitatea terapiei durerii
- dozele aplicate
- de câte ori se repetă procedurile
- durata experimentului

Dacă animalul suferă manipulări repetate în timpul experimentului, la atribuirea gradului de severitate trebuie luat în considerare cumularea severității. Gradul de severitate nu este crescut dacă animalul este în mare măsură capabil să se recupereze între manipulări repetate.

Prezentarea oferă exemple pentru evaluarea atentă a severității experimentelor pe animale și a modificărilor genetice asupra

animalelor, pentru a permite clasificarea corectă a experimentelor pe animale în categorii de severitate. De asemenea, urmărește să promoveze eforturile de a găsi modele animale și proceduri experimentale mai puțin severe și, astfel, să sprijine implementarea principiilor 3R pe termen lung.

Cristin Coman este CS I, medic veterinar în cadrul Platformei de Medicină Experimentală și Cercetare Translațională, Centrul de Cercetare-Dezvoltare Tehnologică a Institutului de Cercetare dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”. Specialist în știința animalelor de laborator. Președinte al Comitetului Național pentru protecția animalelor de laborator.

EVALUATION OF DEGREES OF SEVERITY DEPENDING ON THE ANIMAL MODEL AND THE DEGREE OF SPECIALIZATION OF THE PROCEDURES

Cristin COMAN

"Cantacuzino" National Medical-Military Development Research
Institute
comancristin@yahoo.com

One of the key statements in European animal welfare legislation is that "no person may intentionally cause an animal pain, suffering, injury or fear, or otherwise violate its dignity" (Council Decision 78/923/EEC).

In the field of animal experimentation, the law provides that animal experiments involving procedures on the animal, procedures that lead to pain, suffering, injury or fear, significantly affect the general condition of the animal or

otherwise violate its dignity must be limited to the indispensable necessity. ANSVSA Ordinance 97/2015 specifies the conditions for approving experiments on animals. An experiment on animals can only be approved if the experiment is indispensable, has not been done before, there are no alternative methods and if the weight of the harm caused to the animals in relation to the benefits is lower.

For each individual animal experiment and for each genetic intervention on animals, the degree of severity that the experiment imposes on the animals on which it is performed is assessed qualitatively and, as far as possible, quantitatively, according to standardized criteria. The classification criteria are listed in the general description of the degrees of severity. The legal basis for this is Law 43/2014.

In planning and carrying out experiments on animals, persons who carry out or have such experiments carried out must be responsible to themselves and to the authorities for the magnitude of the pain, injury, fear and suffering caused to the animals. This also applies to any changes that animals undergo as a result of genetic interventions. Pain, injury, anxiety and suffering to animals should question and revise new, existing or commonly used animal models or experimental procedures with a view to their refinement (reduction in severity).

The degree of severity of an experiment is determined when an application for approval to conduct experiments on animals is submitted, that is, before the experiment begins. The experiment is assigned the maximum severity to which an animal in the planned experiment is expected to be exposed (potential severity).

After the experiment is performed, the severity grades for individual animals are recorded according to the actual severity caused, taking into account any unscheduled events, in the interim or final report or in the retrospective evaluation. When assigning a degree of severity to an animal experiment before it begins, the maximum expected severity is determined by the group undergoing the most severe procedures.

Grading the severity of an animal experiment before the experiment begins is done on the assumption that the experiment will be conducted optimally. Risk factors must be taken into account in deciding whether to classify experiments as non-severe or as superficial, moderate, or severe. Any procedure that is in itself painless but difficult to perform without error is classified as superficial if it prospectively leads to a low severity. Interventions that cause pain should be performed only with pain relief. The scientific need to use control groups without pain therapy or to completely withhold pain therapy in all animals must be demonstrated. Pain relief should be done according to the latest findings. The effect of pain treatment should be continuously monitored and improved if necessary. Administration of less potent analgesics must be justified. Partial or complete withdrawal of pain treatment leads to a greater degree of severity. The anxiety and stress caused to the animals must be minimized by appropriate measures. Genetic changes must also be taken into account when determining the severity classification and may result in greater severity.

The classification criteria listed in Law 43/2014 are used to differentiate between severity categories. The actual degree of

severity may, however, be influenced by several other factors, such as:

- the end point of the experiment (the completion criteria)
- genetic changes
- the invasive nature of the procedures and interventions
- the quality of pain therapy
- the doses applied
- how many times the procedures are repeated
- the duration of the experiment

If the animal undergoes repeated handling during the experiment, cumulative severity should be taken into account when assigning severity. Severity is not increased if the animal is largely able to recover between repeated handlings.

The presentation provides examples for careful assessment of the severity of animal experiments and genetics modifications on animals, to allow the correct classification of animal experiments into categories of severity. It also aims to promote efforts to find animal models and less severe experimental procedures and thus support the implementation of the 3R principles in the long term.

Cristin Coman is CS I, veterinarian within the Experimental Medicine and Translational Research Platform, the Technological Research-Development Center of the Cantacuzino Medical-Military Research Institute. Specialist in Laboratory Animal Science. President of the National Committee for the Protection of Laboratory Animals.

AGRESIVITATEA LA ȘOARECII MASCULI UTILIZAȚI ÎN EXPERIMENTE. EXISTĂ SOLUȚII?

Fabiola IONIȚĂ

Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară
„Cantacuzino”
ionitafabiola02@gmail.com

Cuvinte cheie: șoareci, masculi, agresivitate, bunăstare

Șoarecele este cel mai frecvent model animal utilizat în cercetarea biomedicală, atât datorită asemănărilor genetice și fiziologice cu omul, cât și pentru întreținerea facilă, ciclul scurt de viață și succesiunea rapidă a generațiilor. Șoarecii sunt animale sociale, de aceea adăpostirea în grupuri este esențială pentru menținerea bunăstării acestora. Totuși, agresivitatea din grupurile de șoareci masculi este o problemă frecvent semnalată în crescătorii și laboratoare de cercetare. Luptele dintre masculi pot provoca durere, stres, răni severe și uneori chiar moarte, cu creșterea numărului de animale utilizate și efecte negative asupra rezultatelor experimentale. Izolarea și adăpostirea individuală a masculilor nu este o soluție acceptată pe termen lung, întrucât stresul social afectează bunăstarea animalelor și poate compromite validitatea științifică a studiilor. Pentru a reduce la minimum acest fenomen, există o serie de protocoale generale recomandate: formarea loturilor de masculi la momentul înțărării, cazarea unui număr redus de animale în același spațiu, utilizarea materialelor de îmbogățire sau adăugarea unor separatoare în cutiile de cazare. Identificarea și analiza tuturor factorilor care pot cauza

modificări comportamentale la șoarecii masculi este esențială în vederea selectării celor mai bune strategii de asigurare a bunăstării acestora.

Bibliografie:

1. Weber, E. M., Dallaire, J. A., Gaskill, B. N., Pritchett-Corning, K. R., & Garner, J. P. (2017). Aggression in group-housed laboratory mice: why can't we solve the problem?. *Lab animal*, 46(4), 157–161.
2. Rettich, A., Käsermann, H. P., Pelczar, P., Bürki, K., & Arras, M. (2006). *The Physiological and Behavioral Impact of Sensory Contact Among Unfamiliar Adult Mice in the Laboratory*. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 9(4), 277–288.
3. Tallent, B. R., Law, L. M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2018). Partial cage division significantly reduces aggressive behavior in male laboratory mice. *Laboratory animals*, 52(4), 384–393.
4. Kappel, S., Hawkins, P., & Mendl, M. (2017). *To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice*. *Animals*, 7(12), 88. doi:10.3390/ani7120088.
5. Hohlbaum K, Frahm S, Rex A, Palme R, Thöne-Reineke C, Ullmann K. Social enrichment by separated pair housing of male C57BL/6Jrj mice. *Sci Rep*. 2020 Jul 7;10(1):11165.
6. Theil, J.H., Ahloy-Dallaire, J., Weber, E.M. *et al*. The epidemiology of fighting in group-housed laboratory mice. *Sci Rep* 10, 16649 (2020).
7. Mertens, S., Gass, P., Palme, R., Hiebl, B., & Chourbaji, S. (2020). *Effect of a partial cage dividing enrichment on aggression-associated parameters in group-housed male C57BL/6NCrl mice*. *Applied Animal Behaviour Science*, 104939.

Ionița Fabiola - absolventă a Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București, Facultatea de Medicină Veterinară, promoția 2010; 2010-2019 - Medic veterinar clinician; 2020-2022 - Asistent de cercetare științifică INCDMM „Cantacuzino”. 2022-prezent - Medic veterinar în cadrul Unității de Testare Preclinică, INCDMM „Cantacuzino”- Stațiunea Băneasa.

Competențe în experimentarea pe modele animale și bunăstarea animalelor de laborator.

AGGRESSIVITY IN MALE MICE USED IN EXPERIMENTS. ARE THERE ANY SOLUTIONS?

Fabiola IONIȚĂ

Cantacuzino National Military Medical Institute for Research and
Development

ionitafabiola02@gmail.com

Keywords: mice, males, aggression, welfare

Abstract

The mouse is the most common animal model used in biomedical research, due to both its genetic and physiological similarities to humans, as well as its easy maintenance, short life cycle, and rapid succession of generations. Mice are social animals, so housing them in groups is essential for their welfare. However, aggression in groups of male mice is a common problem reported in breeding and research laboratories. Fighting between males can cause pain, stress, severe injuries and sometimes even death, increasing the number of animals used and having negative effects on experimental results. Isolation and individual housing of males is not an accepted long-term solution, as social stress affects animal welfare and can compromise the scientific validity of studies. To minimize this phenomenon, there are a number of general recommended protocols: forming groups of males at weaning, housing a small number of animals in the same space, using enrichment materials or adding dividers to the housing cages. Identifying and analyzing all factors that can cause behavioral changes in male mice is essential in selecting the best strategies to ensure their welfare.

References:

1. Weber, E. M., Dallaire, J. A., Gaskill, B. N., Pritchett-Corning, K. R., & Garner, J. P. (2017). Aggression in group-housed laboratory mice: why can't we solve the problem?. *Lab animal*, 46(4), 157–161.
2. Rettich, A., Käsermann, H. P., Pelczar, P., Bürki, K., & Arras, M. (2006). The Physiological and Behavioral Impact of Sensory Contact Among Unfamiliar Adult Mice in the Laboratory. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 9(4), 277–288.
3. Tallent, B. R., Law, L. M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2018). Partial cage division significantly reduces aggressive behavior in male laboratory mice. *Laboratory animals*, 52(4), 384–393.
4. Kappel, S., Hawkins, P., & Mendl, M. (2017). To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice. *Animals*, 7(12), 88. doi:10.3390/ani7120088.
5. Hohlbaum K, Frahm S, Rex A, Palme R, Thöne-Reineke C, Ullmann K. Social enrichment by separated pair housing of male C57BL/6JRj mice. *Sci Rep*. 2020 Jul 7;10(1):11165.
6. Theil, J.H., Ahloy-Dallaire, J., Weber, E.M. et al. The epidemiology of fighting in group-housed laboratory mice. *Sci Rep* 10, 16649 (2020).
7. Mertens, S., Gass, P., Palme, R., Hiebl, B., & Chourbaji, S. (2020). Effect of a partial cage dividing enrichment on aggression-associated parameters in group-housed male C57BL/6NCrl mice. *Applied Animal Behaviour Science*, 104939.

Ioniță Fabiola - graduate of the University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine Bucharest, Faculty of Veterinary Medicine, class of 2010; 2010-2019 - Clinical veterinarian; 2020-2022 - Scientific Research Assistant INCDMM "Cantacuzino". 2022-present - Veterinarian in the Preclinical Testing Unit, INCDMM "Cantacuzino" - Băneasa Animal Facility.

Competence in animal model experimentation and laboratory animal welfare

EDUCAȚIA SI INSTRUIREA ÎN ȘTIINȚA ANIMALELOR DE LABORATOR – ACTUALITĂȚI ȘI PERSPECTIVE

Bogdan SEVASTRE

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-
Napoca, Calea Mănăștur 3-5 400372, Cluj-Napoca ROMANIA
E-mail: bogdan.sevastre@usamvcluj.ro

Cuvinte cheie: educație, instruire, animale de laborator; 3Rs

Conform Directivei 2010/63/UE, personalul trebuie să fie educat și instruit corespunzător; instruirea include activități și sarcini. Activitățile (art. 23) sunt (a) efectuarea de proceduri asupra animalelor, (b) elaborarea de proceduri și proiecte, (c) îngrijirea animalelor sau (d) uciderea animalelor 1.Sarcinile sunt Responsabil de îngrijire și bunăstare (Art. 24); Medic veterinar desemnat (Art.25) și Evaluarea proiectelor (art.38). Formarea se bazează pe o structură modulară 2, respectiv module obligatorii pentru toate funcțiile (Art. 23); module necesare numai pentru funcții specifice; și module suplimentare pentru competențe specializate sau învățare pe tot parcursul vieții. De fapt, cursurile LAS includ Modul de bază (obligatorii pentru toate activitățile); Module dedicate unor activități specifice, Module dedicate unei sarcini specifice și Modul național. Modulele specifice (Activități și Sarcini) sunt diferite în funcție de specie 2. Acest concept de instruire modulară evită predarea de informații irelevante, dar și de repetare a informațiilor deja cunoscute, personalul poate urma doar modulele de care are nevoie, iar atunci când sunt necesare cunoștințe și abilități suplimentare, poate urma doar modulele adiționale. Comisia Europeană promovează o înțelegere comună a prevederilor cuprinse în directivă, inclusiv educația

și formarea (E&T), pentru a răspunde nevoii de armonizare și a unui cadru comun care să asigure competența și să faciliteze libera circulație a personalului, în țările UE 2. E&T este una dintre principalele misiuni ale FELASA, prin Schema de Acreditare E&T, are ca scop nu numai asigurarea competenței profesionale, ci și mobilitatea cercetătorului. În prezent există 43 de cursuri acreditate FELASA, în 13 țări UE și 3 țări non-UE. Cele mai multe dintre ele sunt specifice activității, dar unele sunt specifice sarcinii, concentrându-se în general pe șoareci și șobolani. Recunoașterea reciprocă a E&T este un obiectiv central al ETPLAS, site-ul ETPLAS a fost extins de-a lungul timpului cu contribuția a două granturi finanțate de Parlamentul UE, între 2019-2021 și 2021-2023. Până acum, site-ul ETPLAS găzduiește 7 cursuri online care acoperă domeniul „Proiectarea procedurilor și proiectelor 1 și 2”; „Cadrul de evaluare a severității”, „Evaluarea proiectului”, „Căutarea alternativelor (existente) non-animale”, „Dezvoltarea de metode și abordări in vitro pentru utilizare științifică și de reglementare”; și „Analiza critică ale studiilor pe animale”. Site-ul web conține modele de protocoale DOPS (Directly Observed Practical Skills) pentru protocoalele SOP (Standard Operating Procedure) și link-uri către site-uri web educaționale valoroase precum 3Ranker, Norecopa, site-ul web NC3Rs etc. ETPLAS oferă, de asemenea, o listă cuprinzătoare a cursurilor de profil, în Europa 4. În România, E&T în se desfășoară în cadrul programelor de formare profesională organizate de furnizorii de formare profesională, și respectiv în cadrul programelor postuniversitare furnizate de instituții de învățământ superior acreditate. Curricula este reglementată și include Modul de bază, Modulele specifice activităților și Modulele suplimentare 5,6. Până în prezent, există relativ puține programe de formare și niciunul dintre ele nu este certificat la nivel internațional, sistemul de pregătire fiind într-un stadiu preliminar.

Bibliografie

1 Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice

2 Comisia Europeană, Direcția Generală Mediu, Îngrijirea animalelor în scopul unei științe mai bune – Directiva 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice – Cadrul de educație și formare, Oficiul pentru Publicații, 2018

3 <https://felasa.eu/education-training>

4 <https://etplas.eu/>

5 Legea nr. 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice L 96/2015; L 199/2018; L 149/2019.

6 Ordinul nr. 32/2021 pentru aprobarea Normelor metodologice privind cerințele minime referitoare la educația și pregătirea profesională și cerințele pentru obținerea, menținerea și demonstrarea competenței necesare pentru desfășurarea activității în domeniul creșterii, furnizării și utilizării animalelor în scopuri științifice

Bogdan Sevastre (cv scurt) (ro)

Bogdan Sevastre (Dr. Medic Primar Veterinar) (50 de ani), este profesor și conducător de doctorat la USAVM Cluj, România; Facultatea de Medicină Veterinară.

Educație și pregătire: Diploma de DMV în 1998, și și-a susținut teza de doctorat în domeniul oncologiei veterinare în 2007, iar teza de abilitare în 2020 la USAMV Cluj-Napoca.

Expertiza profesională acoperă domeniul diagnosticului de laborator, patologia experimentală și știința animalelor de laborator.

Membri al

Consiliul de Acreditare FELASA pentru Educație și Formare

Comitetul Național pentru Protecția Animalelor Utilizate în Scopuri Științifice al ANSVSA

Boardul ETPLAS (Education and Training Platform of Laboratory Animals Science)

Comitetul Științific al Congresului FELASA 2022.

Comitetul de Management în Programul COST IMPROVE

GRANT UE (2021-2023) N.º 09.200200.A092004/ 2021/ 864077/
SUB/ENV.B.2 Grant finanțat de Parlamentul UE – „Promovarea
alternativelor la testarea pe animale

EDUCATION & TRAINING IN LABORATORY ANIMAL SCIENCE – UPDATES AND PERSPECTIVES

Bogdan SEVASTRE

University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj
Napoca, 3-5 Manastur Street 400372, Cluj-Napoca, ROMANIA
E-mail: bogdan.sevastre@usamvcluj.ro

Key words: education, training, laboratory animals; 3Rs

According to Directive 2010/63/EU the staff shall be adequately educated and trained; the training includes functions and tasks. The functions (Art. 23) are (a) carrying out procedures on animals, (b) designing procedures and projects, (c) taking care of animals, or (d) killing animals 1. In addition, the tasks are those for the responsible for care and welfare (Art. 24); designated veterinarian (Art.25) and project evaluation (art 38). The training should be based on a modular structure 2, including modules compulsory to all functions (Art 23); modules required only for (a) specific function(s); and additional modules for specialized skills or lifelong learning. In fact, the LAS E&T courses include Core modules (compulsory to all functions); Functions specific modules, Tasks specific modules and National module. Functions and Tasks modules are species specific². This modular E&T concept, avoids teaching irrelevant information, or repeating the one already known, the personal may follow only the modules they need, and when additional knowledge and skills are needed, they can follow additional modules only. The EU Commission promote

a common understanding of the provisions contained in the Directive, including the Education & Training (E&T), to respond to a need for harmonization and a common framework to ensure competence and to facilitate free movement of personnel, within the EU countries 2. E&T is one of the main missions of FELASA, by E&T Accreditation Scheme, not only personal competence, but also the researcher's mobility. Nowadays there are 43 FELASA accredited courses, in 13 EU countries and 3 non-EU countries. The most of them are function specific but some are task specific, generally focusing on mice and rats 3. Another important pillar for integration of LAS E&T is represented by ETPLAS, an information portal that enables information sharing and communication between training providers, approval/accrediting bodies, employers and Member-State authorities. Mutual recognition of LAS E&T is a central objective of ETPLAS, the ETPLAS website was expanded over time with the contribution of two EU Parliament-funded grants, between 2019-2021 and 2021-2023. Thus far, ETPLAS website hosts 7 online courses covering area as "Design of procedures and projects 1 and 2"; "The severity assessment framework", "Project evaluation", "Searching for (existing) non-animal alternatives", "Developing in vitro methods and approaches for scientific and regulatory use"; and "Systematic Reviews of Animal Studies". The website contains valuable models of DOPS (Directly Observed Practical Skills) protocols for SOP (Standard Operating Procedure) protocols, and links to valuable educational websites as 3Ranker, Norecopa, NC3Rs website etc. ETPLAS provide also a comprehensive list of 3R and LAS course, within Europe 4. In Romania, the E&T in LAS are organized as training within the professional training programs organized by providers of authorized professional training, respectively within postgraduate programs provided by accredited higher education institutions. The Curricula is

regulated by the law, including Core Module, Functions specific modules, and supplementary modules 5,6. So far, there are relatively few training programs, and none of them certified internationally, thus further development is needed.

References

1 Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes

2 European Commission, Directorate-General for Environment, Caring for animals aiming for better science – Directive 2010/63/EU on protection of animals used for scientific purposes – Education and training framework, Publications Office, 2018, <https://data.europa.eu/doi/10.2779/311480>

3 <https://felasa.eu/education-training>

4 <https://etplas.eu/>

5 Law 43/2014 on the protection of animals used for scientific purposes. L 96/2015; L 199/2018; L 149/2019.

6 Order no. 32/2021 for the approval of the Methodological Norms regarding the minimum requirements regarding education and professional training and the requirements for obtaining, maintaining and demonstrating the competence necessary to carry out the activity in the field of raising, supplying and using animals for scientific purposes.

Bogdan Sevastre (short Cv) (engl)

Bogdan Sevastre (DVM PhD) (50 years old), is Professor and PhD supervisor in UASVM Cluj, Romania; Faculty of Veterinary Medicine.

Education and training: He received DVM diploma in 1998, and defended his PhD thesis in the area of veterinary oncology in 2007, and Habilitation thesis in 2020 at USAMV Cluj-Napoca.

Expertise: His professional expertise covers the area laboratory diagnostic, experimental pathology and laboratory animal science.

He is a member of

FELASA Accreditation Board for Education and Training

National Committee for the Protection of Animals used for Scientific Purposes

Stakeholder Board of Education and Training Platform of Laboratory Animals Science

Scientific Comity of the FELASA Congress 2022.

Management Committee in IMPROVE COST action

Preparatory Action (2021-2023) – EU GRANT N.º 09.200200.A092004/2021/864077/SUB/ENV.B.2 EU

Parliament - funded Grant – “Promoting alternatives to animal testing through accessible and harmonized education and training.

POSTERE

STUDII PRELIMINARE PRIVIND EFECTELE EXTRACTELOR DE *CYNARA SCOLYMUS* L. PE ȘOBOLANI INJECTAȚI CU AMILOID β (A β 1-42)

Sevastre-Berghian Alexandra-C.¹, Ielciu Irina¹, Olah Neli-
Kinga², Barbălată Cristina¹, Tomuța Ioan¹, Toma Ioana¹,
Claudia-Andreea Moldoveanu³, Toma Vlad –A³, Sevastre
Bogdan⁴, Hasas Alina D⁴, Hanganu Daniela¹, Bodoki
Andreea¹, Roman Ioana⁵, Simona Clichici¹, Baldea Ioana¹

¹Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-
Napoca, Romania;

² PlantExtrakt Ltd., Rădaia, Cluj-Napoca, Romania;

³ Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, Romania;

⁴ Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-
Napoca, Romania;

⁵ Institutul de Cercetări Biologice, Cluj-Napoca, Romania;

alexandra_berghian@yahoo.com

Introducere: Studiul nostru și-a propus să evalueze efectele extractelor de *Cynarae folium* (CFE) pe șobolani tratați cu A β 1-42.

Materiale și metode: 42 de șobolani Wistar au fost împărțiți în 6 grupuri (n=7/grup): martor, A β 1-42 (2 μ g/șobolan), A β 1-42 + CGA (acid clorogenic), A β 1-42 + CFE, A β 1-42 + CFL (lipozomi cu *Cynarae folium*), DMSO. În a 15-a zi, o doză de A β 1-42 a fost administrată intracerebroventricular. CGA (60 mg/kg p.c.), CFE, CFL (200 mg/Kg p.c.) au fost administrate oral în primele 14 zile, iar din a 16-a zi, încă 14 zile. Apoi au fost efectuate teste comportamentale. Au fost evaluați markerii

de stres oxidativ cerebral, citokinele inflamatorii, proteina Tau prin ELISA și imunohistochimie.

Rezultate: Analizele chimice ale CFE au evidențiat cantități mari de acid clorogenic și cafeic, precum și de flavonoide (luteolină, luteolin-7-O-glucozidă). Extractul CFE a diminuat peroxidarea lipidelor, neuroinflamația, a modulată expresia proteinelor specifice, a îmbunătățit capacitatea antioxidantă și a îmbunătățit comportamentul de tip alternari triple.

Concluzii: Rezultatele noastre arată că administrarea de CFE ar putea reprezenta o opțiune bună în tulburările neurodegenerative, prin îmbunătățirea apărării antioxidante și diminuarea neuroinflamației.

Acknowledgment: Această lucrare a fost susținută printr-un grant al Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizării, CNCS - UEFISCDI, numărul de proiect PN-III-P1-1.1-TE-2021-0159, în cadrul PNCDI III (TE60/2022).

Alexandra Sevastre – Berghian , 42 ani, Medic Primar Psihiatrie Pediatrică, Șef lucrări la UMF Cluj-Napoca, h-index = 10, 28 lucrări ISI, 1 grant național - director proiect, 1 grant intern - director proiect, 2 proiecte naționale-membru, 1 proiect COST –membru. Domenii de interes: studiul compușilor naturali și nanomaterialelor funcționalizate cu compuși naturali pe modele animale în cercetarea de bază și aplicată din domeniul neuroștiințelor, studii comportamentale pe animale;

PRELIMINARY STUDIES ON THE EFFECTS OF CYNARA SCOLYMUS L. EXTRACTS ON AMYLOID β ($A\beta_{1-42}$) INJECTED RATS

Sevastre-Berghian Alexandra-C.¹, Ielciu Irina¹, Olah Neli-Kinga², Barbălată Cristina¹, Tomuța Ioan¹, Toma Ioana¹,

Claudia-Andreea Moldoveanu³, Toma Vlad –A³, Sevastre Bogdan⁴, Hasas Alina D⁴, Hanganu Daniela¹, Bodoki Andreea¹, Roman Ioana⁵, Simona Clichici¹, Baldea Ioana¹

¹„Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania;

² PlantExtrakt Ltd., Rădaia, Cluj-Napoca, Romania;

³ Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania;

⁴ University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Romania;

⁵ Institute of Biological Research, Cluj-Napoca, Romania;

alexandra_berghian@yahoo.com

Introduction: Our study aimed to evaluate the effects of a *Cynarae folium* extracts (CFE) in the A β ₁₋₄₂-treated rats.

Materials & Methods: 42 Wistar rats were divided into 6 groups (n=7/group): control, A β ₁₋₄₂ (2 μ g/rat), A β ₁₋₄₂ + CGA, A β ₁₋₄₂ + CFE, A β ₁₋₄₂ + CFL, DMSO. On the 15th day, one dose of A β ₁₋₄₂ was intracerebroventricularly administered. CGA (60 mg/kg b.w), CFE, CFL (200 mg/Kg b.w.) were orally administered for the first 14 days, and from the 16th day, for 14 more days. Then behavioral tests were performed. Brain oxidative stress markers and inflammatory cytokines along with Tau protein were analyzed by Elisa and immunohistochemistry.

Results: The CFE chemical analyzes revealed high amounts of chlorogenic and caffeic acid, as well as flavonoid compound (luteolin, luteolin- 7-O-glucoside). CFE extract diminished lipid peroxidation, neuroinflammation, modulated specific protein expression, enhanced the antioxidant capacity and improved the spontaneous alternation behavior.

Conclusion: Our findings indicate that CFE administration might represent a good option in neurodegenerative disorders,

exerting its beneficial effect by increased antioxidant defense and decreased neuroinflammation.

***Acknowledgment:** This work was supported by a grant of the Ministry of Research, Innovation and Digitization, CNCS - UEFISCDI, project number PN-III-P1-1.1-TE-2021-0159, within PNCDI III (TE60/2022)*

Alexandra Sevastre – Berghian , 42 years old, MD, PhD, Pediatric Psychiatrist, UMF Cluj-Napoca, , Lecturer, h-index = 10, 28 ISI papers, 1 national grant - project coordinator, 1 internal grant - project coordinator , 2 national projects-member, 1 COST project –member. **Techniques: the study of natural compounds and nanomaterials functionalized with natural compounds on animal models for basic and applied research in neuroscience, animal behavioral studies.**

LIMITĂRI ALE DEFECTELOR DENTARE LA IEPURE PENTRU TESTAREA MATERIALELOR DE UZ STOMATOLOGIC

Văduva Mariana, Ioniță Fabiola, Tubac Ruxandra, Ancuța
Diana Larisa, Coman Cristin

Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară
„Cantacuzino”

mariana.popescu.93@gmail.com

Cuvinte cheie: defect dentar, incisivi, iepure, materiale stomatologice

Rezumat

Iepurii sunt animale lagomorfe, care, la fel ca și rozătoarele, efectuează înlocuirea țesutului dentar pe tot parcursul vieții. Rata de creștere a dinților este direct proporțională cu anumite condiții de uzură impuse mai ales de dietă și în acest sens, s-a stabilit faptul că iepurii sunt modele adecvate a studia uzura dinților hipselodonți. În acest studiu investigăm uzura incisivilor superiori și inferiori prin crearea de defecte dentare cu scopul de a oferi suport pentru testarea de materiale stomatologice novative.

Am inclus în experiment 2 iepuri New Zealand, masculi, adulți, cu greutate medie de 3000 grame la debut. Sub anestezie generală, cu un amestec de ketamină (25mg/kg) și medetomidină (0.2mg/kg), animalele au fost așezate în decubit ventro-dorsal pe masa de operație. Cu o freză sferică au fost

create cavități cu diametrul de 2mm pe incisivii superiori și inferiori, sub răcire continuă cu soluție salină. Post operator, efectele anestezice au fost reversate prin administrarea de atipamezol (0,5mg/kg). Perioada de monitorizare a fost de 8 săptămâni, timp în care am urmărit evoluția clinică dar mai ales viteza de creștere a dinților pe care am măsurat-o la fiecare 7 zile.

Rezultatele referitoare la incisivii inferiori au arătat o creștere rapidă astfel că la săptămâna 4, defectele au dispărut complet, iar în ceea ce privește incisivii superiori, chiar la finalul săptămânii 8, defectele încă se păstrează.

Prin analiza datelor, recomandăm utilizarea iepurelui ca model pentru studiul materialelor dentare de uz stomatologic întrucât incisivii superiori au o rată de abraziune lentă, care permite evaluarea în timp a efectelor produse de substanțele testate.

Finanțare: Această lucrare a fost susținută prin contract de prestări servicii între UMF București - Facultatea de Medicină Dentară și INCDMM „Cantacuzino”, numărul 3909/2023.

Mariana Văduva – 30 de ani, absoventă a Universității de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București, Facultatea de Medicină Veterinară, promoția 2018. Asistent de cercetare științifică - Medic veterinar la Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino” din anul 2018 – Platforma de Medicină experimentală și cercetare translațională. Competențe în experimentarea pe animalele de laborator.

LIMITATIONS OF DENTAL DEFECTS IN RABBITS FOR THE ASSESSMENT OF DENTAL MATERIALS

Văduva Mariana, Ioniță Fabiola, Tubac Ruxandra,
Ancuța Diana Larisa, Coman Cristin

"Cantacuzino" National Medical-Military Development Research
Institute
mariana.popescu.93@gmail.com

Keywords: dental defect, incisors, rabbit, dental materials

Rabbits are lagomorphs, which, like rodents, continuously replace dental tissue throughout their lives. The rate of tooth growth is directly proportional to certain wear conditions imposed mainly by diet, and in this sense, it has been established that rabbits are suitable models for studying the wear of hypsodont teeth. In this study, we investigate the wear of upper and lower incisors by creating dental defects to provide support for testing innovative dental materials.

We included in the experiment 2 adult male New Zealand rabbits with an average weight of 3000 grams at the start. Under general anesthesia, with a mixture of ketamine (25 mg/kg) and medetomidine (0,2mg/kg), the animals were placed in a ventral-dorsal recumbency on the operating table. Cavities with a diameter of 2 mm were created on the upper and lower incisors with a spherical bur, under continuous cooling with saline solution. Postoperatively, the anesthetic effects were reversed by administering atipamezole (0,5mg/kg). The monitoring period was 8 weeks, during which we monitored the clinical evolution but especially the tooth growth rate, which we measured every 7 days.

The results for the lower incisors showed a rapid growth, so that at week 4, the defects had disappeared completely, while for the upper incisors, the defects were still present even at the end of week 8.

By analyzing the data, we recommend the use of rabbits as a model for the study of dental materials for dental use since the upper incisors have a slow abrasion rate, which allows the evaluation of the effects produced by the tested substances over time.

Acknowledgment: This work was supported by a contract for research services between UMF București - Faculty of Dentistry, and INCDMM "Cantacuzino", number 3909/2023.

Mariana Văduva - 30 years old, graduate of the University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine Bucharest, Faculty of Veterinary Medicine, class of 2018. Scientific research assistant - Veterinarian at the "Cantacuzino" National Institute for Medical and Military Research in 2018 - Platform of Experimental Medicine and Translational Research. Competence in laboratory animal experimentation.

EFECTELE DIETEI BOGATE ÎN GRĂSIMI ASUPRA CELULELOR IMUNE LA ȘOARECI PURTĂTORI DE TUMORI

Gheorghita Isvoranu^{1*}, Mihaela Surcel¹, Adriana Munteanu¹, Carolina Constantin¹, Monica Neagu¹, Marioara Chirițoiu-Butnaru²

¹ INCD „Victor Babeș”, București, Romania

²Institutul de Biochimie al Academiei Romane, București, Romania

* Autor corespondență: Gheorghita Isvoranu, email: gina.isvoranu@ivb.ro

Cuvinte cheie: dietă bogată în grăsimi, celule Natural Killer, șoareci, cancer

Rezumat

Obezitatea și excesul de greutate sunt probleme serioase de sănătate care cresc riscul multor boli precum diabetul, bolile de inimă, cancerul. În cancer, obezitatea este asociată cu inflamația și afectarea funcționalității celulelor imune, dar încă sunt necesare informații noi pentru a stabili mecanismele specifice care stau la baza legăturii dintre obezitate și cancer. Celule Natural Killer (NK) sunt limfocite citotoxice, parte a sistemului imun înăscut, capabile să recunoască și să elimine celulele tumorale și infectate viral. Studiile la om și rozătoare au furnizat informații contradictorii despre influența obezității asupra parametrilor funcționali ai celulelor imune. Pe baza lucrărilor anterioare efectuate de grupul nostru, scopul acestui studiu a fost de a elucidă potențialele modificări ale celulelor NK asociate cu dieta bogată în grăsimi prin caracterizarea fenotipică și funcțională a celulelor NK provenite de la șoareci purtători de melanom.

Șoareci C57BL/6J au fost hrăniți cu dietă standard cu grăsimi (SFD, 10% kcal grăsime) și dietă bogată în grăsimi (HFD, 45% kcal grăsime) timp de 2 luni. Ulterior, melanomul a fost generat prin inocularea subcutană a celulelor de melanom murin B16F10 (autorizare proiect nr. 475/04.11.2019). Rezultatele au arătat diferențe în ceea ce privește greutatea corporală și indexul splinei la șoarecii hrăniți cu HFD. De asemenea, șoarecii hrăniți cu HFD au prezentat un volum tumoral mai mare decât șoarecii hrăniți cu SFD. Analizele de citometrie în flux au arătat schimbări în procentul populațiilor celulelor imune în splină când am comparat șoarecii hrăniți cu SFD și HFD. Dieta bogată în grăsimi a afectat fenotipul și funcția celulelor NK. Celule imune citotoxice, celulele NK au scăzut la șoarecii purtători de tumori. Analiza subseturilor de celule NK indică o descreștere a subsetului matur și o creștere a subsetului imatur. Expresia markerilor de activare și maturare ai celulelor NK, cum ar fi NKp46, IL-2/IL-15R β , DX5, CD43, KLRG1 a fost scăzută la șoarecii cu melanom. De asemenea, a fost detectată și scăderea funcționalității celulelor NK la grupurile de animale cu tumori față de grupul control. Pre-activarea cu citokine a celulelor NK de la grupul control duce la creșterea expresiei moleculelor imunomodulatoare CD69 și receptorul α pentru IL-2 pe suprafața acestor celule și crește producția de IFN γ , granzimă B și perforină comparativ cu șoarecii purtători de melanom. În concluzie, date noastre au arătat că dieta bogată în grăsimi a afectat frecvența, fenotipul și funcția celulelor NK în șoarecii C57BL/6J. Rezultatele indică o descreștere a celulelor NK și subseturilor de celule NK mature la șoarecii purtători de melanom și hrăniți cu dietă bogată în grăsimi. Hrănirea cu o dietă bogată în grăsimi a dus la descreșterea expresiei markerilor de activare și maturare. Pre-activarea cu citokine a celulelor NK de la șoarecii purtători de melanom a prezentat o descreștere a expresiei markerilor de activare și o reducere a capacității de a produce IFN γ , granzima

B și perforină. Toate aceste date indică o asociere a funcționalității celulelor NK cu obezitatea.

Finanțare. Această lucrare a fost parțial susținută de MCID, prin intermediul proiectelor PN 23.16.02.02 și 31PFE/2021.

EFFECTS OF HIGH FAT DIET ON IMMUNE CELLS IN TUMOR-BEARING MICE

Gheorghita Isvoranu^{1*}, Mihaela Surcel¹, Adriana Munteanu¹, Carolina Constantin¹, Monica Neagu¹, Marioara Chirițoiu-Butnaru²

¹„Victor Babeș” National Institute of Pathology, Bucharest, Romania

²Institute of Biochemistry of the Romanian Academy, Bucharest, Romania

* Corresponding author: Gheorghita Isvoranu, email: gina.isvoranu@ivb.ro

Key words: high fat diet, Natural Killer cells, mice, cancer

Abstract

Obesity and overweight are serious health concerns that increase the risk of many diseases such as diabetes, heart disease, and cancer. In cancer, the obesity is associated with inflammation and impaired functionality of immune cells, but new information is still needed to establish the specific mechanisms underlying the link between obesity and cancer. Natural killer (NK) cells are cytotoxic lymphocyte, part of the innate immune system, able to recognize and eliminate virus-infected and tumor cells. Studies in human and rodents have provided conflicting information about the influence of obesity on functional immune cell parameters. Based on previous work by our group, the aim of this study was to clarify potential high fat diet-associated alterations of NK cells by phenotypic and functional characterization of NK cells from melanoma-bearing mice. Wilde type C57BL/6J mice were fed a standard fat diet

(SFD, 10% kcal fat) and high-fat diet (HFD, 45% kcal fat) for 2 months. Subsequently, melanoma was generated by subcutaneously inoculation of murine B16F10 melanoma cells (project authorization no. 475/04.11.2019). Results showed differences in body weight and spleen index in HFD-fed mice. Also, HFD-mice presented a higher tumour volume than SFD-mice. Flow cytometry analyses showed changes in frequencies of immune cell populations in spleen comparing mice fed SFD or HFD. High-fat diet impaired the phenotype and function of NK cells. Cytotoxic immune cells, NK cells were decreased in tumour-bearing mice. Analysis of NK cell subsets indicated a decrease of mature subset and an increase of immature NK cell subset. The expression of activation and maturation markers NKp46, IL-2/IL-15 Receptor β , DX5, CD43, KLRG1 on NK cells was decreased in mice with melanoma. Also, decrease in NK cells functionality was detected in both groups with tumors compared to control group. Cytokines pre-activated NK cells from group control upregulated the immunomodulatory molecules CD69 and IL-2 receptor α on their surface and enhanced the production of IFN γ , granzyme B and perforin compared with melanoma-bearing mice. In conclusion, our data showed that feeding a high-fat diet impaired the frequency, phenotype and function of NK cells in C57BL/6 mice. The results indicate a decreased of NK cells and the mature NK cell subsets in HFD-fed melanoma-bearing mice. Feeding a high-fat diet resulted in decreased expression of activation and maturation markers. Cytokine pre-activation of NK cells from melanoma-bearing mice displayed a decreased expression of activation markers and a reduced capacity of IFN γ , granzyme B and perforin production. All these data indicate an association of impaired NK cell functionality with obesity.

Funding. This work was partially supported by MRID, through projects nos. PN 23.16.02.02 and 31PFE/2021.

INVESTIGAREA EFECTELOR COMPORTAMENTALE ALE DIZOCILPINEI (MK-801) ASUPRA ȘOARECILOR GPR 75 WT ȘI KO

Ancuța Diana Larisa, Călborean Octavian, Coman Cristin

Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico-Militară
Cantacuzino, București, România
diana.larisa.ancuta@gmail.com

Deficiențele cognitive induse medicamentos pe modelele animale reprezintă instrumente valoroase pentru studiul tulburărilor neurologice și/sau psihiatrice de tipul depresiei, ischemiei cerebrale, bolilor neurodegenerative cronice și schizofreniei. Substanțe precum MK-801, care sunt antagoniști ai receptorilor N-metil-D-aspartat, produc pe modelele animale deficiențe de memorie, stereotipii sau hiperlocomoție. Cel din urmă efect reprezintă un model farmacologic important al schizofreniei, în acest sens, scopul studiului fiind acela de a evalua comportamentul șoarecilor GPR 75 WT și KO după administrarea timp de 14 zile a 0,5 mg/kg MK-801.

Am inclus în studiu 20 de șoareci GPR 75-KO, masculi și femele pe care i-am împărțit în loturi de câte 5. La jumătate dintre ei am inoculat soluție MK-801, iar la cealaltă jumătate soluție DMSO diluată. La 30 minute postinoculare, animalele au fost evaluate din punct de vedere comportamental prin expunerea la open field, Y-maze și light-dark box, 5 minute/animal/instrument. Aceeași procedură a fost aplicată și șoarecilor GPR 75-WT, iar rezultatele au arătat diferențe semnificative statistic ($p < 0,001$) în grupul KO față de WT, mai ales în cazul femelelor, aceleași diferențe putându-se observa și din punct de vedere clinic, animalele KO manifestând hiperexcitabilitate, mișcări în cerc, pierderea echilibrului și tremor.

MK-801 are o importanță semnificativă în inducerea manifestărilor comportamentale asemănătoare schizofreniei la șoarecii GPR 75-KO, prin protocolul aplicat realizându-se un model ideal pentru studiul de noi tratamente specifice bolii.

Sursa de finanțare: Cercetarea care a condus la aceste rezultate a beneficiat de finanțare din partea granturilor SEE 2014-2021, în cadrul contractului de proiect nr. 34 / 2021 denumit "Next generation of drugs targets for schizophrenia".

Ancuța Diana Larisa, medic veterinar grad I și asistent de cercetare științifică. Am absolvit școala doctorală în februarie anul curent. Sunt angajată la IC din anul 2018, iar în prezent sunt conducătoarea Unității de Testare Preclinică, activitatea laboratorului fiind concentrată pe îndeplinirea cerințelor necesare obținerii autorizației GLP. Cercetarea și medicina experimentală sunt două dintre pasiunile mele, iar implicarea ca responsabil cu experimentarea în Vivo, în mai multe proiecte de cercetare (naționale și internaționale), mi-a oferit ocazia de perfecționare și largire a orizontului în acest domeniu.

INVESTIGATION OF BEHAVIORAL EFFECTS OF DIZOCILPINE (MK-801) ON GPR 75 WT AND KO MICE

Ancuța Diana Larisa, Călborean Octavian, Coman Cristin
"Cantacuzino" National Military Medical Institute for Research
and Development, Bucharest, Romania
diana.larisa.ancuta@gmail.com

Drug-induced cognitive deficits in animal models are valuable tools for the study of neurological and/or psychiatric disorders such as depression, cerebral ischemia, chronic neurodegenerative diseases and schizophrenia. Substances such as MK-801, which are N-methyl-D-aspartate receptor antagonists, produce memory impairment, stereotypies or hyperlocomotion in animal models. The latter effect represents

an important pharmacological model of schizophrenia, and in this respect the aim of the study was to evaluate the behaviour of GPR 75 WT and KO mice after 14 days of administration of 0.5 mg/kg MK-801.

We included 20 male and female GPR 75-KO mice in the study and divided them into groups of 5. Half of them were inoculated with MK-801 solution and the other half with diluted DMSO solution. At 30 min post-inoculation, animals were behaviorally assessed by exposure to open field, Y-maze and light-dark box, 5 min/animal/instrument. The same procedure was applied to GPR 75-WT mice, and the results showed statistically significant differences ($p < 0.001$) in the KO group compared to WT, especially in females, and the same differences could be observed clinically, with KO animals showing hyperexcitability, circling, loss of balance and tremor. MK-801 is of significant importance in inducing schizophrenia-like behavioural manifestations in GPR 75-KO mice, with the protocol applied providing an ideal model for studying new disease-specific treatments.

Funding source: The research leading to these results has received funding from the EEA Grants 2014-2021, under Project contract no. 34/2021 named „Next generation of drugs targets for schizophrenia,,.

Ancuța Diana Larisa, first degree veterinarian and scientific research assistant. I graduated from doctoral school in February this year. I have been employed by IC since 2018, and I am currently the head of the Preclinical Testing Unit, the laboratory's activity being focused on meeting the requirements necessary to obtain the GLP authorization. Research and experimental medicine are two of my passions, and the involvement as the person in charge of experimentation in Vivo, in several research projects (national and international), gave me the opportunity to improve and broaden my horizons in this field.

MODELUL EXPERIMENTAL DE DERMATITĂ PSORIAZIFORMĂ ESTE CARACTERIZAT DE DEREGLĂRI MAJORE ALE SUBPOPULAȚIILOR LIMFOCITARE

Mihaela Surcel¹, Adriana Narcisa Munteanu¹,
Gheorghita Isvoranu¹, Diana Antonia Costea^{1,2}, Elena
Georgiana Dobre^{1,2}, Carolina Constantin^{1,3}, Monica Neagu^{1,2,3}

¹INCD „Victor Babeș”, București, Romania; ²Facultatea de
Biologie, Universitatea din București, Romania; ³Spitalul Universitar
Colentina, București, Romania
Email: msurcel2002@yahoo.com

Cuvinte cheie: psoriazis, inflamație, Imiquimod

Introducere. Psoriazisul (Ps), afecțiune cutanată cronică, inflamatorie, autoimună, mediată de celulele T, afectează 2-3% din populația globală iar descoperirea markerilor imuni specifici pentru diagnostic și prognostic rămâne în continuare o provocare pentru cercetători. Modelele experimentale încearcă să reproducă in vitro și in vivo caracteristicile clinice ale bolii, pentru a explica patogenza Ps și pentru a identifica posibile ținte terapeutice. Pentru a sublinia modificările care intervin în distribuția populațiilor celulare imune implicate în patogenza Ps, în cadrul acestui studiu a fost realizat și caracterizat un model murin standard de dermatită psoriaziformă și au fost cuantificate principalele populații celulare imune.

Material și metode. A fost realizat modelul experimental de dermatită psoriaziformă indusă de Imiquimod (IMQ) utilizând șoareci C57BL/6 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), masculi și femele (8–10 săptămâni, 21±3 g). Următoarele grupuri experimentale au fost testate: a)

grupul Ps, șoareci cărora li s-a aplicat pe regiunea dorsală o doză zilnică de 62.5 mg cremă pe bază de IMQ (Aldara Cream, Suedia) timp de 6 zile consecutive; b) grupul control, șoareci cărora li s-a aplicat similar o cremă pe bază de vaselină (Locobase Cream, Olanda); c) grupul normal, șoareci cărora nu li s-a aplicat niciun tratament. Pe lângă evaluarea clinică, aprecierea splenomegaliei și examenul histopatologic, parametrii imuni celulari au fost analizați prin citometrie în flux. Au fost cuantificate limfocitele T (CD3 ϵ +), T-helper (CD4+CD8a-) și T-supresor/citotoxic (CD8a+CD4-), limfocitele B (CD3 ϵ -CD19+) și celulele NK (CD3 ϵ -NK1.1+) din sânge periferic și suspensiile celulare obținute din splină și probele de piele.

Rezultate. Măsurătorile pentru eritem, descumare și indurație, scorul PASI, aprecierea splenomegaliei și evaluarea histopatologică au relevat că Ps indus prezintă caracteristici specifice Ps uman. Pentru șoarecii din grupul s-au obținut scăderi semnificative ($p < 0.05$) ale limfocitelor T-CD4+ (50 ± 3 , vs 58 ± 3) și celulelor B (43 ± 14 vs 77 ± 5), în timp ce procentele de limfocite T-CD8a+ (45 ± 2 vs 39 ± 3) și celule NK1.1+ (8 ± 3 vs 4 ± 1) au fost semnificativ crescute ($p < 0.05$). Raportul T-CD4+ / T-CD8a+ a fost scăzut la șoarecii din grupul Ps ($p < 0.05$) comparativ cu grupurile control și normal. Principala modificare observată în suspensia de splenocite a fost scăderea semnificativă a procentelor de celule B la șoarecii din grupul Ps ($p < 0.05$) comparativ cu grupurile control. Ceilalți parametri au avut aceeași tendință de variație ca și în sângele periferic, dar fără relevanță statistică.

Concluzii. Modelul experimental murin de dermatită psoriaziformă indusă a fost analizat din punct de vedere imunologic prin realizarea profilului celular la trei niveluri: sânge periferic, splină și piele. Profilul celular al populațiilor de limfocite din aceste trei zone imune poate constitui un punct

de plecare pentru recunoașterea caracteristicilor imune celulare ca ținte viitoare ale terapiei Ps.

Acknowledgement: Studiul a fost finanțat din proiectele PN 23.16.01.03/2023; PN-III-P2-2.1-PED-2021-2243; PN-III-P4-PCE-2021-0549 (PCE9/2022) și PN 23.16.02.02/2023. De asemenea, autorii apreciază aportul rețelei COST Action CA21108 - European Network for Skin Engineering and Modeling (NetSkinModels).

PSORIASIFORM DERMATITIS ANIMAL MODEL IS CHARACTERIZED BY MAJOR LYMPHOCYTE SUB-POPULATION DEREGLATIONS

Mihaela Surcel¹, Adriana Narcisa Munteanu¹, Gheorghîța Isvoranu¹, Diana Antonia Costea^{1,2}, Elena Georgiana Dobre^{1,2}, Carolina Constantin^{1,3}, Monica Neagu^{1,2,3}

¹"Victor Babeș" National Institute, Bucharest, Romania; ²Faculty of Biology, University of Bucharest, Romania; ³Colentina University Hospital, Bucharest, Romania

Email: msurcel2002@yahoo.com

Keywords: psoriasis, inflammation, immune cell populations

Introduction. Psoriasis (Ps), a T-cell mediated chronic inflammatory autoimmune skin disease, affects up to 2-3% of the global population and the search for specific immune markers for diagnosis and prognosis of this disease still remains a challenge. Non-human experimental models attempt to reproduce *in vitro* and *in vivo* the clinical features of the disease in order to explain the pathogenesis of Ps and to identify possible therapeutic targets. In order to underline

changes in the distribution of immune cell populations involved in Ps' pathogenesis, we performed and characterized a standard murine model of psoriasiform dermatitis, and quantified the main immune cell populations.

Material and methods. We used an Imiquimod (IMQ)-based model of psoriasiform dermatitis comprising C57BL/6 mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), males and females (8–10 weeks, 21 ± 3 g). The following experimental groups were tested: a) Ps group, received a daily topical dose of 62.5 mg IMQ cream (Aldara Cream, Sweden) on the shaved back for 6 consecutive days; b) control group, treated similarly with vaseline-based cream (Locobase Cream, The Netherlands); c) normal group, with no topical treatment. Besides clinical evaluation, splenomegaly and histopathological assessment, cellular immune parameters were monitored using flow cytometry. We have quantified T lymphocytes ($CD3\epsilon^+$), T-helper ($CD4^+CD8a^-$) and T-suppressor/cytotoxic ($CD8a^+CD4^-$), B ($CD3\epsilon^-CD19^+$) and NK cells ($CD3\epsilon^-NK1.1^+$) from peripheral blood, spleen and skin samples.

Results. Measurements for erythema, desquamation and induration, PASI score, splenomegaly assessment and histopathological evaluation revealed that the induced Ps exhibit human Ps' specific features. For Ps group the percentages of T- $CD4^+$ (50 ± 3 , vs 58 ± 3) and B cells (43 ± 14 vs 77 ± 5) significantly decreased ($p<0.05$) while the percentages of T- $CD8a^+$ lymphocytes (45 ± 2 vs 39 ± 3) and NK1.1+ cells (8 ± 3 vs 4 ± 1) were significantly increased ($p<0.05$). T- $CD4^+$ / T- $CD8a^+$ ratio was lower in Ps group ($p<0.05$) as compared to control and normal group. In spleen suspensions the main

observed deregulation was the significant decrease of B cells in Ps group ($p < 0.05$) as compared to control groups. The other cellular parameters showed the same tendency of variation as in peripheral blood, but without statistical significance.

Conclusions. An induced psoriasiform dermatitis murine model was analysed from an immunological point of view by performing cellular profiling at three levels: peripheral blood, spleen and skin. Cellular profiling of lymphocytes populations in these three immune areas may be a starting point for acknowledging cellular immune characteristics as future Ps therapy targets.

***Acknowledgement:** This research was funded by PN 23.16.01.03/2023; PN-III-P2-2.1-PED-2021-2243; PN-III-P4-PCE-2021-0549 (PCE9/2022). Authors acknowledge also COST Action CA21108 - European Network for Skin Engineering and Modeling (NetSkinModels).*

EVALUAREA IMUNOLOGICĂ A MODIFICĂRILOR INDUSE DE DIETA BOGATĂ ÎN GRĂSIMI LA ȘOARECI GRASP55-/-

Marioara Chiritoiu-Butnaru¹, Gabriela Chiritoiu¹, Mihaela
Surcel², Gheorghita Isvoranu*²

¹ Institutul de Biochimie al Academiei Române, București, România

² INCD „Victor Babeș”, București, România

* Autor corespondență: Gheorghita Isvoranu, email: gina.isvoranu@ivb.ro

Cuvinte cheie: GRASP55, dietă bogată în grăsimi, celule
Natural Killer, șoareci

Obezitatea este o tulburare metabolică cu multiple implicații fiziologice și reprezintă un factor de risc pentru numeroase patologii prin interferarea cu răspunsul imun. Fenotipul mai multor celule imune, inclusiv al celulelor Natural killer (NK), este modificat în tulburările metabolice. GRASP55 (Golgi-reassembling staking protein 55), o proteină localizată în periferia Golgi, s-a dovedit a fi critică pentru secreția eficientă a citokinei proinflamatorii IL-1 β . De asemenea, șoarecii Grasp55-/- prezintă o absorbție intestinală deficitară a grăsimilor și rezistență la creșterea în greutate indusă de dieta bogată în grăsimi. Am investigat dacă excesul de lipide ar putea afecta răspunsul imun într-o manieră GRASP55-dependentă prin diferite abordări. În primul rând, am măsurat secreția de IL-1 β de la macrofagele primare izolate de la șoareci wild type sau GRASP55-/- expuse la acid oleic ca sursă de grăsime pentru a estima efectul proinflamator indus de lipide. În al doilea rând, am evaluat modul în care deleția de GRASP55 ar afecta fenotipul celulelor NK indus de dieta bogată în grăsimi (HFD, 45% kcal grăsime). Rezultatele

noastre au arătat că expunerea macrofagelor la excesul de lipide duce la creșterea secreției citokinei proinflamatorii IL-1 β și deleția de GRASP55 contracarează această creștere. De asemenea, am observat că expunerea șoarecilor la HFD descrește procentul de celule NK1.1+ de la șoareci wild type și GRASP55-/. Celulele NK au prezentat o expresie crescută a markerilor CD11c, CD11b, CD27, NKp46 și CD43 la toți șoarecii care au primit HFD. În ceea ce privește markerii de activare și maturitate CD25 și CD49b, am observat o scădere în ambele grupuri. Șoarecii Grasp55-/- prezintă o creștere a expresiei receptorilor CD69 și KLRG1, în timp ce șoarecii wild type au prezentat o descreștere a expresiei acestora. În concluzie, rezultatele noastre sugerează că expunerea la grăsime duce la creșterea răspunsului proinflamator iar șoarecii hrăniți cu dietă bogată în grăsimi prezintă un procent redus de celule NK și au caracteristici fenotipice diferite la cele două grupuri de șoareci, Grasp55-/- și wild type.

Finanțare. Această lucrare a fost parțial susținută de Academia Română și MCID, prin intermediul proiectelor 155/GAR2023, PN 23.16.02.02 și 31PFE/2021.

IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF FAT DIET-INDUCED ALTERATIONS IN GRASP55^{-/-} MICE

Marioara Chiritoiu-Butnaru¹, Gabriela Chiritoiu¹, Mihaela Surcel², Gheorghita Isvoranu*²

¹Institute of Biochemistry of the Romanian Academy, Bucharest, Romania

²„Victor Babeș” National Institute of Pathology, Bucharest, Romania

* Corresponding author: Gheorghita Isvoranu, email: gina.isvoranu@ivb.ro

Key words: GRASP55, high fat diet, Natural Killer cells, mice

Obesity is a metabolic disorder with multiple physiological implications and represents a risk factor for several pathologies by interfering with the proper immune response. Several immune cells phenotype is dysregulated in metabolic disorders including Natural killer (NK) cells. GRASP55 (Golgi-reassembling staking protein 55), a peripheral Golgi protein was shown to be critical for the efficient secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . Also, Grasp55^{-/-} mice display impaired intestinal fat absorption and resistance to high-fat diet induced body weight gain. We investigated whether excess lipids could alter the immune response in a GRASP55-dependent manner by employing different approaches. First, we measured the secretion of IL-1 β from primary macrophages isolated from wild type or GRASP55^{-/-} exposed to oleic acid as fat source to estimate the lipid-induced -inflammatory effect. Second, we evaluated how deletion of GRASP55 would affect high-fat diet (HFD, 45% kcal fat) induced NK cells phenotype. Our results indicate that exposure of macrophages to excess lipids exacerbates the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β and deletion of GRASP55 counteracts this increase. Also, we observed that HFD exposure of mice decreases the percentage of NK1.1+ cell population from both wild type and GRASP55^{-/-} mice. NK cells showed an increase in CD11c, CD11b, CD27, NKp46 and CD43 markers for all mice which received the HFD. In terms of expression of activation and maturation markers CD25 and CD49b, we observed an overall decrease in both groups. Grasp55^{-/-} mice presented an increased expression of CD69 and KLRG1

receptors, while wild type mice presented a decreased expression. In summary, our results suggest that fat exposure exacerbates the pro-inflammatory response and high-fat diet fed mice have a reduced percentage of NK cells and have different phenotypic characteristics in both groups, Grasp55^{-/-} and wild type mice.

Funding. This work was partially supported by Romanian Academy and MRID, through projects nos. 155/GAR2023, PN 23.16.02.02 and 31PFE/2021.

MEDIUL CONDITIONAT DERIVAT DE LA FIBROBLASTE CULTIVATE IN SFEROIZI PROMOVEAZA REGENERAREA PIELII PE UN MODEL MURIN DE RANA CUTANATA

Raluca Tutuianu, Daniela Madalina Ghetu, Irina Titorencu,
Ana Maria Rosca

Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu”,
Academia Romana, Bucuresti, Romania

raluca.tutuianu@icbp.ro

Introducere: Leziunile cutanate greu vindecabile, cum ar fi ranile cronice diabetice si ulcerul vascular, continua sa reprezinte o provocare pentru domeniul medical. Pentru a usura povara financiara asupra sistemelor de sanatate, precum si impactul negativ asupra calitatii vietii pacientilor, medicina

regenerativa utilizeaza diferite celule progenitoare/stem, si mai recent, mediul lor conditionat - secretomul (CM), incluzand vezicule extracelulare, pentru a stimula procesele biologice cheie relevante pentru vindecarea ranilor cutanate. Fibroblastele dermale (Fb) reprezinta o populatie celulara heterogena ce exprima o serie de markeri specifici comuni cu celulele stem mezenchimale, fiind in acelasi timp mai usor de izolat.

Ipoteza: Presupunem ca secretomul, sub forma de CM derivat din Fb dermale cultivate ca sferoizi tridimensionali (3D), ar putea avea un efect terapeutic pentru vindecarea ranilor cutanate.

Materiale si metode: Fb dermale au fost izolate din probe de derm normal, iar sferoizii au fost obtinuti folosind tehnica picaturii suspendate ($2,5 \times 10^5$ celule/picatura). Dupa 3 zile, sferoizii au fost recoltati si incubati pentru 24 de ore in DMEM fara ser, la 37°C , sub agitare. CM (3D-CM) a fost colectat si proteina totala a fost cuantificata prin metoda Bradford. CM provenit de la Fb crescute in cultura 2D (2D-CM) a fost folosit ca si control, alaturi de DMDM. Capacitatea CM de a imbunatati vindecarea ranilor cutanate a fost ulterior testata pe un model in vivo de ranire cutanata, folosind soareci C57BL/6 (masculi, 8-12 saptamani). Pe scurt, animalele au fost anesteziate prin injectare intraperitoneala cu ketamina (75 mg/kg) si xilazina (15 mg/kg), parul a fost indepartat prin barbierirea suprafetei dorsale, urmata de un agent depilator si dezinfectare cu alcool etilic 70% si solutie de iod. Folosind un dispozitiv de biopsie circulara de 4 mm in diametru, au fost efectuate doua rani, una pe fiecare parte a liniei mediane. Un inel circular de fixare format din silicon cu diametrul de 0,8

mm a fost aplicat astfel incat rana sa fie centrată in interiorul inelului, care a fost lipit de piele cu un adeziv de lipire imediata (Surgibond) și fixat suplimentar prin suturi intrerupte cu nylon chirurgical 6-0. Rana a fost protejata cu un pansament Hydrocoll. Au fost utilizate doua grupuri experimentale: grupul tratat cu secretom derivat din culturi Fb (i) 2D si (ii) 3D (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteina totala), fiecare animal avand controlul corespunzator (DMEM). O suta de μL de CM (5 μg proteina totala) au fost administrati prin injectare intradermica la marginea ranii. Fiecare grup a continut 15 animale, pentru care vindecarea ranii a fost monitorizata dupa 3, 7 si 10 zile (5 animale/punct de verificare). Inchiderea ranii a fost evaluata prin fotografierea acesteia in ziua operatiei si la fiecare punct de verificare/inainte de recoltare. Aria ranii a fost cuantificata folosind software-ul Image J si a fost calculata ca procent din aria initiala a ranii. Dupa 3, 7 si 10 zile, soarecii au fost eutanasiati si ranile au fost excizate si procesate pentru o evaluare histologica ulterioara (coloratie cu Hematoxilina si Eozina si Tricrom Masson).

Rezultate: Atat CM derivat din 2D, cat si din 3D, au imbunatatit procesul de vindecare a ranii in comparatie cu ranile tratate cu DMEM; remarcandu-se o diferenta semnificativa statistic intre dimensiunea ranii la 7 zile dupa leziune: pentru 3D-CM, aria ranii a fost redusa la 19 % din aria initiala a ranii, in comparatie cu 2D-CM si DMEM, pentru care dimensiunea ranii a fost de 33 % si, respectiv, 54 %. La 10 zile dupa leziune, desi inca a fost vizibila o imbunatatire usoara in inchiderea ranii in grupul 3D-CM in comparatie cu grupurile tratate cu 2D-CM si control (9 % versus 12 % si, respectiv, 23% din aria initiala a ranii), nu s-a obtinut o semnificatie

statistica. Analiza histologica a aratat un proces de epitelizare mai intens in grupul 3D-CM.

Concluzie: Procesul de agregare a imbunatatit capacitatea Fb dermale de a sustine vindecarea ranilor cutanate intr-un model de rana pe model murin, accelerand procesul de re-epitelizare a ranii.

Finantare. Lucrarea a fost realizata cu fonduri furnizate de Unitatea Executiva pentru Finantarea Invatamantului Superior, a Cercetarii, Dezvoltarii si Inovarii (UEFISCDI), grant: PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344 si Academia Romana.

FIBROBLASTS SPHEROIDS DERIVED CONDITIONED MEDIUM STIMULATES CUTANEOUS REGENERATION IN A MOUSE SKIN WOUND HEALING MODEL

Raluca Tutuianu, Daniela Madalina Ghetu, Irina Titorencu, Ana-Maria Rosca

Institute of Cellular Biology and Pathology “Nicolae Simionescu”,
Romanian Academy, Bucharest, Romania

Introduction: Refractory skin lesions such as diabetic chronic wounds and vascular ulcers still pose a challenge for the medical field. In order to ease the financial burden on the healthcare systems, as well as the negative impact on patients' quality of life, regenerative approaches employ different progenitor/stem cells, and more recently, their secretome-conditioned medium (CM), extracellular vesicles, in order to stimulate key biological processes relevant for skin wound healing. Dermal fibroblasts (Fb) represent a heterogenous cell

population that share specific markers with mesenchymal stem cells, while also being more easily available to isolate.

Hypothesis: We propose that the secretome, in the form of CM- derived from dermal Fb cultivated as three-dimensional (3D) spheroids could have a therapeutic effect for skin wound healing.

Materials & Methods: Dermal Fb were isolated from normal skin samples and spheroids were obtained by using the hanging drop technique ($2,5 \times 10^5$ cells/drop). After 3 days, the spheroids were harvested and incubated for additional 24h in DMEM without serum, at 37°C, under stirring. CM (3D-CM) was collected and the total protein was quantified by Bradford method. CM from Fb grown in 2D culture (2D-CM) and DMEM were used as control. The capacity of CM to improve skin wound healing was subsequently tested on an in vivo full thickness wound model, using C57BL/6 mice (males, 8-12 weeks). Briefly, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg), the hair was removed by shaving the dorsal surface, followed by depilatory agent and disinfection with ethanol 70% and iodine solution. Using a 4 mm biopsy punch, two wounds were performed one on each side of midline. A circular ring-shaped splint made of a 0.8 mm thickness silicone was applied so that the wound would be centered within the splint, which was glued to the skin with an immediate-bonding adhesive (Surgibond) and additionally fixed by interrupted sutures with surgical 6-0 nylon. The wound was protected by Hydrocoll dressing. Two experimental groups were used: (i) and (ii) group treated with secretome derived from 2D and 3D culture Fb ($0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ total protein), each animal having the appropriate control (DMEM). One hundred μL of each sample ($5 \mu\text{g}$ total protein) was administered via intradermic injection at the wound margin. Each group contained 15 animals, for which the wound healing

was monitored after 3, 7 and 10 days (5 animals/check point). The wound closure was evaluated by taking digital photographs on the day of surgery and at each checkpoint/before harvesting. Wound area was quantified using Image J software and it was calculated as a percent area of the original wound. After 3, 7 and 10 days the mice were euthanized and the wounds were excised and processed for further histological evaluation (Haematoxylin & Eosin and Trichrome Masson staining).

Results: Both 2D and 3D -derived CM improved the wound healing process in comparison to DMEM treated wounds; however, there was a statistically significant difference between the wound size at 7 days after injury: for 3D-CM, the wound area was decreased at 19% of the initial wound area, in comparison to 2D-CM and DMEM, in which the wound size was 33 % and 54%, respectively. At 10 days after injury, although a slight improvement in wound closure was still noticed in 3D-CM group in comparison to 2D-CM treated and control groups (9% versus 12% and 23% of the initial wound area, respectively), no statistically significance was obtained. The histological analysis showed a more intense epithelialization process in 3D-CM group.

Conclusion: The aggregation process enhanced the ability of dermal Fb to support skin wound healing a in vivo full thickness wound model, by speeding up the re-epithelialization process of the wound.

Acknowledgment. Work supported by The Executive Agency for Higher Education, Research, Development and Innovation Funding (UEFISCDI) from Romania, grant: PN-III-P1-1.1-TE-2021-1344 and the Romanian Academy.

Documente care pot fi descărcate de pe European Commission website

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_guidance_en.htm

Animals used for scientific purposes under Dir 2010/63/EU

Severity Assessment Framework

Guidance on how to consider severity during project planning and in prospective severity classification, ensure consistent monitoring and report the actual severity after an experiment. Many examples are included from different areas.

[bg](#) [cs](#) [da](#) [de](#) [et](#) [el](#) [en](#) [es](#) [fr](#) [hr](#) [it](#) [lv](#) [lt](#) [hu](#) [mt](#) [nl](#) [pl](#) [pt](#) [ro](#) [sk](#) [sl](#) [fi](#)

[sv](#)



Directive, Commission Implementing Decision and Commission Recommendation

The full legal texts of the Directive 2010/63/EU, the Commission Implementing Decision 2012/707/EU on statistical and other reporting requirements and the Commission Recommendation 2007/526/EU complementing Annex III of the Directive on the care and accommodation of animals.

[bg](#) [cs](#) [da](#) [de](#) [et](#) [el](#) [en](#) [es](#) [fr](#) [hr](#) [it](#) [lv](#) [lt](#) [hu](#) [mt](#) [nl](#) [pl](#) [pt](#) [ro](#) [sk](#) [sl](#) [fi](#)

[sv](#)

Animal Welfare Bodies and National Committees

Guidance on how to set up an effective Animal Welfare Body within an establishment and how National Committees in Member States can support their functioning as well as advise authorities to ensure coherent approach to project evaluation.

[bg](#) [cs](#) [da](#) [de](#) [et](#) [el](#) [en](#) [es](#) [fr](#) [hr](#) [it](#) [lv](#) [lt](#) [hu](#) [mt](#) [nl](#) [pl](#) [pt](#) [ro](#) [sk](#) [sl](#) [fi](#) [sv](#)

Education and Training Framework

This guidance document includes the principles and criteria for a modular, outcome-based education and training framework. It discusses supervision and competence assessment, as well as continued professional development. These provide the basis for the development of a mutual recognition of training courses across countries. The guidance document also contains general principles for the use of live animals in education and training.

bg cs da de et el en es fr hr it lv lt hu mt nl pl pt ro sk sl fi sv

Inspections & Enforcement

Guidance on how to approach inspection and enforcement under the Directive. The guidance document shows how an effective inspection programme can be a reassurance to all involved in the care and use of animals.

bg cs da de et el en es fr hr it lv lt hu mt nl pl pt ro sk sl fi sv

Project Evaluation and Retrospective Assessment

A guidance document on how to establish an effective, efficient and consistent project evaluation process including harm-benefit assessment and the retrospective assessment of projects.

bg cs da de et el en es fr hr it lv lt hu mt nl pl pt ro sk sl fi sv

SAPACO 2000 va asigura solutii complete pentru BIOBAZA



TECNIPLAST
Innovation through passion

SAPACO
2000

THE NEW
EMERALD IVC
A GEM OF INNOVATION

IN-RICHMENT
A STEP FORWARD IN ANIMAL WELFARE...
(IN-BEDDED)

VISION+
100% CLEAR VIEW
TO EASE DAILY HEALTH CHECK

SMARTOP
THE EASIEST, MOST ERGONOMIC AND
SAFEST WAY TO ACCESS YOUR ANIMALS

**ALL-IN-ONE
RACKS**
CAPACITY, COMFORT OR BOTH:
THE CHOICE IS YOURS!

find out more on
www.tecniplast.it

TECNIPLAST
Innovation through passion

Noldus

Information Technology

30
advancing
behavioral
research
since 1983
years



Innovative solutions for animal behavior research

Powerful software tools, fully integrated labs, and expert consultancy. Trust our 30 years of experience to make your project a success

Cătălin Piu
Key Account Manager
0040752305070
Catalin.Piu@aliant.tech
www.aliant.tech

 **ALIANT**
Distribuitor



TECNIPLAST



ARIA CS48
CHANGING
STATION



SMART FLOW
AIR HANDLING
UNIT



IVC CAGES
MICE AND RATS
HOUSING
SOLUTIONS



ACTIVE BLUE
AQUATIC STANDALONE
RACK



ISO CAGES
FOR BIOCONTAINMENT
AND BIOEXCLUSION

**YOUR TURN-KEY
PARTNER FOR
LABORATORY
EQUIPMENT
INTEGRATED SOLUTIONS**

WWW.TECNIPLAST.IT
WWW.IWTSRL.IT

