

UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY

MEDICINE CLUJ-NAPOCA

DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE

---

**HABILITATION THESIS: SUMMARY**

---

**Comparative Pathology and Medical Nanomaterials:  
Current Status and Future Trends**

Domain: **Veterinary Medicine**

---

Author: **Tăbăran Alexandru-Flaviu**

---



CLUJ-NAPOCA, 2021

## 1. ABSTRACT

This habilitation thesis presents the primary professional and research results obtained during the author's scientific activity in the field of veterinary pathology, from the moment of defending the doctoral dissertation and receiving the Ph.D. title in Veterinary Medicine (Anatomic Pathology) in 2012 and until now, as well as the career development plans and future professional projects.

The current habilitation thesis, entitled "*Comparative Pathology and Medical Nanomaterials: Current Status and Future Trends*" exhibits some of the most relevant studies and recently obtained data in the field of veterinary comparative pathology and pathobiology as well as nanomedicine, results selected from the 82 peer-reviewed, articles included in journals ranked in Web Of Science (Core Collection) and 65 papers published in international journals (BDI quoted journals).

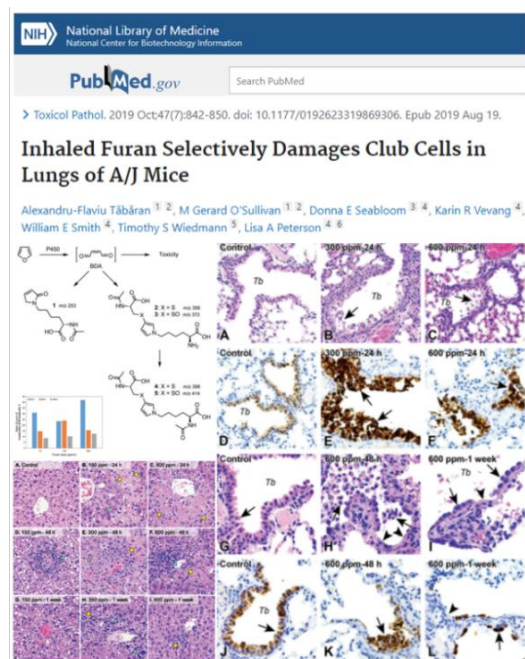
After a brief introduction presenting the author's curricula vitae (Chapter 2), the thesis will cover the author's main scientific results (Chapter 3). This area of the habilitation thesis is structured in 8 chapters (Chapters 3.1 to 3.8). It will cover the work in the field of comparative pathology and nanomedicine (mainly the utilization of metallic nanoparticles in the therapy of intracellular /intramacrophagic bacterial infectious pathogens). Finally, the thesis will highlight some of the author's future professional projects and developing plans for the career (Chapter 4).

The achievements in the field of comparative pathology are covered in 7 chapters. They will begin with a brief presentation of the experimental pathology data obtained in rodents after nasal-only exposure to the carcinogenic heterocyclic organic compound, furan (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O) (Chapter 3.1). This chapter will be followed by the presentation of two diagnostic

pathology studies, which reflect the subcutaneous and systematic *larva migrans* produced by the metacercaria of the zoonotic trematode *Alaria alata* in European mink (Chapter 3.2) and an extensive report of a novel lethal thoraco-abdominal congenital malformation horses (Chapter 3.3). The main comparative-pathology and epidemiological data of canine brain tumors are discussed in Chapter 3.4. The dog's main advantages and limitations as a natural model for developing new therapies for CNS malignancies are briefly present.

Further, in Chapters 3.5 and 3.6, the main pathological features of two new genetic models of inherited lysosomal storage diseases (Gangliosidosis and Mucopolysaccharidosis) and their therapy developed by the CRISPR / Cas9 system will be presented. The experimental development and pathological- phenotype characterization of a new transgenic cancer syndrome in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) by eliminating KCNQ1-gene (potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1) will be discussed in Chapter 3.7. Finally, the topic of nanomedicine will be discussed in Chapter 3.8. The current paradigm and the author's experimental results in AgAu NP's use in the therapy of Mycobacteria will present in detail during this chapter.

Chapter 3.1. "***Pathological and Toxicological Investigations of the Systemic Effects of Inhaled Furan in A/J Mice***" describes the systemic effect of furan, a toxic compound frequently present in roasted foods and tobacco smoke. Thus, although significant research efforts have been spent understanding the toxicity of heterocyclic organic compounds and the oral adverse effect of furan has been experimentally explored, few studies have addressed the toxic effects that may arise after systemic inhalation exposure.



**Fig.1.** Key aspects related to the furan systemic toxicity in A/J mice (Tăbăran et al. 2019)

particularly susceptible to lung chemically-induced carcinogenesis) were nose-only exposed in inhalation chambers for 3 hours to furan in ascending concentrations (groups ranging from 0, 30, 75, 150, 300, or furan 600 ppmv). Afterward, complete pathology and furan toxicokinetics were carried in dynamics 24 hours, 48 hours, or 1-week timepoints. Pathological examination revealed diffuse bronchiolar club cell/Clara cell (bronchiolar exocrine cells) degeneration and necrosis, with extensive, severe upper-airway denudation and partial airway occlusion (for the 300 and 600 ppmv experimental groups). There are extensive club cell/Clara cell regeneration and partial respiratory epithelium repair at seven days following the above-described changes. Besides the respiratory changes, which are somehow intuitive considering the route-exposure, acute hepatotoxicity was detected in the 150 ppmv furan-exposed group, consisting of zonal lobular necrosis

Following systemic oral exposure, furan is both hepatotoxic and carcinogenic in rodents. Extensively, the pathogenesis, procedures, and the results of this chapter are presented in our previous publication [Tăbăran, AF et al. "Inhaled Furan Selectively Damages Club Cells in Lungs of A/J Mice" *Toxicologic pathology* 47, no. 7 (2019): 842-850.J].

Briefly, adult female A/J mice (inbred albino strain

and mineralization and serum ALT elevation. Hepatocyte regeneration was noticed at 1-week post postexposure timepoint. Interestingly, the group exposed to 300 ppmv showed multifocal hepatic mineralization that locally evoked a mild granulomatous inflammatory response. Our study's observations demonstrate that inhaled furan is acutely toxic to the lungs (targeting mainly the club/Clara cells) and liver following systemic distribution of the toxic intermediates. No toxin-induced changes were identified in the other examined organs.

Chapter 3.2. "*Pathological Features of Cutaneous and Systemic Larva Migrans Caused by Alaria alata (Goeze, 1792) Mesocercariae in the European Mink (Mustela lutreola)*" presents the original contributions of the authors in the field of the infectious-diseases pathology by the description for the first time of the histopathological changes induced by *Alaria alata* larva migrans in animals.



**Fig.2.** Pathological features of the *Alaria alata* larva migrans in animals (Tăbăran et al. 2013)

This chapter extensively presents our key-observations published in the official journal of the Centers for Disease Control and Prevention, Emerging Infectious Diseases (ISI IF=6.259) [Tăbăran, Flaviu et al. "*Alaria alata* infection in European mink." *Emerging Infectious Diseases* 19, no. 9 (2013): 1547.]. Here, we described the gross and histopathological changes (including ancillary histochemical

stains) associated with *Alaria alata* larva migrans in the European mink,

demonstrating the type of lesion, the most-affected tissue (subcutaneous tissue and skeletal muscle), and several features related to the particular pathobiology of this fascinating parasite. Strong arguments for the pathogenesis of the polyphasic-polymuscular nature of the lesions induced by the parasite mesocercariae were brought, demonstrating the continuous movement and the secondary inflammatory reaction triggered by the direct tissue destruction.

Chapter 3.3. *"Lethal Congenital Pleuroperitoneal Diaphragmatic Hernia and Pericardial Aplasia in Horse"* describes, for the first time in horses, a complex thoraco-abdominal congenital defect, the pericardial aplasia associated with diaphragmatic hernia.



**Fig.3.** Gross and histological features of the first description of the aplasia of the pericardium and congenital diaphragmatic hernia in a Friesian foal (Tăbăran et al. 2015)

The chapter summarizes our previous observations published in the BMC Veterinary Research (IF=1.83) [Tăbăran, Alexandru-Flaviu, et al.. *"Congenital diaphragmatic hernia with concurrent aplasia of the pericardium in a foal."* BMC Veterinary Research 11, no. 1 (2015): 1-7] and describe a case of congenital diaphragmatic hernia associated with coexisting

extensive aplasia of the pericardium in a newborn female Friesian foal. The diaphragmatic hernia (resembling the Bochdalek-like hernia reported in children) was associated with significant thoracic displacement of abdominal digestive organs and severe lung hypoplasia. As in humans, also in horses, the congenital diaphragmatic hernia has variable degrees, in this case

involving a large defect and severe, lethal secondary changes. This case represented the first medical report of this association of congenital malformations in horses and the first pathological characterization of pericardial aplasia in equines. As long as in other phylogenetically unrelated species, such as dogs, cats, and primates, this congenital pathology has a relatively high incidence despite the silent clinical evolution, in horses, pericardial aplasia can be an overlooked diagnosis, urging a better examination of the pericardial structure, especially in the context of congenital diaphragmatic hernia.

Chapter 3.4. *"Canine Cerebral Tumors: Pathological Features, Epidemiology, and Perspectives in Establishing the Dog as a Naturally Occurring Model for the Development of Novel Therapies for Glial Tumors"* presents our latest involvement in the research of brain tumors pathobiology and is based on the oncological data of a large cohort of animals (95 dogs, 39 female, and 56 male). The chapter summarizes our previous observations published by our team in the journal *Cancer Investigation* (IF=2.398) (Hubbard et al., 2018). In the effort to find better experimental models for brain tumors in humans and to enhance the relevance of preclinical studies for the studies of therapies, the dog emerged as a naturally occurring model for these tumors. This advantage is due to the similar overall epidemiology of brain tumors in the canine population and humans and high resemblance in both morphology and biology with dogs and humans' brain tumors. Due to the large size, which allows complex clinical and paraclinical investigations, the dog serves as a better model for these tumors than the rodent models. In our study, brachycephalic breeds were overexpressed, and the most frequently diagnosed CNS tumor were glial tumors (astrocytoma, followed by high-grade oligodendroglioma). Also, the tumor histological type and grading were useful prognostic

elements of dogs' overall survival with brain tumors (grades II- to IV). Finally, in the study, we established the comparative normative data for using the canine population with naturally occurring cerebral glial tumors as a preclinical, experimental platform for testing novel therapies (as chemotherapy, radiation therapy, and immunotherapy), including multimodality treatment regimes, designed for human gliomas.

Chapter 3.5. *"Development and Pathological-phenotypical Description of a Novel Transgenic Murine Model of GM1-Gangliosidosis and Mucopolysaccharidosis Type IV/Morquio-Like Syndrome Type B"* describes the development of a genetic treatment by in vivo genome editing of two inherited lysosomal storage diseases: GM1-Gangliosidosis and Mucopolysaccharidosis Type IV/Morquio-Like Syndrome Type B.

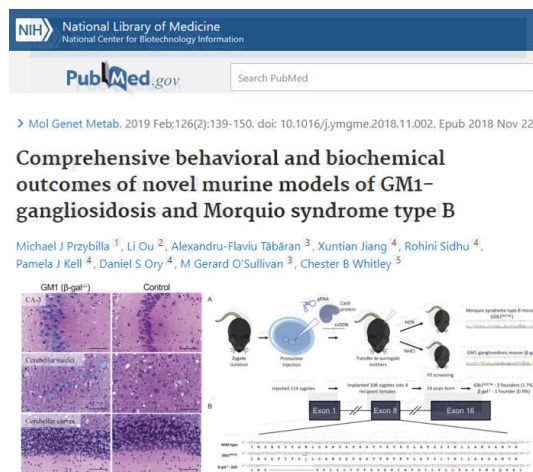
Extensively, the data of this project were presented by us in the journal

Molecular Genetics and Metabolism (IF=4.17)

[Przybilla, M J., Li Ou, Tăbăran AF, et al. *"Comprehensive behavioral and biochemical outcomes of novel murine models of GM1-gangliosidosis and Morquio syndrome type B."*

*Molecular genetics and metabolism* 126, no. 2 (2019): 139-150.].

Here, two murine models of GM1-gangliosidosis and



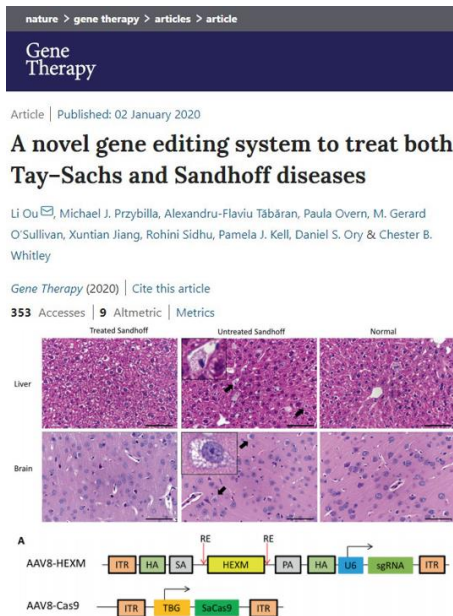
**Fig.4.** Pathologic features and genetic construct of the of GM1-gangliosidosis and Morquio syndrome type B in mice (Przybilla et al. 2019)

Morquio syndrome type B were obtained and further used as an experimental platform of preclinical testing for genetical therapy (utilizing CRISPR-Cas9



genome editing) of these diseases. Genetical lysosomal hydrolase  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) deficiencies are responsible in humans for the development of a distinct type of Mucopolysaccharidosis consisting of two clinical entities, the first manifested mainly as a skeletal disease (Morquio syndrome type B/ Mucopolysaccharidosis Type IVB), and the second primarily as a neurodegenerative disease (GM1-gangliosidosis). To experimentally reproduce in mice the human genetic defects, we used the CRISPR-Cas9 genome editing system, and Gbl1W274L mice ( $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>) were generated (mutation W274L was introduced into the Gbl1 gene). The newly developed mouse model showed, as expected, a marked reduction in  $\beta$ -galactosidase enzyme activity but displayed no significant phenotype after one year. In contrast,  $\beta$ -gal<sup>-/-</sup> mice were devoid of  $\beta$ -gal enzyme activity resulting in severe neuromotor and neurocognitive dysfunction and ganglioside accumulation throughout the central nervous system (mainly within the neurons).

Chapter 3.6. "*Development of a New CRISPR/Cas9-based Gene-editing System for the Therapy of the GM2-Gangliosidoses (Tay-Sachs and Sandhoff diseases)*" presents another project in the comparative pathology and therapy of the lysosomal storage diseases in animals. The chapter describes the genetical treatment by *in vivo* genome editing for the treatment of two inherited, autosomal recessive systemic GM2-gangliosidoses: Tay-Sachs (a hexosaminidases-A defect) and Sandhoff disease (a hexosaminidases B deficiency).



**Fig.5.** Pathologic features of the GM2-gangliosidoses and genetical treatment design in Sandhoff mice (Ou et al. 2020)

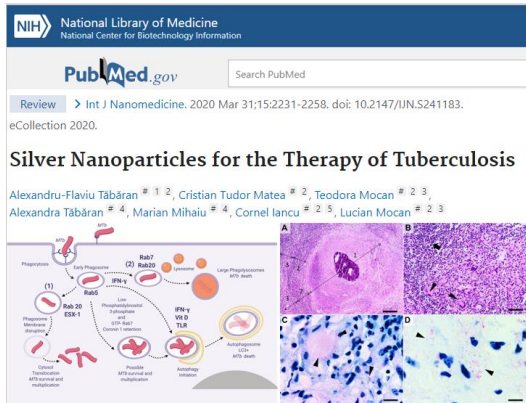
subsequent intracellular (neuronal, hepatocyte, macrophage, glial cells, etc.) accumulation of a specific type of complex lipid-GM2 gangliosides. By applying a gene-editing system (CRISPR editing technique), the hexosaminidases (*HEXM*) subunit was added to the PS813 gene-editing system in a genetical model of Sandhoff disease ("Sandhoff mice"). A promoterless hexosaminidases cDNA was integrated entirely into the ASHL (albumin "safe harbor" locus) using an adeno-associated virus two delivery (AAV) of the CRISPR system. After four months following the administration of the AAV vectors intravenously into the "Sandhoff mice" (*Hexb*<sup>-/-</sup>), the plasma level of 4-Methylumbelliferyl N-acetyl-bD-glucosaminide (4MUG) and 4-Methylumbelliferyl-6- sulfa-2-Acetoamido-2-Deoxy-beta-D-Glucopyranoside Potassium salt (MUGS) reached high levels compared to both wildtypes (*Hexb*<sup>+/+</sup>) and untreated (*Hexb*<sup>-/-</sup>) Sandhoff

This chapter describes briefly our recent project and research results published in the journal Gene therapy (IF= 4.128) [Ou, Li, MJ. Przybilla, Tăbăran AF, et al.. "A novel gene-editing system to treat both Tay-Sachs and Sandhoff diseases." *Gene therapy* (2020): 1-11.]. GM2-gangliosidoses are rare systemical lipid lysosomal-storage diseases manifested clinically mainly by neurological impairment and inducing premature death among children carrying genetically-inherited deficiency  $\beta$ -hexosaminidase. This lysosomal-enzyme defect leads to

mice group (17 and 1144 fold respectively). Furthermore, histological analysis with histochemical highlighting demonstrated the reduced GM2 ganglioside accumulation in the brain and liver of treated Sandhoff mice, further sustained by the HPLC-MS/MS measurement of the GM2 ganglioside.

Chapter 3.7. *"Development and Pathological Characterization of a New Transgenic Cancer Syndrome in the Syrian hamster (Mesocricetus auratus) by KCNQ1 Knockout using CRISPR/Cas9-mediated Gene Editing"* describes the novel creation and extensive pathological characterization of the first genetically engineered hamster (*Mesocricetus auratus*) cancer model. In this KO hamster model, the KCNQ1 deficiency-induced digestive lymphomas (mainly T cell lymphomas) and metastatic visceral hemangiosarcomas, indicating the KCNQ1 as a protooncogene.

Chapter 3.8. *"Metallic gold-silver nanoparticles for therapy of intracellular Mycobacteria"* presents the author's interest in the field of medical nanobiomaterials, mainly on employing different nanoconstructs in the therapy of infectious diseases. This chapter extensively describes the current paradigm regarding the treatment of acid-fast bacteria using metallic nanoparticles, their limits, and future challenges. However, most of this topic's points are included in our recent paper published in the International Journal of Nanomedicine (IF= 5.112) [Tăbăran, AF et al., 2020. "Silver nanoparticles for the therapy of tuberculosis" *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2231.] we will also describe some of our latest observations and experiences on this particular topic.



**Fig.6.** Main aspects related to the pathogenesis and microscopical lesions induced by *Mycobacterium spp* (Tăbăran et al. 2020)

Here, we explored in detail the main pathological features of mycobacteria and tuberculosis pathogenesis and the main antibacterial mechanisms of the silver nanoparticle (both *per se* due to the  $\text{Ag}^+$  and the agonistic mechanism in combination with several antibiotics as rifampicin). We also provided an extensive analysis of the

advantages and limitations of using silver nanoparticles in the therapy of tuberculosis. Overall, the local and systemic administration of various forms of silver nanoparticles (AgNPs) proves *both in vitro* and *in vivo* promising results for mycobacterial-induced disease therapy in animals and humans. Although due to the thick wall of the *Mycobacterium spp*, the therapeutic efficiency of  $\text{Ag}^+$  is reduced compared with G- and G+ bacteria, the conjunction of AgNPs with several types of old antibiotics significantly enhances the overall antibacterial effect. The main limitations of the AgNPs therapy are the low intralésional accumulation into the mycobacterium-induced granulomas and possible acquisition of resistance mechanism (similar to the antibioresistance) towards metallic Ag.

## 1. REZUMAT

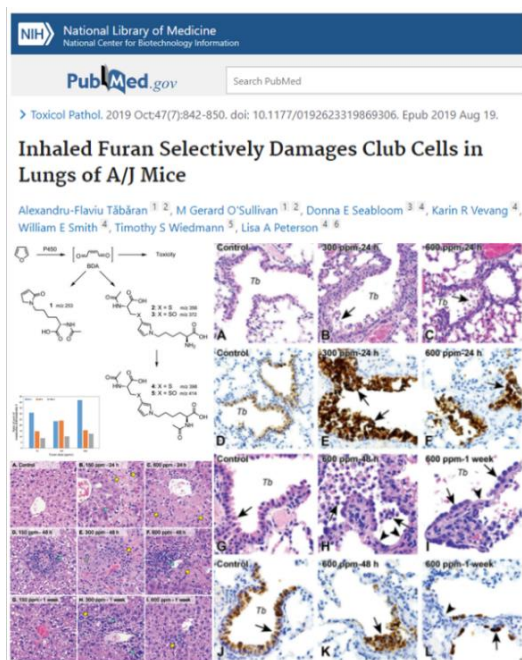
Această teză de abilitare prezintă principalele rezultate profesionale și de cercetare obținute de autor în activitatea științifică din domeniul patologiei veterinare, de la momentul susținerii tezei de doctorat și obținerea titlului de doctor în Medicină Veterinară (Anatomie normală și patologică) în 2012 până în prezent, precum și planurile viitoare de dezvoltare a carierei, rețeaua de cercetare dezvoltată și proiecte profesionale ce urmează să fie finalizate.

Teza curentă de abilitare, intitulată „*Patologia Comparata și Nanomateriale Medicale: Stadiul Actual și Perspective*” prezintă principalele studii și rezultate relevante obținute recent de autor, incluzând subiecte specifice din aria patologiei veterinare comparate și patobiologiei, precum și nanomedicină, date selectate din cele 82 de articole publicate în reviste indexate în Web of Science (Core Collection) și 65 lucrări publicate în reviste cotate BDI (altele decât WOS).

După o scurtă introducere care prezintă curriculum-ul autorului (Capitolul 2), teza va acoperi principalele rezultate științifice ale autorului (Capitolul 3), acestea fiind structurate în 8 capitole (Capitolele 3.1-3.8) și va acoperi lucrările din domeniul patologiei comparate și nanomedicinii (în principal utilizarea nanoparticulelor metalice în terapia infecțioase bacteriene intracelulare / intramacrofagice patogeni). În cele din urmă, principalele planuri de dezvoltare ale carierei și proiectele profesionale viitoare vor fi detaliate în capitolul final al acestei lucrări (capitolul 4).

Capitolul 3.1. „*Investigații Patologice și Toxicologice a Efectelor Sistemice Induse de expunerea Respiratorie la Furan a Șoarecilor A/J*” prezintă efectul sistemic al furanului, un compus toxic frecvent prezent în

alimentele prăjite și fumul de tutun. Deși sunt progrese recente ce ajută înțelegerea toxicității compușilor organici heterociclici, iar efectul oral al furanului a fost studiat, puține studii au abordat efectele toxice care pot apărea în urma expunerii sistemice inhalatorii la acest compus. După expunerea orală sistemică, furanul este atât hepatotoxic, cât și cancerigen la rozătoare. Pe larg, patogenеза, principalele proceduri și rezultatele acestui capitol sunt prezentate în publicația noastră anterioară [Tăbăran, AF, "Inhaled furan selectively damages club cells in lungs of A/J mice." *Toxicologic pathology* 47, no. 7 (2019): 842-850.]



**Fig.1.** Aspecte cheie legate de toxicitatea sistemică la șoareci A/J după expunere la furan (Tăbăran et al. 2019)

de ore și 1 săptămână. Examenul histopatologic a evidențiat necroza difuză a celulelor Clara, cu denudare extinsă și severă a căilor respiratorii superioare (pentru grupurile de 300 și 600 ppmv). La 7 zile după modificările descrise mai sus, există regenerarea celulelor Clara și repararea parțială a defectului

Șoarecii adulți, (femele A/J) (tulpina albino consangvinizată în mod special susceptibilă la carcinogeneza pulmonară indusă chimic) au fost expuse respirator în camere de inhalare timp de 3 ore la furan în concentrații crescătoare (grupuri cuprinse între 0, 30, 75, 150, 300 sau furan 600 ppmv), iar ulterior, patologia completă și toxicocinetica furanului au fost efectuate în dinamică la 24, 48

epitelial-respirator. De asemenea, hepatotoxicitatea acută a fost detectată în grupul expus la 150 ppmv furan, constând în necroză lobulară zonală și mineralizare hepatocitară. Regenerarea hepatocitelor a fost observată la o săptămână după expunere. Interesant este faptul că grupul expus la 300 ppmv a prezentat mineralizare hepatică multifocală centrolobulară ce a indus local un răspuns inflamator granulomatos de corp străin inert. Observațiile studiului nostru demonstrează că furanul inhalat este extrem de toxic pulmonar (vizând în principal celulele Clara) și hepatic în urma distribuției sistemice a intermediarilor toxici. Nu au fost observate modificări induse toxic în celelalte organe examinate.

Capitolul 3.2. „*Aspectele Patologice ale Larvei Migrans Cutanate și Sistemice Cauzate de Alaria alata (Goeze, 1792) la Nurca Europeană (Mustela lutreola)*” prezintă contribuțiile autorului în patologia bolilor infecțioase prin descrierea în premieră a leziunilor histopatologice ale *larvei migrans* induse de *Alaria alata* la animale. Acest capitol prezintă pe larg



**Fig.2.** Aspectele patologice ale larvei migrans induse de *Alaria alata* (Tăbăran et al. 2013)

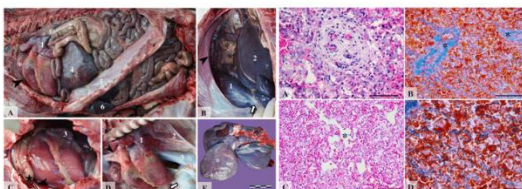
nurca europeană (*Mustela lutreola*), demonstrând tipul de leziune,

observațiile noastre cheie publicate în jurnalul oficial al Centrul pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (CDC), Emerging Infectious Diseases (ISI IF = 6.259) [Tăbăran, Flaviu, et al. "Alaria alata infection in European mink." *Emerging infectious diseases* 19, no. 9 (2013): 1547.]. Aici, am descris modificările macroscopice și histopatologice asociate cu larva migrans indusă de *Alaria alata* la

principalele țesuturi afectate (țesutul subcutanat și mușchiul scheletic) și câteva caracteristici legate de patobiologia particulară a acestei parazitoze. Au fost aduse argumente puternice pentru patogeniza naturii polifazice-polimusculare a leziunilor induse de mesocercariile parazitului, date ce indică migrarea continuă și reacția inflamatorie secundară declanșată de distrugerea directă a țesuturilor.

Capitolul 3.3. „*Hernia Diafragmatică Pleuroperitoneală Congenitală și Aplazia Pericardică la Cal*” descrie pentru prima dată la ecvine, un defect congenital complex, aplazia pericardică asociată cu hernia diafragmatică.

Capitolul prezintă pe scurt observațiile noastre publicate anterior în BMC Veterinary Research (IF=1.83) [Tăbăran, Alexandru-Flaviu, et al., "Congenital diaphragmatic hernia with concurrent aplasia of the pericardium in a foal." BMC Veterinary Research 11, no. 1 (2015): 1-7].



**Fig. 3.** Aspecte macroscopice și histologice ale aplaziei pericardice și a herniei diafragmatice congenitale la un mânz (Tăbăran et al. 2015)

În acest capitol am descris un defect congenital complex, hernia diafragmatică congenitală la un mânz friesian, defect asociat concomitent cu alte câteva malformații (transpoziții viscerale, staze cronice, etc.) printre care și aplazie pericardică severă. Hernia diafragmatică (ce corespunde herniei Bochdalek de la copii) a fost asociată cu

deplasare toracică a organelor digestive abdominale și hipoplazie pulmonară severă. Ca și la om, la cal hernia diafragmatică congenitală are grade variabile de severitate, implicând în acest caz un defect muscular mare și

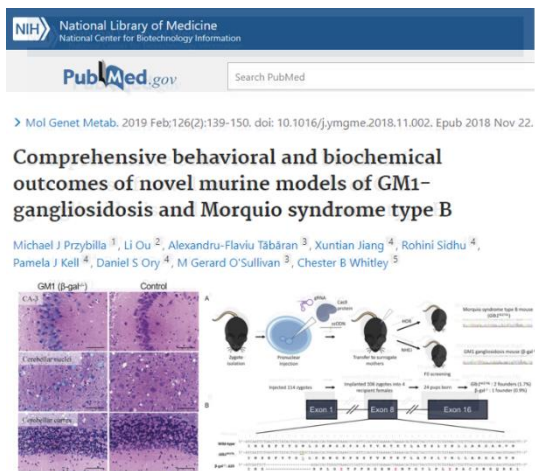


modificări secundare pulmonare severe. Acest caz reprezintă primul raport al acestei asocieri de malformații congenitale la cai și, de asemenea, prima descriere a aplaziei pericardice la această specie. Având în vedere că la alte specii, cum ar fi primatele și câinii, această patologie are o incidență relativ mare, chiar dacă în general fără consecințe clinice importante, la ecvine aplazia pericardică poate fi o patologie subdiagnosticată, cerând o examinare mai bună a pericardului, în special în contextul herniei diafragmatice congenitale.

Capitolul 3.4 *„Tumorile Cerebrale la Câine: Caracteristici Patologice, Epidemiologie și Perspective în Stabilirea Căinelui ca Model Natural Pentru Dezvoltarea Terapiilor Noi pentru Tumorile Gliale”* prezintă implicarea recentă a noastră în cercetarea patobiologiei tumorilor cerebrale și se bazează pe un studiu larg (o cohortă de 95 câini, 39 femele și 56 masculi) cu tumori cerebrale. Capitolul rezumă observațiile noastre anterioare publicate în revista *Cancer Investigation* (IF = 2.398) (Hubbard, și colab. 2018). În efortul de a găsi modele experimentale mai bune pentru a ajuta înțelegerea tumorilor cerebrale la om și pentru a cește relevanța studiilor preclinice pentru studiile terapiilor oncologice, câinele a apărut ca un model alternativ cu numeroase avantaje față de modelele clasice. Acest lucru se datorează epidemiologiei acestor tumori la câine, asemănătoare cu cea de la om și similitudinii mari atât în morfologie, cât și în biologie, cu gliomele umane. De asemenea, datorită dimensiunii mari a SNC, care permite investigații clinice și paraclinice complexe, câinele îndeplinește criteriile unui model mai bun pentru aceste tumori în comparație cu modelele de rozătoare. În studiul nostru, rasele brahicefalice au fost supraexprimate, iar cele mai frecvent diagnosticate tumori ale SNC au fost gliomele (astrocitoamul, urmat de oligodendrogliomul de grad înalt). De asemenea, clasificarea histopatologică și sistemul de gradare propus pentru tumorile

gliale s-a dovedit a fi utile în determinarea prognosticului. Astfel, supraviețuirea câinilor cu tumori cerebrale (gradele II-IV) a fost major influențată atât de tipul cât și de gradul histologic. În cele din urmă, în acest studiu, am stabilit datele normative comparative pentru utilizarea câinilor cu tumori gliale naturale ca platformă preclinică pentru testarea noilor terapii (ex. chimioterapia, radioterapia și imunoterapia), inclusiv regimuri de tratament multimodal, concepute pentru gliomele umane.

Capitolul 3.5 „*Dezvoltarea și Descrierea Patologică-fenotipică a Unui Nou Model Transgenic Murin de Gangliozidoză-GM1 și de Mucopolizaharidoză de tip IV / Sindrom Morquio tip B*” descrie dezvoltarea unui tratament genetic prin editarea *in vivo* a genomului pentru tratamentul a două boli genetice de stocare lizozomală: Gangliozidoza GM-1 și Mucopolizaharidoza de tip IV / Sindromul tip Morquio-tip B.



**Fig.4.** Caracteristicile patologice și construcția genetică a modelului de gangliozidoză GM1 și sindrom Morquio de tip B la șoareci (Przybilla et al. 2019)

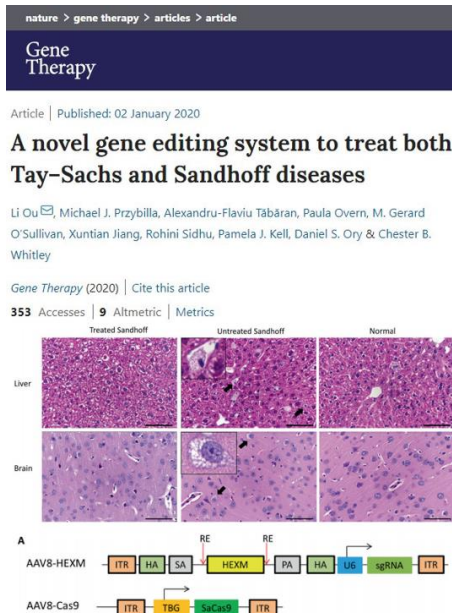
Pe larg, datele acestui proiect au fost publicate de noi în revista Molecular genetics and metabolism (IF=4.17) [Przybilla, M, Li Ou, Tăbăran, AF et al. "Comprehensive behavioral and biochemical outcomes of novel murine models of GM1-gangliosidosis and Morquio syndrome type B." *Molecular genetics and metabolism* 126, no. 2 (2019): 139-150.].

În acest proiect au fost obținute două modele murine de boli metabolice de stocare lizozomală: gangliozidoza GM1 și sindromul Morquio tip B. În continuare cele două

modele au fost folosite ca platformă experimentală de testare a terapiei genetice utilizând sistemul de editarea genică CRISPR-Cas9. Deficiențele genetice de hidrolază lizozomală  $\beta$ -galactozidază ( $\beta$ -gal) sunt responsabile la om pentru dezvoltarea unui tip distinct de mucopolizaharidoză constând în două entități clinice, prima manifestată în principal ca o boală osteoscheletală (sindromul Morquio tip B / mucopolizaharidoză tip IVB) iar a doua în principal ca boală neurodegenerativă (gangliozidoza GM1). Pentru a recapitula experimental defectul genetic uman la șoarece s-a utilizat editarea genomului prin CRISPR-Cas9 și au fost produși șoareci Glb1W274L (mutația W274L a fost introdusă în gena Glb1)  $\beta gal^{-/-}$ . Modelul de murin generat a arătat, așa cum era de așteptat, o reducere marcată a activității enzimei  $\beta$ -galactozidazei, dar nu a demonstrat niciun fenotip osteoscheletal marcat după un an de la inducție. În schimb, șoarecii  $\beta$ -gal<sup>-/-</sup> sunt lipsiți de activitate enzimatică  $\beta$ -gal (demonstrată biochimic), rezultând disfuncții neuromotorii și neurocognitive severe și acumularea marcantă a gangliozidelor în sistemul nervos central, preponderent neuronal.

Capitolul 3.6. „**Dezvoltarea și Caracterizarea Patologică a Unui Nou Sistem de Editare Genetică bazat pe CRISPR-Cas9 pentru Terapia Gangliozidozelor GM2 (boli Tay-Sachs și Sandhoff)**” prezintă un alt proiect al nostru în domeniul patologiei comparative și terapiei bolilor de stocare lizozomală la animale. Acesta descrie dezvoltarea unui model experimental și tratamentul genetic prin editarea *in vivo* a genomului murin pentru terapia a două gangliozidoze GM2 sistemice: boala Tay–Sachs (defect de hexosaminidaze-A) și boala Sandhoff (deficit de hexosaminidază B). Capitolul prezintă rezultatele recente al unui proiect publicat în revista Gene therapy (IF= 4.128), [Ou, Li, M. Przybilla, Tăbăran AF, et al. "A novel gene editing system to treat both Tay–Sachs and Sandhoff diseases." *Gene therapy* (2020): 1-11]. Gangliozidozele GM2 sunt boli genetice sistemice de

stocare lizozomală, manifestate clinic în principal prin afectarea neurologică și, în cele din urmă, inducând moartea prematură în rândul copiilor care prezintă deficiența genetică a  $\beta$ -hexosaminidazei. Acest defect enzimatic lizozomal conduce la acumularea ulterioară intracelulară (neuronală, hepatocitară, macrofage, celule gliale etc.) al glicolipidelor din grupul gangliozidelor GM2.



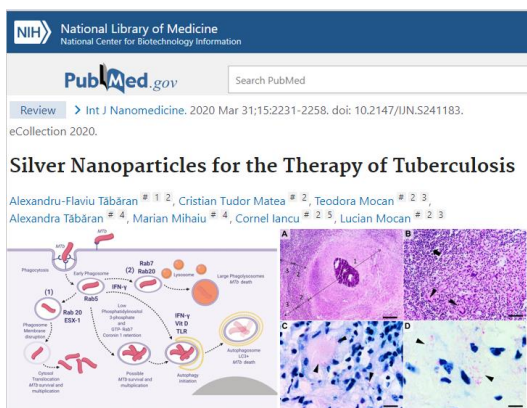
**Fig.5.** Caracteristicile patologice și construcția genetică a modelului murin de gangliozidoză GM2- și sindrom Sandhoff (Ou et al. 2020)

vectorilor AAV2 la șoarecii Sandhoff (*Hexb*<sup>-/-</sup>), nivelul plasmatic al 4-metilumbeliferil N-acetil-bD-glucozaminidei (4MUG) și 4-metilumbeliferil-6- sulfa-2 (Glucopiranozidă-MUGS) a atins niveluri ridicate comparativ atât cu fenotipul normal cât și cu grupul de șoareci Sandhoff netratat (144 și 17 ori). Mai mult, analiza HPLC-MS / MS și analiza histologică au demonstrat o acumulare redusă a gangliozidelor GM2 la nivel hepatic și în encefal la șoarecii Sandhoff tratați comparativ cu cei din grupul control pozitiv.

Prin aplicarea sistemului de editare genetică (tehnica de editare CRISPR-Casp), subunitatea hexosaminidazelor (HEXM) a fost inserată genic într-un model murin de boală Sandhoff („șoareci Sandhoff”/ *Hexb*<sup>-/-</sup>). Astfel, un fragmnat ADNc de hexosaminidaze (HEXM) fără promotor a fost integrat la nivelul ASHL (“albumin safe harbor locus”) utilizând o livrare mediată de adenovirusul 2 (AAV2) a sistemului CRISPR. După 4 luni de la administrarea intravenoasă a

Capitolul 3.7 „*Dezvoltarea și Caracterizarea Fenotipică a Unui Nou Sindrom de Cancer Transgenic la Hamsterul Sirian (Mesocricetus auratus) Prin Eliminarea KCNQ1 Folosind Editarea Genomică Bazată pe Sistemul CRISPR-Cas9*” prezintă crearea și descrierea patologică extinsă a primului model oncologic-genetic la hamster (*Mesocricetus auratus*). În acest model de hamster KO, deficiența KCNQ1 a fost asociată cu producerea de limfoame digestive (în principal limfom cu celule T) și hemangiosarcoame viscere metastatice.

Capitolul 3.8. „*Nanoparticulele Metalice de Aur-Argint pentru Terapia Micobacteriilor Intracelulare*” prezintă interesul autorului pentru domeniul nanobiomaterialelor medicale, în principal pentru utilizarea diferitelor nanoparticule metalice în terapia bolilor infecțioase.



**Fig.6.** *Principalele aspecte legate de patogeneza și leziuni microscopice induse de Mycobacterium spp (Tăbăran et al. 2020)*

În acest capitol, descriem pe larg paradigma actuală în ceea ce privește terapia micobacteriilor folosind nanoparticule metalice, limitele acestora și provocările viitoare legată de utilizarea acestor particule în tratamentul bolilor infecțioase. Deși majoritatea punctelor acestui subiect sunt incluse în lucrarea noastră recentă publicată în

International Journal of Nanomedicine (IF= 5.112) [Tăbăran, A. F. et al., 2020. „Silver nanoparticles for the therapy of tuberculosis” *International journal of nanomedicine*, 15, 2231] în acest capitol vom descrie, de asemenea, câteva dintre cele mai recente observații experimentale ale autorului din acest subiect. Aici am explorat în detaliu caracteristicile

patologice ale micobacteriilor, patogeniza tuberculozei și principalele mecanisme antibacteriene ale nanoparticulelor de argint (datorate  $\text{Ag}^+$  și mecanismului agonistic cu mai multe tipuri de antibiotice). De asemenea, capitoul prezintă avantajele și limitările utilizării nanoparticulelor de argint în terapia tuberculozei. În general, administrarea locală și sistemică a diferitelor forme de nanoparticule de argint (AgNPs) arată atât *in vitro*, cât și *in vivo* rezultate promițătoare în terapia bolilor micobacteriene la animale și oameni. Deși datorită peretelui gros al micobacteriilor, eficiența terapeutică a  $\text{Ag}^+$  este redusă în comparație cu bacteriile G- și G+, conjugarea AgNPs cu mai multe tipuri de antibiotice îmbunătățește semnificativ efectul antibacterian al acestora. Principalele limitări ale terapiei cu AgNPs sunt acumularea intralezională scăzută în granuloamele micobacteriene și posibila dobândire a rezistenței la (similar cu antibioretistența) la Ag metalic.

## REFERENCES

1. Ou, Li, Michael J. Przybilla, Alexandru-Flaviu Tăbăran, Paula Overn, M. Gerard O'Sullivan, Xuntian Jiang, Rohini Sidhu, Pamela J. Kell, Daniel S. Ory, and Chester B. Whitley. "A novel gene editing system to treat both Tay–Sachs and Sandhoff diseases." *Gene therapy* (2020): 1-11.
2. Przybilla, Michael J., Li Ou, Alexandru-Flaviu Tăbăran, Xuntian Jiang, Rohini Sidhu, Pamela J. Kell, Daniel S. Ory, M. Gerard O'Sullivan, and Chester B. Whitley. "Comprehensive behavioral and biochemical outcomes of novel murine models of GM1-gangliosidosis and Morquio syndrome type B." *Molecular genetics and metabolism* 126, no. 2 (2019): 139-150.
3. Rong Li., Jinxin Miao, Alexandru-Flaviu Tăbăran, M. Gerard O'Sullivan, Kyle J. Anderson, Patricia M. Scott, Zhongde Wang, and Robert T. Cormier. "A novel cancer syndrome caused by KCNQ1-deficiency in the golden Syrian hamster." *Journal of carcinogenesis* 17 (2018).
4. Tăbăran, Alexandru-Flaviu, Cristian Tudor Matea, Teodora Mocan, Alexandra Tăbăran, Marian Mihaiu, Cornel Iancu, and Lucian Mocan., 2020 "Silver Nanoparticles for the Therapy of Tuberculosis." *International Journal of Nanomedicine* 15: 2231.
5. Tăbăran, Alexandru-Flaviu, et al. "Congenital diaphragmatic hernia with concurrent aplasia of the pericardium in a foal." *BMC Veterinary Research* 11.1 (2015): 1-7.
6. Tăbăran, Alexandru-Flaviu, M. Gerard O'Sullivan, Donna E. Seabloom, Karin R. Vevang, William E. Smith, Timothy S. Wiedmann, and Lisa A. Peterson. "Inhaled Furan Selectively Damages Club Cells in Lungs of A/J Mice." *Toxicologic pathology* 47, no. 7 (2019): 842-850.
7. Tăbăran, Flaviu, Attila David Sándor, Mihai Marinov, Cornel Cătoi, and Andrei Daniel Mihalca. "Alaria alata infection in European mink." *Emerging Infectious Diseases* 19, no. 9 (2013): 1547.
8. Tăbăran, Flaviu, Gerrald O'Sullivan, Elisabeth Pluhar, Expression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'- phosphodiesterase (CNPase) in canine oligodendrogliomas, (ACVP/ASVCP concurrent annual meeting Washington), 2018.