



**ACADEMIA ROMÂNĂ**  
**Școala de Studii Avansate a Academiei Române**  
**Institutul de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae**  
**Simionescu”**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Modificări ale celulelor cardiace determinate de expresia aberantă a  
unor miARN-uri asociate cu îmbătrânirea

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:**  
**Dr. ALEXANDRINA BURLACU**

**DOCTORAND:**  
**EVELYN-GABRIELA NASTASE-RUSU**

## CUPRINS

<b>LISTA ABREVIERI.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCERE .....</b>	<b>10</b>

### PARTEA I- STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

<b>I. ROLUL ÎMBĂTRÂNIRII ÎN APARIȚIA BOLILOR CARDIACE .....</b>	<b>17</b>
I.1 Caracteristici ale îmbătrânirii.....	17
I.2 Modificări cardiace asociate cu îmbătrânirea .....	23
I.3 Remodelarea cardiacă în miocardul bătrân cu boală cardiacă ischemică .....	34
<b>II. FIBROBLASTUL CARDIAC .....</b>	<b>42</b>
II.1 Caracteristici generale .....	42
II.2 Fibroblastul cardiac în homeostazia cardiacă .....	46
II.3 Fibroblastul cardiac în fibroză.....	49
<b>III. MICROARN ÎN ÎMBĂTRÂNIREA CARDIACĂ ȘI ÎN PATOLOGII ASOCIATE ÎMBĂTRÂNIRII.....</b>	<b>56</b>
III.1 Nomenclatura și organizarea genomică a microARN-urilor.....	58
III.2 Biogeneza moleculelor de miARN .....	60
III.3 Mecanismele de acțiune ale miARN-urilor.....	65
III.4 Dereglarea microARN-urilor în îmbătrânirea cardiacă și bolile cardiace asociate..	67
III.5 MicroARN în terapia fibrozei cardiace .....	71

### PARTEA II-CONTRIBUȚII ORIGINALE

<b>I. MIARN IMPLICATE ÎN PROCESUL DE ÎMBĂTRÂNIRE NATURALĂ: IMPACTUL ASUPRA BOLILOR CARDIOVASCULARE.....</b>	<b>74</b>
Creșterea expresiei miR-29a în îmbătrânire ca un posibil mecanism compensator împotriva fibrozei cardiace prin reducerea nivelelor de Serpinh1 .....	74
I.1 Introducere și obiective .....	74
I.2 Protocoale experimentale și metode de analiză.....	75
I.3 Rezultate.....	82
I.4 Discuții și concluzii .....	99
<b>II. INVESTIGAREA UNOR MOLECULE DE MIARN CU EXPRESII SCĂZUTE ÎN FIBROBLAȘTII CARDIACI ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ .....</b>	<b>106</b>
Introducere și obiective .....	106
<b>II.1 Izolarea și caracterizarea fibroblaștilor și cardiomiocitelor murine .....</b>	<b>107</b>
II.1.1 Protocoale experimentale și metode de analiză .....	107
II.1.2 Rezultate .....	117
II.1.3 Discuții și concluzii.....	127
<b>II.2 MiARN-urile generate de locusul Meg3-Mirg sunt scăzute în timpul îmbătrânirii</b>	

II.1.2 Rezultate .....	117
II.1.3 Discuții și concluzii.....	127
<b>II.2 MiARN-urile generate de locusul Meg3-Mirg sunt scăzute în timpul îmbătrânirii naturale .....</b>	<b>128</b>
II.2.1 Protocoale experimentale și metode de analiză .....	128
II.2.3 Rezultate .....	133
II.2.4 Discuții și concluzii.....	152
<b>III. INVESTIGAREA UNOR MOLECULE DE MIARN CU EXPRESII CRESCUTE ÎN FIBROBLAȘTII CARDIACI ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ .....</b>	<b>156</b>
III.1 Introducere și obiective .....	156
III.2 Protocoale experimentale și metode de analiză .....	157
III.3 Rezultate .....	169
III.4 Discuții și concluzii .....	194
<b>CONCLUZII GENERALE ALE TEZEI .....</b>	<b>202</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>206</b>
<b>EFICIENȚA ȘI DISEMINAREA CERCETĂRILOR.....</b>	<b>239</b>
<b>FINANȚAREA CERCETĂRILOR ȘI COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE .....</b>	<b>243</b>

## **REZUMAT**

Cuvinte cheie: Îmbătrânire; Fibroză cardiacă; miARN; Fibroblast; Infarct miocardic; Remodelare maladadaptativă; Serpinh1; Lpar2

Număr total pagini – 243

Număr de figuri în partea I – 22

Număr de tabele în partea I – 0

Număr de figuri în partea a II-a – 68

Număr de tabele în partea a II-a – 4

Indicații bibliografice – 442

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate ISI – 8 (2 autor principal)

Comunicări orale prezentate la manifestări științifice internaționale – 2 comunicări

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 5

Specializări și cursuri efectuate – 2

Premii – 2

Participarea în proiecte de cercetare – 7

## Introducere și obiective

Creșterea longevității a stimulat interesul oamenilor de știință pentru înțelegerea mecanismelor fundamentale care stau la baza îmbătrânirii naturale. Îmbătrânirea este un fenomen extrem de complex și insuficient înțeles, care implică un declin treptat al funcțiilor la nivel celular și la nivelul organelor, conducând la o incidență crescută a bolilor cronice. Multe modificări genetice și epigenetice, precum și dezechilibre ale proceselor biochimice, sunt strâns legate de îmbătrânire, unele dintre acestea fiind recunoscute ca semne caracteristice ale acestui proces (Gupta et al., 2014). Potrivit raportului *World Heart Report* din 2023, deși rata mortalității standardizate în funcție de vârstă a scăzut cu o treime între anii 1990 și 2019, acestea rămân principala cauză de mortalitate în lume, numărul deceselor provocate de acestea crescând până la 33% în ultimii 30 de ani (<https://heartreport23.world-heart-federation.org/>).

Modificările structurale și funcționale care apar în îmbătrânire la nivelul inimii duc în final la insuficiența cardiacă (North and Sinclair, 2012). Principalele manifestări asociate cu îmbătrânirea cardiacă sunt reprezentate de fibroză (Biernacka and Frangogiannis, 2011), inflamație cronică (Ferrucci and Fabbri, 2018), hipertrofie (Olivetti et al., 2000) și angiogeneză afectată (Lähteenvuo and Rosenzweig, 2012). Când se examinează structura și funcția inimii, atenția se îndreaptă frecvent către cardiomiocite, chiar dacă fracția de celule non-miocitară reprezintă majoritatea celulelor din inimă. Această fracție include diverse tipuri celulare printre care fibroblaștii cardiaci, un grup eterogen și dinamic de celule care joacă un rol esențial, atât la nivel funcțional, cât și structural, în homeostazia cardiacă, atât în condiții normale, cât și patologice. Fibroblaștii cardiaci reprezintă aproximativ 15% din numărul total de celule în miocardul șoarecelui adult, fiind distribuiți printre cardiomiocite și posedă un program molecular specific ce le permite să integreze și să răspundă rapid la semnalele extracelulare după o leziune (Tallquist and Molkentin, 2017). Activarea căilor de semnalizare fibrotice datorită stimulilor de stres din îmbătrânire determină formarea fibrozei și hipertrofiei cardiace. Acestea sunt două semne importante ale îmbătrânirii cardiace fiind strâns interconectate și declanșate reciproc. În consecință, îmbătrânirea cardiacă este asociată cu disfuncție diastolică și insuficiență cardiacă cu funcție sistolică păstrată (HFpEF), având un efect negativ asupra populației în vârstă (Singam et al., 2020).

Infarctul miocardic (IM) reprezintă unul dintre cele mai devastatoare evenimente cardiovasculare iar îmbătrânirea crește riscul de IM și, mai mult, agravează și evoluția post-

infarct, întrucât inimile vârstnicilor prezintă o angiogeneză deficitară, o rezoluție ineficientă a inflamației și o capacitate regenerativă redusă (Olivetti et al., 1991, Dai et al., 2012). O caracteristică esențială a acestei remodelări maladapive este fibroza cardiacă, definită prin depunerea excesivă de proteine ale matricei extracelulare (MEC), în special colagen. Deși fibroza stabilizează inițial miocardul lezat, acumularea excesivă de MEC compromise complianța ventriculară, perturbă funcția electrică și, în cele din urmă, duce la apariția insuficienței cardiace (Travers et al., 2016).

Fibroblaștii cardiaci sunt principalii contribuitori la fibroza post-IM, însă ei influențează și alte aspecte ale răspunsului de vindecare, precum inflamația (Theall and Alcaide, 2022) și maturarea cicatricii (Daseke et al., 2020). Dereglarea activării fibroblaștilor cardiaci în fazele precoce după leziune duce la vindecare deficitară și la agravarea performanței cardiace (Deb and Ubil, 2014). Totuși, aceeași cicatrice fibroasă care este inițial critică pentru supraviețuire, ulterior afectează contractilitatea și contribuie la disfuncția sistolică și la insuficiența cardiacă cronică (Smolgovsky et al., 2021).

La nivel molecular, tot mai multe dovezi subliniază importanța microRNA-urilor (miRNA) în îmbătrânirea și patologia cardiovasculară. Astfel, anumite miRNA-uri au fost implicate în patogeneza infarctului miocardic și a remodelării fibrotice având roluri pro- sau anti-fibrotice (Thum et al., 2008, van Rooij et al., 2008). Descoperirea legăturii dintre miARN-uri și anumite patologii a generat un interes semnificativ pentru explorarea potențialului acestora ca nouă clasă de medicamente, iar succesul global al vaccinurilor ARNm împotriva SARS-CoV-2 a sporit interesul pentru imunoterapiile bazate pe ARN. Astfel, terapiile pe bază de ARN au devenit opțiuni reale de tratament (Seyhan, 2024).

Pe baza acestor considerente **ipoteza** de la care am plecat susține că dereglarea profilului de expresie a miRNA-urilor în îmbătrânire afectează mecanismele moleculare de menținere a homeostaziei și determină atât deteriorarea funcțională sistemică, cât și declanșarea unor procese patologice, cum ar fi fibroza cardiacă și remodelarea maladapivă după infarctul miocardic. Astfel, **scopul** tezei a fost să exploreze rolul miARN-urilor ca regulatori cheie ai homeostaziei celulare și ca potențiale ținte terapeutice capabile să blocheze procesele patologice, precum remodelarea matricei extracelulare și fibroza cardiacă, contribuind astfel la identificarea unor strategii inovatoare pentru promovarea îmbătrânirii sănătoase și prevenirea complicațiilor asociate vârstei. Pentru a îndeplini acest scop, activitatea mea de cercetare în perioada doctoratului a urmărit următoarele **obiective specifice**:

1. Identificarea profilului de expresie a miRNA-urilor implicate în fiziopatologia sistemului

- cardiovascular în populații individuale de celule cardiace izolate de la șoareci bătrâni;
2. Evaluarea *in vitro* a efectelor miARN-urilor asociate îmbătrânirii asupra fibroblaștilor cardiaci, prin analiza impactului lor asupra fenotipului pro-fibrotic și a căilor de semnalizare implicate în îmbătrânire (inflamație și remodelare tisulară);
  3. Determinarea efectului terapeutic al modularii expresiei miRNA asupra remodelării maladaptative post-IM în îmbătrânire.

---

## Structura tezei de doctorat

---

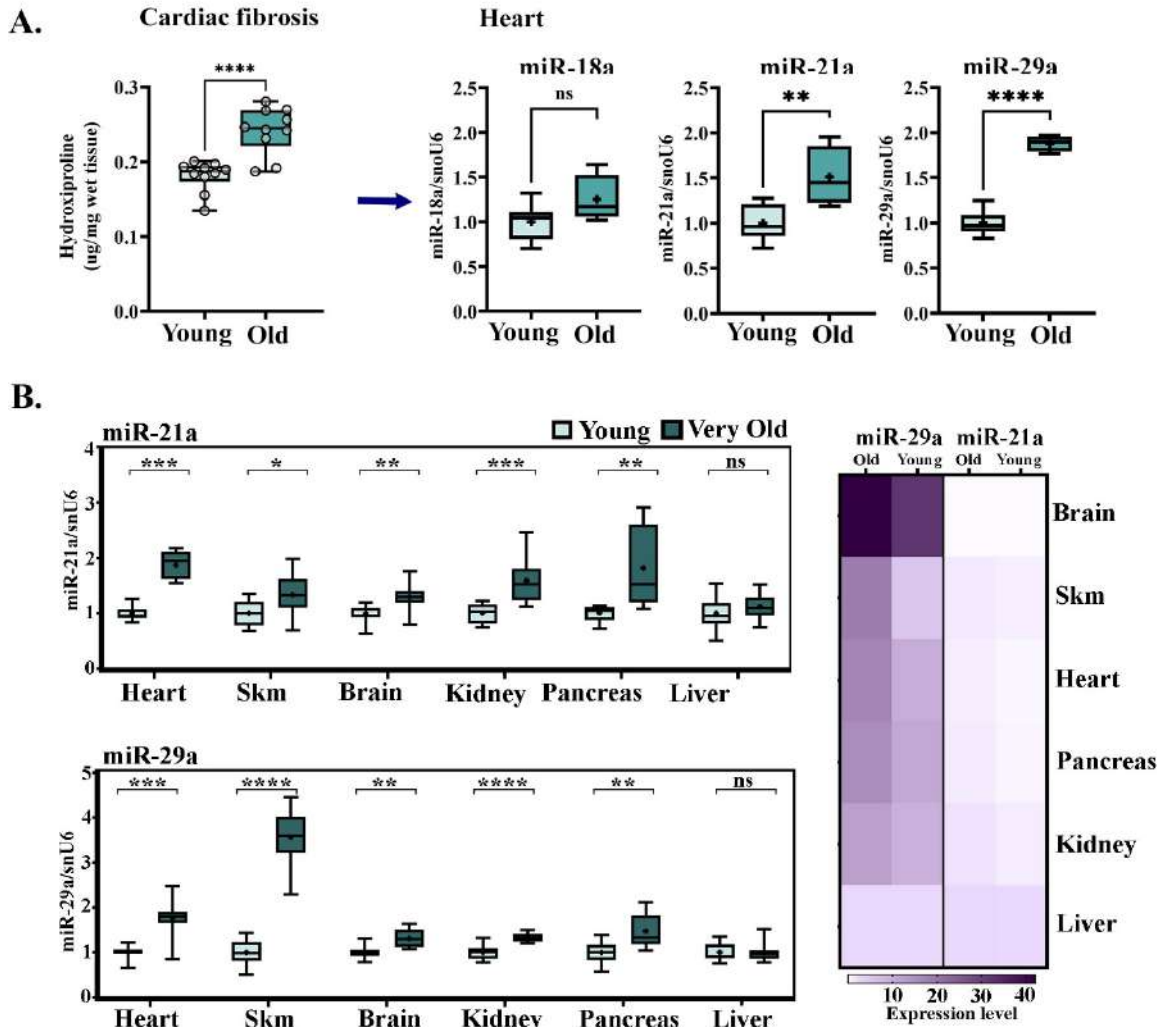
Teza de doctorat este formată din două părți principale:

**Partea I-Studiul actual al cunoașterii** este divizată în trei capitole. **Capitolul 1** intitulat *”Rolul îmbătrânirii în apariția bolilor cardiace,,* abordează aspecte despre trăsăturile generale ale îmbătrânirii, modificările cardiace asociate cu îmbătrânirea și se concentrează în final pe informații privind remodelarea cardiacă în miocardul bătrân cu boală cardiacă ischemică. **Capitolul 2** denumit *”Fibroblastul cardiac,,* evidențiază aspecte privind fibroblastul cardiac de la trăsăturile generale până la rolul acestui tip celular în homeostazia și fibroza cardiacă. În final, **capitolul 3** se axează pe descrierea rolului *”miRNA-urilor în îmbătrânirea cardiacă și în patologii asociate îmbătrânirii,,*. Acest capitol cuprinde o analiză a literaturii de specialitate privind nomenclatura și organizarea genomică a microARN-urilor, biogeneza acestora, mecanismele de acțiune și dereglarea microARN-urilor în îmbătrânirea cardiacă și bolile cardiace asociate. În final capitolul se sfârșește cu descrierea studiilor preclinice ce vizează utilizarea miARN în terapia fibrozei cardiace.

**Partea II-Contribuții originale** descrie rezultatele originale corespunzătoare studiilor desfășurate pentru atingerea obiectivelor tezei. Astfel, aceasta parte este împărțită în trei capitole a căror rezultate și concluzii sunt sintetizate mai jos:

**Capitolul 1- MIARN IMPLICATE ÎN BOLILE CARDIOVASCULARE: ANALIZĂ ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ,** cuprinde studiul intitulat *”Creșterea lui miR-29a în îmbătrânire poate fi un mecanism compensator împotriva fibrozei cardiace prin scăderea proteinei Serpinh1,,*. În acest studiu ne-am concentrat pe identificarea rolurilor a patru miRNA (miR-18a, miR-21, miR-22 și miR-29a) cunoscute a fi implicate în boli cardiovasculare în procesul de îmbătrânire cardiacă. Folosind tehnici de biologie moleculară, biochimie și culturi celulare, descrise în secțiunile *„Protocoale experimentale și metode de analiză”* am arătat că fibroza cardiacă asociată îmbătrânirii este însoțită de o creștere a

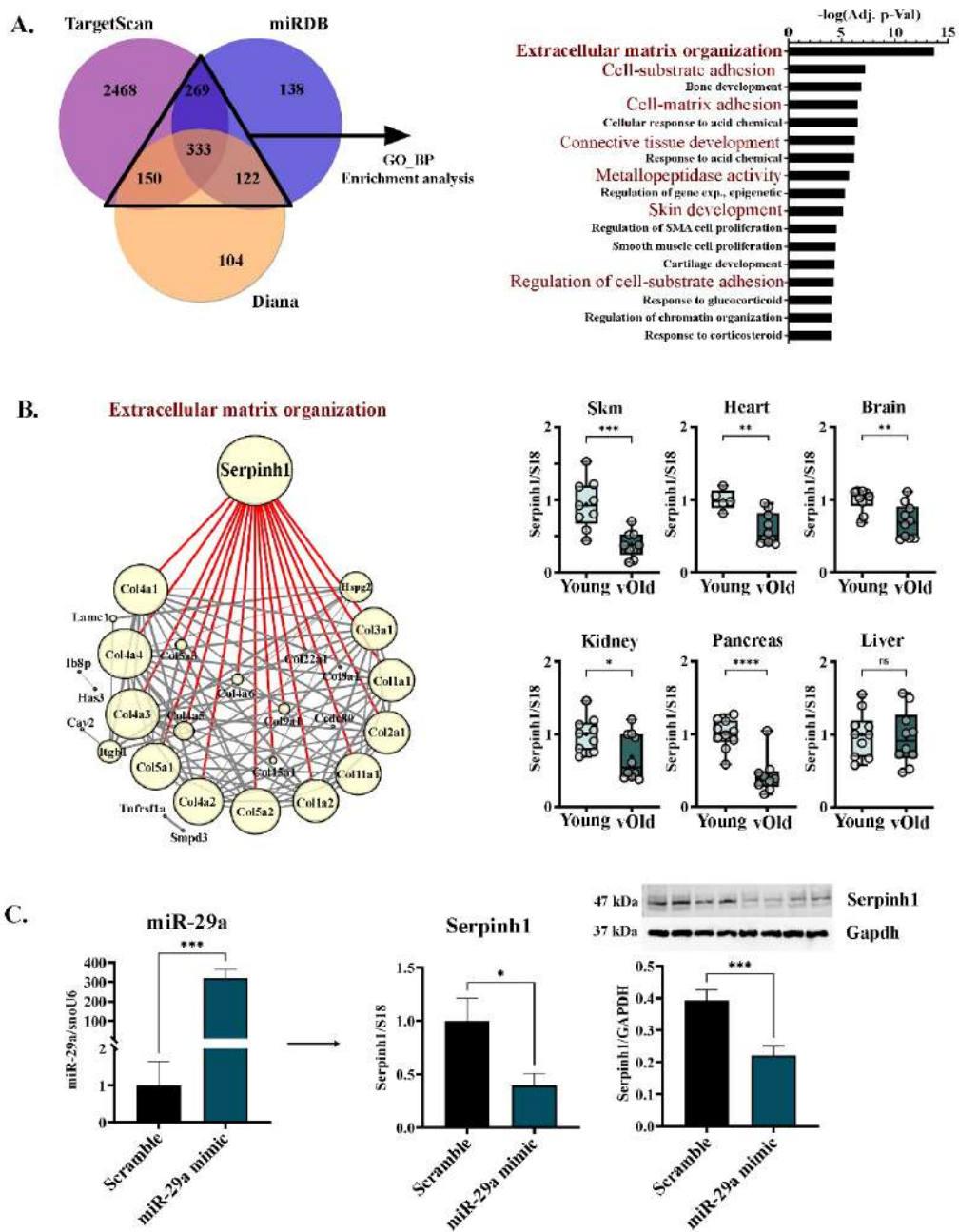
expresiei miARN-urilor miR-29a, miR-18a, miR-21a și miR-22 în inimă, dintre care miR-29a se remarcă crescut și preponderent exprimat în multiple organe prelevate de la șoareci bătrâni sugerând o semnătură moleculară comună a procesului de îmbătrânire.



**Figura 1. Investigarea profilului de expresie a miARN-urilor implicate în patologiile cardiace în îmbătrânirea naturală.** (A.) Cuantificarea hidroxiprolinei și evaluarea miARN-urilor în inimi prelevate de la șoareci tineri și bătrâni; (B.) Evaluarea nivelului de expresie a lui miR-21a și miR-29a în multiple organe prelevate de la șoareci tineri și bătrâni; Graficul de tip "heatmap" indică expresia  $2^{-dCt}$  unde snU6 a fost utilizată ca genă de referință.

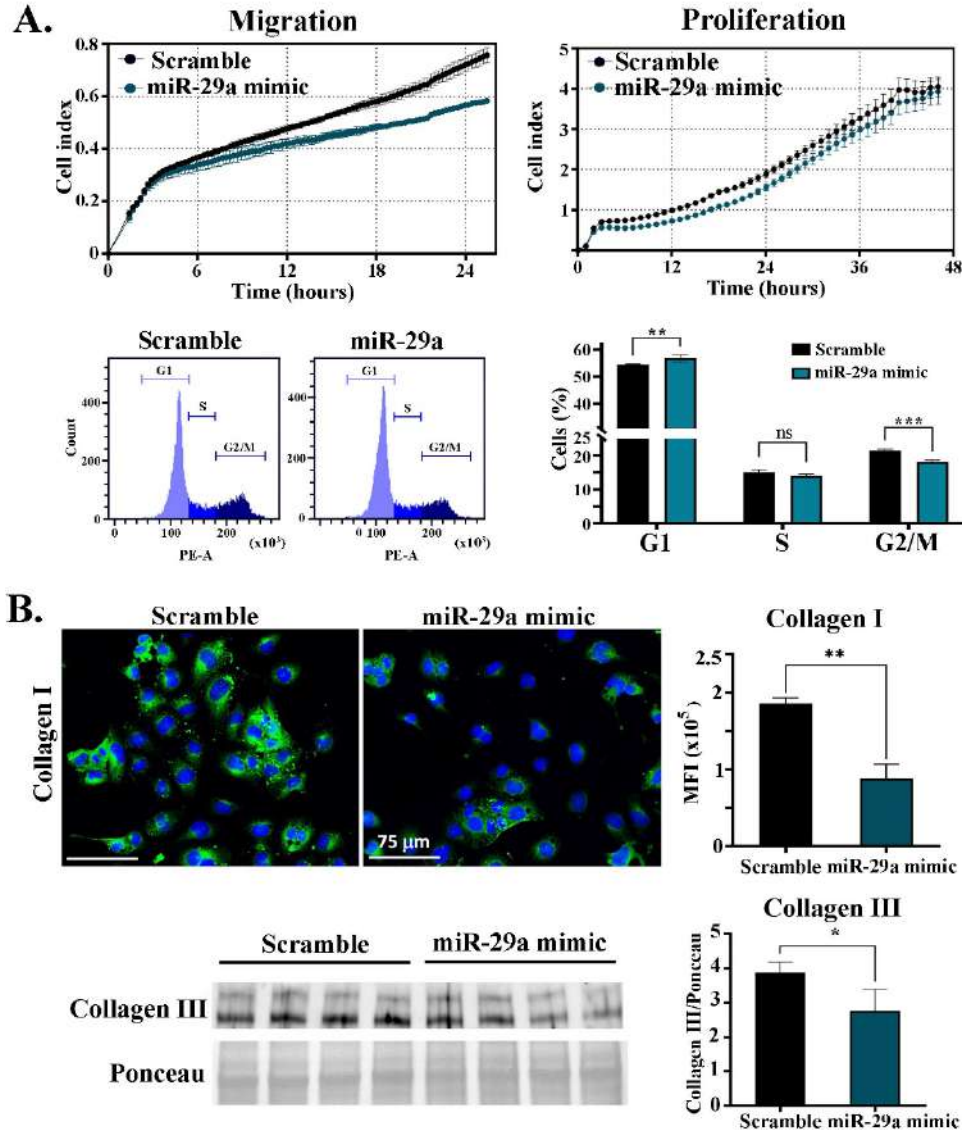
Mai mult, prin analiza bioinformatică am identificat că miR-29a reglează în mod direct organizarea matricei extracelulare prin țintirea Serpinh1, o chaperonă esențială a colagenelor. Validările experimentale au confirmat Serpinh1 ca țintă directă a miR-29a,

expresia acestei gene fiind invers corelată cu nivelurile crescute de miR-29a în organele îmbătrânite.



**Figura 2. Identificarea Serpinh1 ca țintă al lui miR-29a.** (A.) Analiza bioinformatică de predicție a țintelor și proceselor biologice dereglate de miR-29a; (B.) Analiză PPI ce identifică Serpinh1 ca cea mai importanta proteină din ECM și validarea scăderii acesteia în multiple organe în îmbătrânire; (C.) Confirmarea in vitro a Serpinh1 ca țintă directă a lui miR-29a

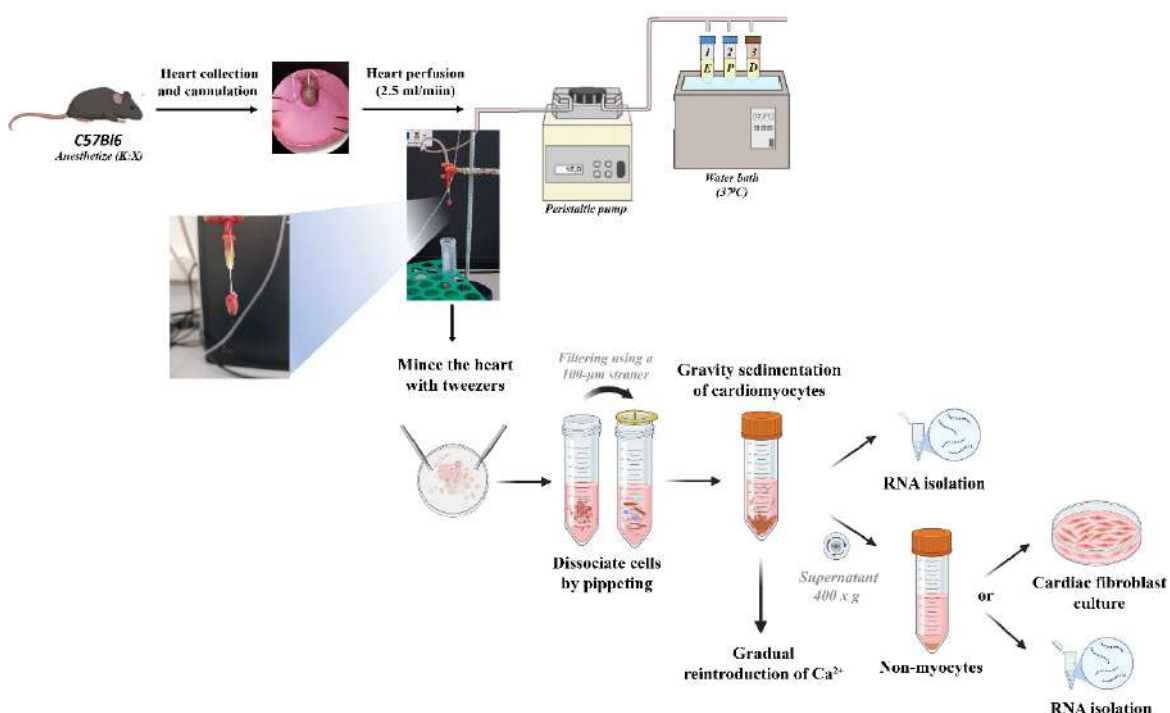
În final, studiile funcționale *in vitro* au evidențiat că supraexpresia miR-29a în fibroblaști și celule musculare cardiace inhibă proliferarea și migrarea celulară și reduce sinteza proteinelor pro-fibrotice, precum colagenul I și III, sugerând astfel că miR-29a funcționează ca un mecanism compensator anti-fibrotic, capabil să limiteze remodelarea patologică a matricei extracelular.



**Figura 3. Rolul anti-fibrotic a lui miR-29a.** (A.) Efectul lui miR-29a asupra migrației și proliferării; (B.) Cuantificarea colagenului în celule ce supraexprimă miR-29a

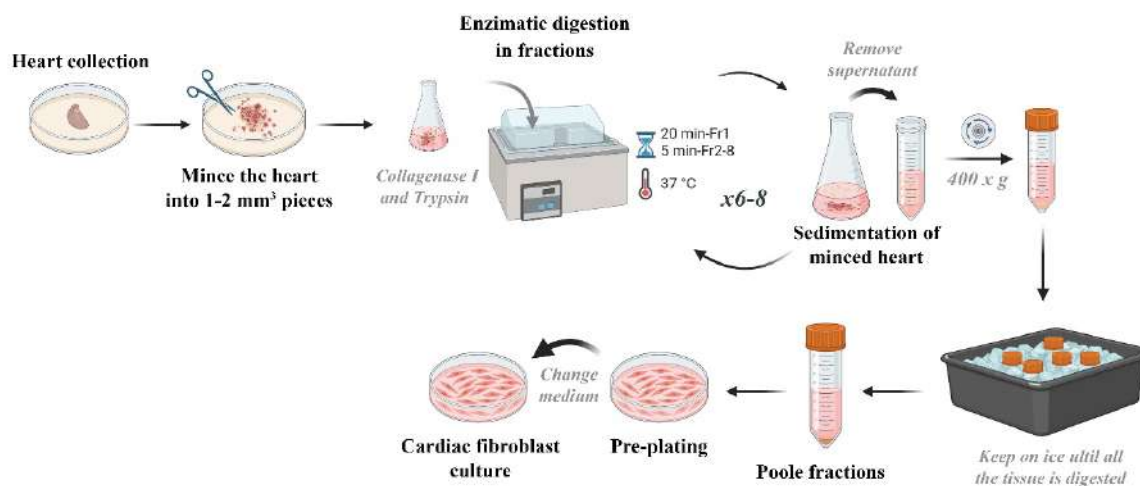
## Capitolul 2- INVESTIGAREA UNOR MOLECULE DE MIARN CU EXPRESII SCĂZUTE ÎN FIBROBLAȘTII CARDIACI ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ, cuprinde două studii:

**Studiul 1-** "Izolarea și caracterizarea fibroblaștilor și cardiomiocitelor primare murine,, a avut ca scop recuperarea unui număr maxim de celule cardiace, care să fie atât viabile, cât și funcționale. Astfel, cardiomiocitele murine adulte au fost izolate prin perfuzia retrogradă prin aorta, a tamponului de digestie ce a asigurat distribuția uniformă a enzimelor digestive prin rețeaua coronariană, ceea ce a facilitat o digestie eficientă și profundă a țesutului miocardic.



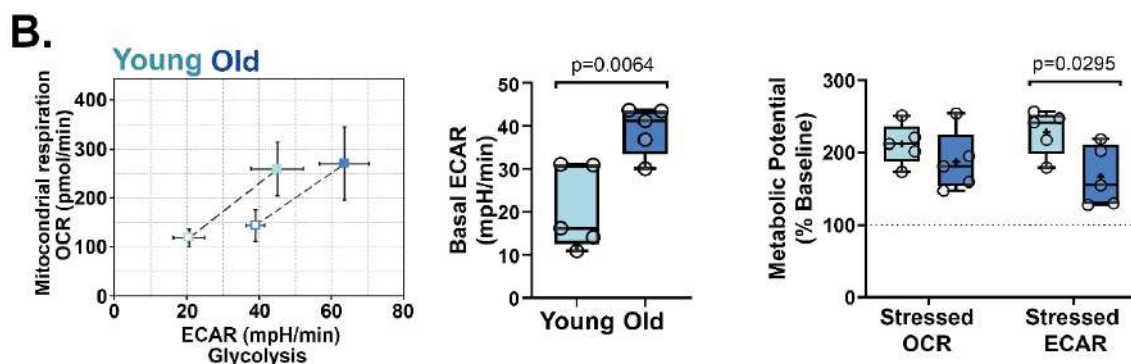
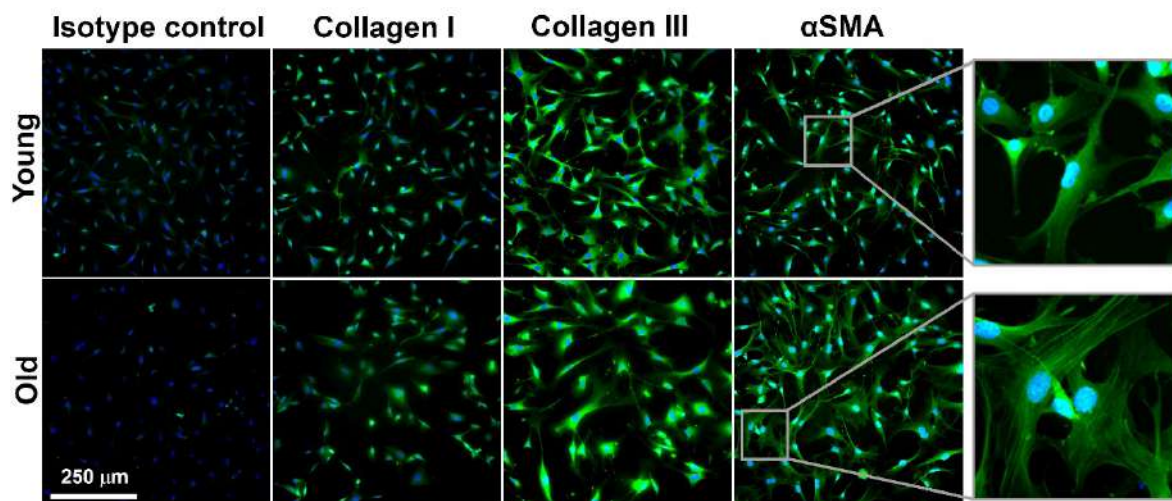
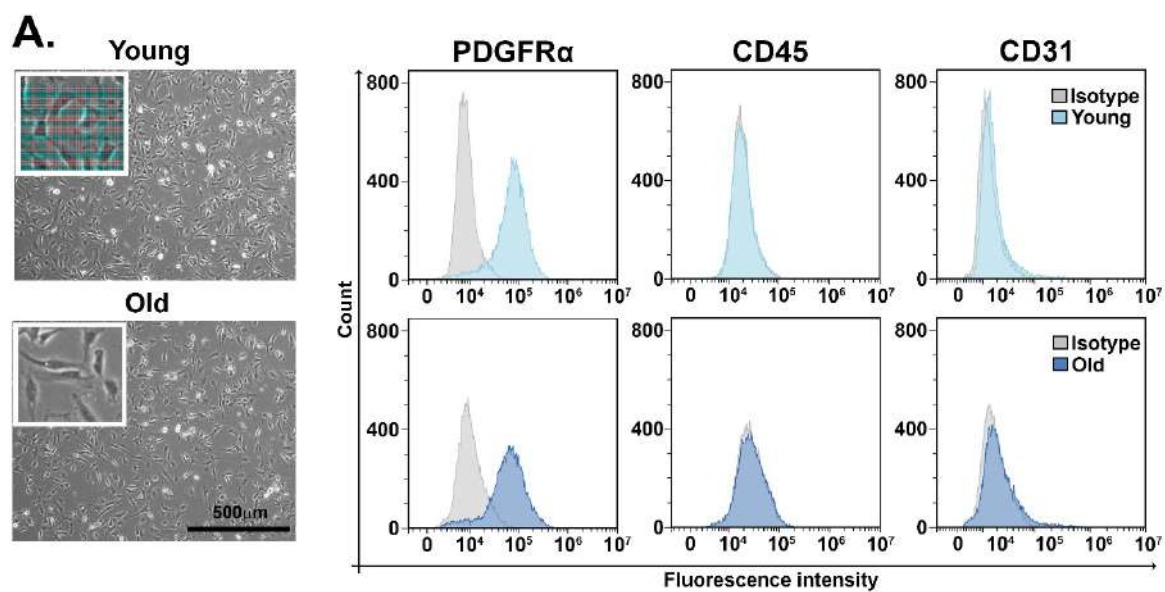
**Figura 4. Etapele izolării cardiomiocitelor și celulelor non-miocitare.** Inima este fragmentată cu penseta, iar disocierea celulară este realizată prin pipetare, urmată de filtrare printr-o sită de 100 μm. Separarea cardiomiocitelor de celulele non-miocitare are loc prin sedimentare prin gravitație timp de 20 min; Supernatantul care conține celule non-miocitare este centrifugat (400 × g) pentru a obține un pelet celular, utilizat fie pentru cultura fibroblastelor cardiace, fie pentru izolarea ARN; Dacă miocitele nu sunt cultivate acestea sunt preluate pentru izolarea de RNA; În caz de cultură, cardiomiocitele sunt supuse reintroducerii graduale a calciului (0,34 mM → 0,68 mM → 1,02 mM Ca<sup>2+</sup>), urmată de însămânțare timp de 1 oră pe suprafețe acoperite cu laminină și apoi menținute în cultură.

În ceea ce privește fibroblaștii cardiaci, au fost standardizate trei protocoale, bazate pe digestii enzimatice cu enzime diferite. Comparația celor trei protocoale de izolare a dus la concluzia că protocolul bazat pe digestie fracționată a oferit cel mai bun echilibru între randament, viabilitate și puritate, permițând obținerea unor culturi stabile și reproductibile.



**Figura 5. Etapele izolării fibroblaștilor cardiaci utilizând digestia în fracții.** După recoltare, inima este mărunțită în bucăți de 1–2 mm<sup>3</sup>, urmate de digestie enzimatică în fracții cu collagenază I și tripsină la 37°C. După fiecare rundă de digestie (20 min pentru prima fracție, 5 min pentru următoarele), supernatantul este separat, iar celulele sunt colectate prin centrifugare la 400 × g. Frațiile obținute sunt păstrate pe gheață până la finalizarea digestiei. La final fracțiile sunt combinate iar celulele sunt însămânțate pentru pre-plating timp de 24h.

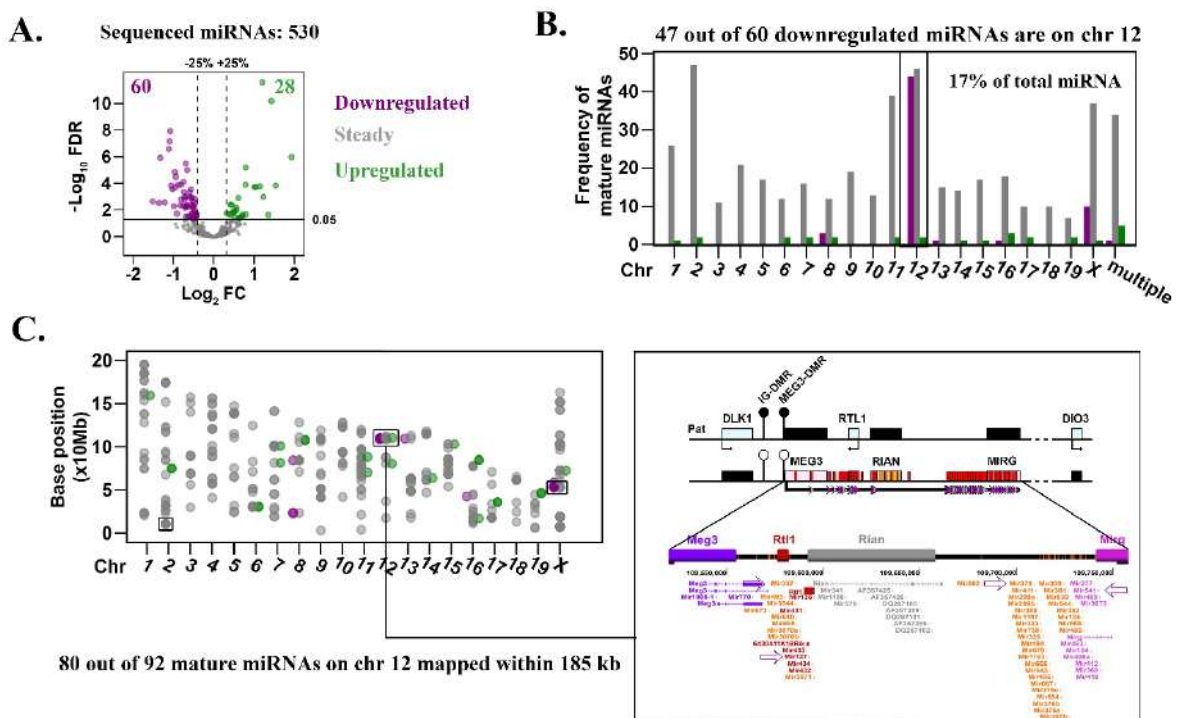
Caracterizarea culturilor primare pure a fost realizată cu succes prin marcarea imunofluorescentă a markerilor specifici (Pdgfra, S100A4, alpha-SMA, Collagen I și Collagen III). Analiza comparativă a fibroblaștilor cardiacii izolați de la șoareci tineri și bătrâni a relevat că schimbările fenotipice asociate îmbătrânirii naturale au fost moderate, dar semnificative, la nivel celular. Astfel, fibroblaștii din animale bătrâne prezintă o ușoară creștere a dimensiunii celulare, o reorganizare a αSMA și o dependență mai mare de metabolismul glicolitic, asociată cu o capacitate redusă de adaptare la stres metabolic.



**Figura 6. Diferențe ale fibroblaștilor cardiaci derivați de la șoareci tineri și bătrâni. (A.)** Caracterizarea morfologică și imunofenotipică a fibroblaștilor prin citometrie în flux și microscopie de fluorescență a celulelor derivate de la șoareci tineri și bătrâni după 5 zile de cultură; (B.) Diferențe metabolice între fibroblasti tineri și bătrâni

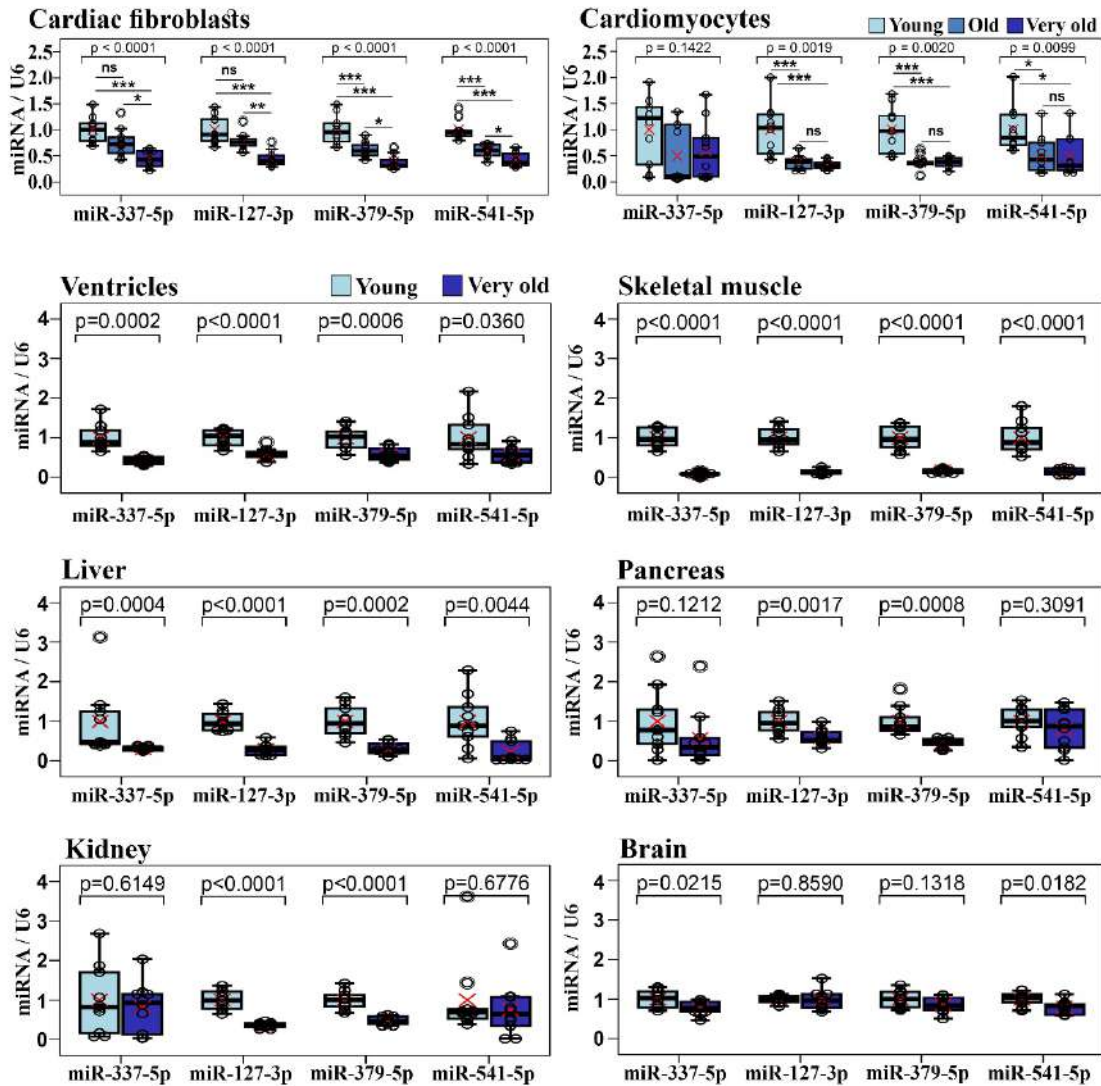
(C) Imagini de microscopie fluorescentă ilustrând prezența  $\alpha$ SMA, colagenului I și colagenului III. Se observă modele diferite de distribuție a SMA în cele două grupuri (casetă). Imaginile sunt reprezentative pentru trei experimente.

**Studiul 2-** "MiARN-urile generate de locusul Meg3-Mirg sunt scăzute în timpul îmbătrânirii naturale". În acest studiu, am arătat că la nivelul fibroblaștilor cardiaci, îmbătrânirea naturală a fost corelată cu o modificare moderată a expresiei a 88 de miARN-uri. Dintre acestea, 68% au avut scăderi semnificative, iar aproximativ jumătate dintre acestea au avut originea în locusul Meg3-Mirg de pe cromozomul 12.



**Figura 7. Identificarea miRNA-urilor în fibroblaștii cardiaci izolați de la șoareci tineri și bătrâni.** (A.) Grafic de tip volcano plot ce arată analiza miARN-urilor diferențial exprimate; (B.) Frecvența miRNA-urilor mature mapate pe fiecare cromozom al șoarecelui; (C.) Localizarea genomică a miRNA-urilor mature, reprezentată prin poziția la care începe gena corespunzătoare (miRNA-urile mature cu localizări genomice multiple nu au fost ilustrate) și reprezentarea schematică a locusului Meg3-Mirg ca parte a locusului cu imprinting patern Dlk1-Dio3. Locusul Meg3-Mirg este exprimat de pe alela maternă și conține exclusiv ARN-uri non-codante, adică lncRNA (Meg3, Rian, Mirg), snoRNA (bare portocalii) și miRNA (bare roșii). MiRNA-urile alese ca reprezentative pentru clusterul Meg3-Mirg sunt evidențiate prin săgeți.

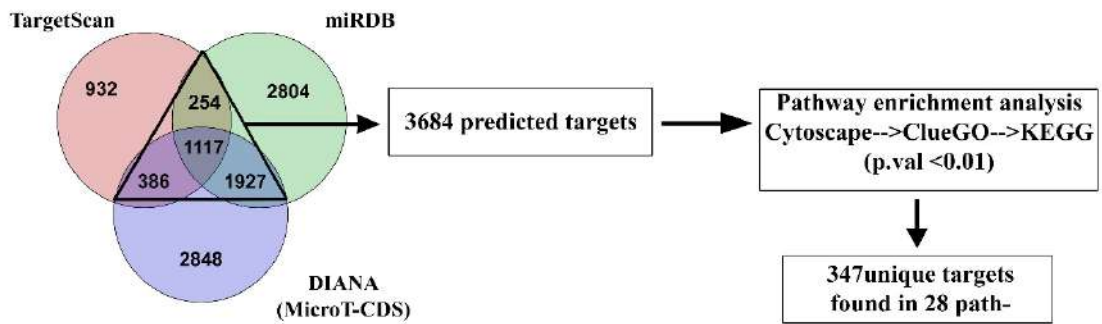
Astfel, îmbătrânirea naturală este asociată cu reprimarea coordonată a patru miRNA-uri reprezentative (miR-337-5p, miR-127-3p, miR-379-5p, miR-541-5p) din mega-clusterul Meg3-Mirg, fenomen observat atât în fibroblaștii cardiaci, cât și în alte organe precum mușchi scheletic, ficat și ventricule cardiace.



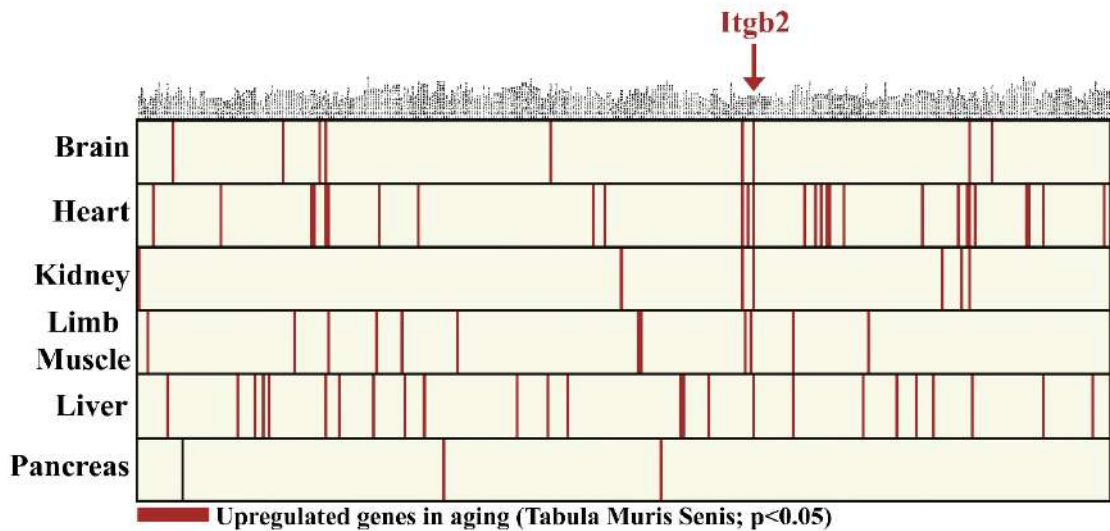
**Figura 8. Analiza de RT-qPCR a celor 4 miRNA-uri reprezentative pentru locusul Meg3-Mirg în celule cardiace și multiple organe prelevate de la șoareci tineri și bătrâni.**

Mai mult, țintele tuturor miARN-urilor din cluster au fost semnificativ îmbogățite în căi KEGG implicate în longevitate, inflamație și fibroză, ceea ce sugerează un rol central al locusului în reglarea proceselor asociate vârstei. Acesta analiza a condus în final la identificarea *Itgb2* ca genă-țintă relevantă a miARN-urilor din Meg3-Mirg, fiind supraexprimată în mai multe organe îmbătrânite (inimă, creier, rinichi, pancreas, fibroblaste cardiace).

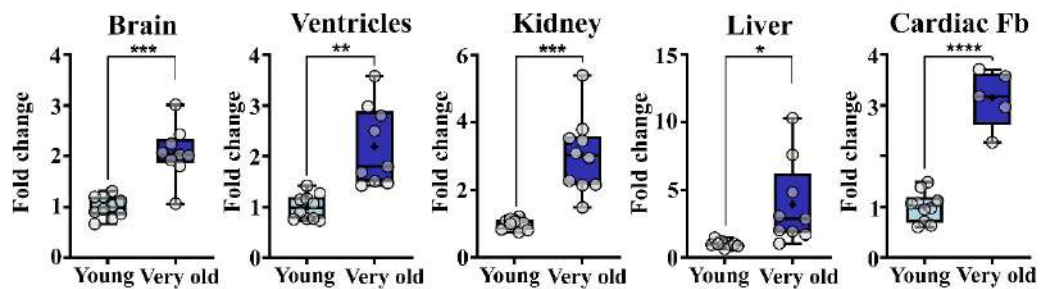
**A.** Predicted targets of 27 downregulated miRNAs from Meg3-Mirg locus



**B.**



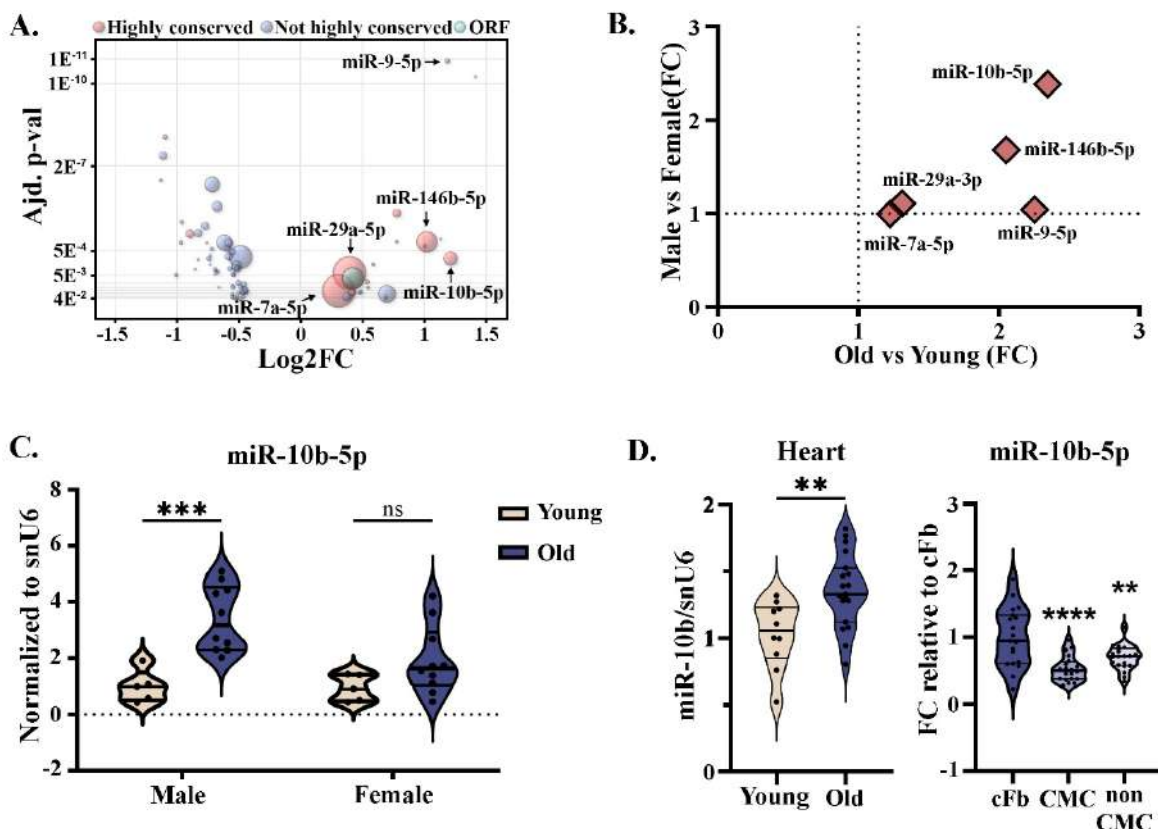
**C.**



**Figura 9. Gene supraexprimate în îmbătrânire care sunt țintite de miRNA-uri din locusul Meg3-Mirg.** (A.) Diagramă Venn care ilustrează țintele prezise ale celor 27 de miRNA-uri cu reglare descendentă; (B.) Ilustrație grafică a intersecției dintre genele unice găsite în calea KEGG și genele supraexprimate identificate în baza de date Tabula Muris Senis. Genele supraexprimate sunt evidențiate pentru fiecare organ. Itgb2 a reieșit drept singura genă supraexprimată în 4 din 6 organe; (C.) Expresia genei Itgb2 în creier, ventricul, rinichi, ficat și în fibroblaste cardiace cultivate

### Capitolul 3 - INVESTIGAREA UNOR MOLECULE DE MIARN CU EXPRESII CRESCUTE ÎN FIBROBLAȘTII CARDIACI ÎN ÎMBĂTRÂNIREA NATURALĂ,

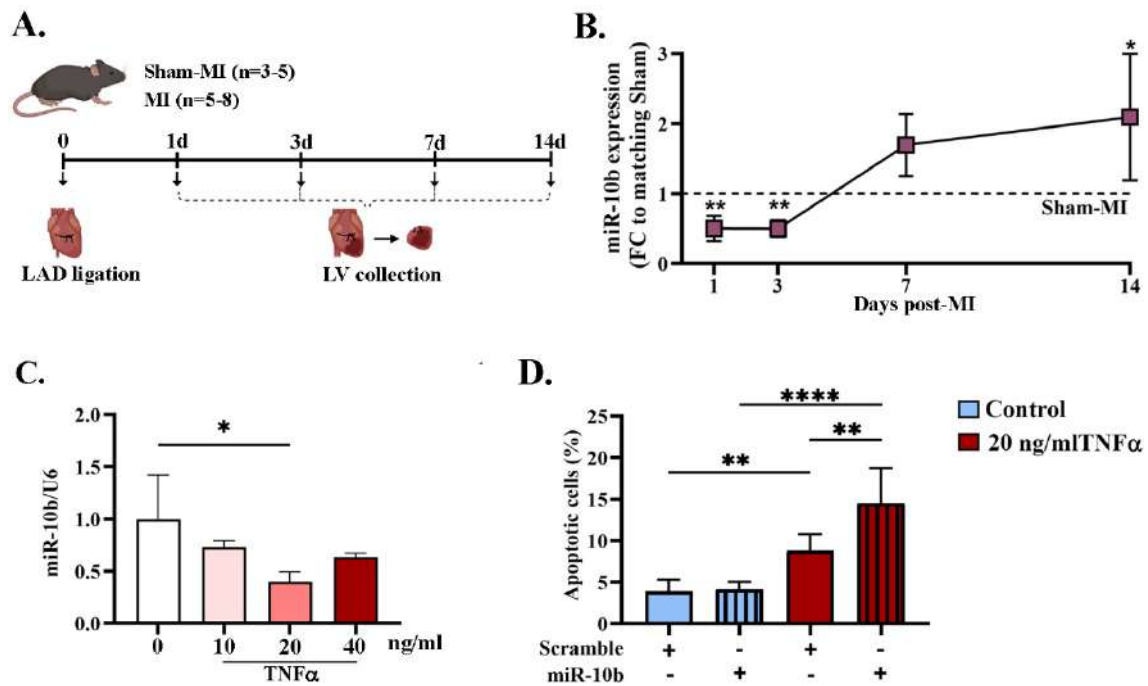
cuprinde studiul intitulat "Activarea miR-10b în fibroblaștii cardiaci atenuează remodelarea adversă după infarctul miocardic în timpul îmbătrânirii prin țintirea Lpar2,..". În acest studiu ne-am axat pe identificarea rolurilor miARN-urilor crescute în fibroblaștii cardiaci în procesul de remodelare post-IM în timpul îmbătrânirii. Folosind studii funcționale *in vivo*, tehnici de biologie moleculară, biochimie, clonare și culturi celulare, descrise în secțiunile „Protocoale experimentale și metode de analiză”, am arătat că miR-10b-5p a fost validat ca fiind supraexprimat specific în cFb izolați din șoareci masculi pe parcursul îmbătrânirii. Această creștere a fost confirmată și la nivelul inimii îmbătrânite, fiind atribuită exclusiv acumulării miR-10b în cFb și nu în cardiomiocite (CM), sugerând un rol important al acestui miARN în procesele de remodelare fibrotică asociate îmbătrânirii.



**Figura 10. Dereglarea nivelului de expresie a lui miR-10b în îmbătrânirea cardiacă.** (A.) Volcano bubble plot ce arată totalitatea miARN-urilor dereglate în fibroblaștii cardiaci în timpul îmbătrânirii. Dimensiunea bulelor reprezintă media nivelului de expresie (RPM-citiri pe milion) și culoarea reprezintă statusul de conservare: roșu= înalt conservate (conservate la vertebrate); albastru=conservate doar la mamifere; (B.) Analiza dependenței de sex a genelor supraexprimate în timpul îmbătrânirii; (C.) Validarea expresiei genice prin RT-

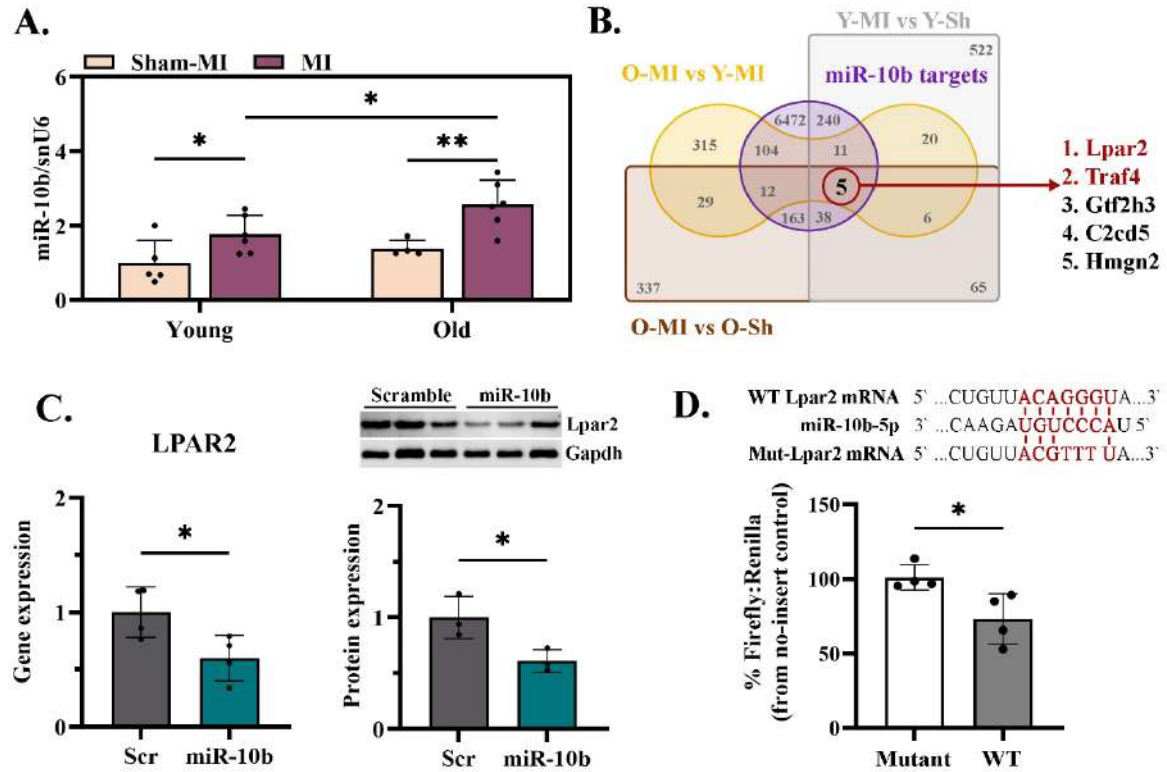
qPCR a miR-10b în fibroblaștii cardiaci izolați de la animale tinere și bătrâne; (D.) Expresia relativă a miR-10b în inimi și celule cardiace izolate la șoareci tineri și bătrâni.

Datele noastre au evidențiat faptul că miR-10b a prezentat o reglare bifazică în timpul infarctului miocardic, fiind redus în faza inflamatorie și crescut în fazele de reparare/maturare ale IM. În faza acută, semnalele inflamatorii precum TNF- $\alpha$  inhibă expresia sa, facilitând activarea fibroblaștilor și depunerea matricei în timp ce creșterea nivelului de miR-10b promovează apoptoza fibroblaștilor și stabilizează cicatricea, prevenind acumularea excesivă de ECM.



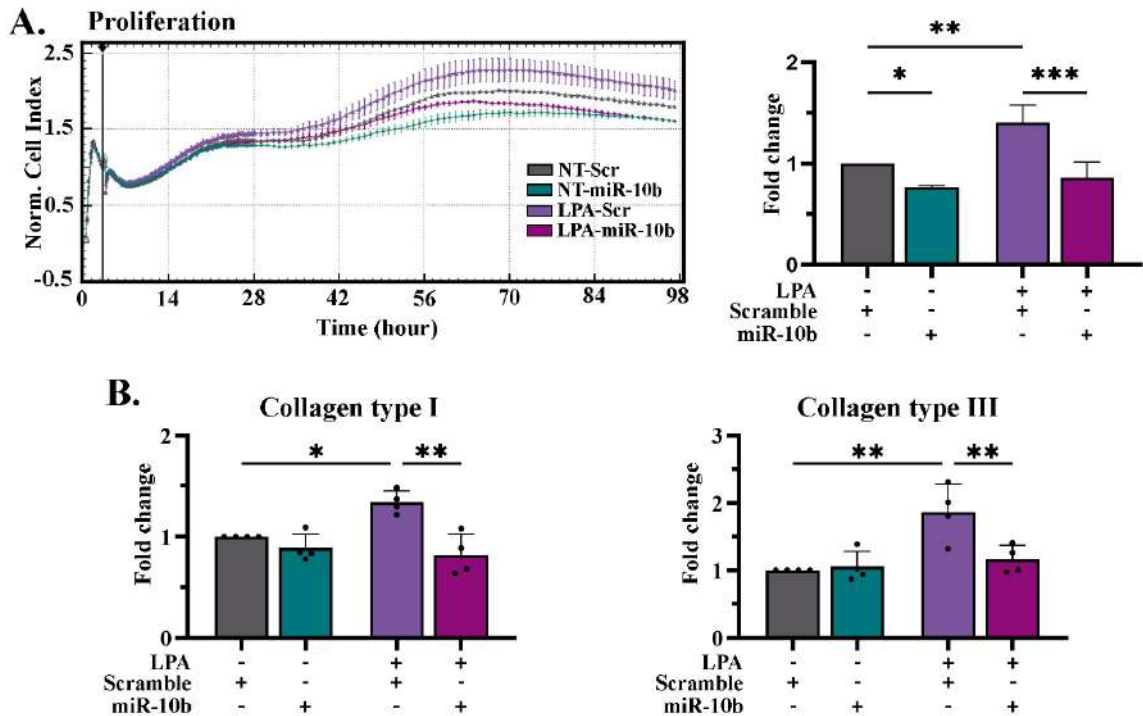
**Figura 11. Expresia și rolul lui miR-10b în fazele reparatorii post-MI.** (A.) Reprezentarea schematică a designului experimental. Infarctul miocardic a fost indus la șoarecii C57Bl5 tineri (2-3 luni) prin ligatura arterei coronare descendente anterioare (LAD). Regiunea infarctată a ventriculului stâng a fost recoltată în azot lichid la 1, 3, 7 și 14 zile post-IM; (B.) Evoluția expresiei lui miR-10b la diferite intervale de timp post-MI; (C.) Expresia miR-10b în fibroblaste cardiace expuse 24h la diferite concentrații de TNF $\alpha$ ; (D.) Impactul lui miR-10b asupra apoptozei celulare în condiții inflamatorii.

Analiza bioinformatică și testele funcționale au identificat *Lpar2* ca țintă directă a miR-10b. Supraexpresia miR-10b în fibroblaștii cardiaci bătrâni a redus nivelul *Lpar2* la nivel transcripțional și proteic, iar testele cu luciferază au confirmat interacțiunea directă miR-10b-*Lpar2*.



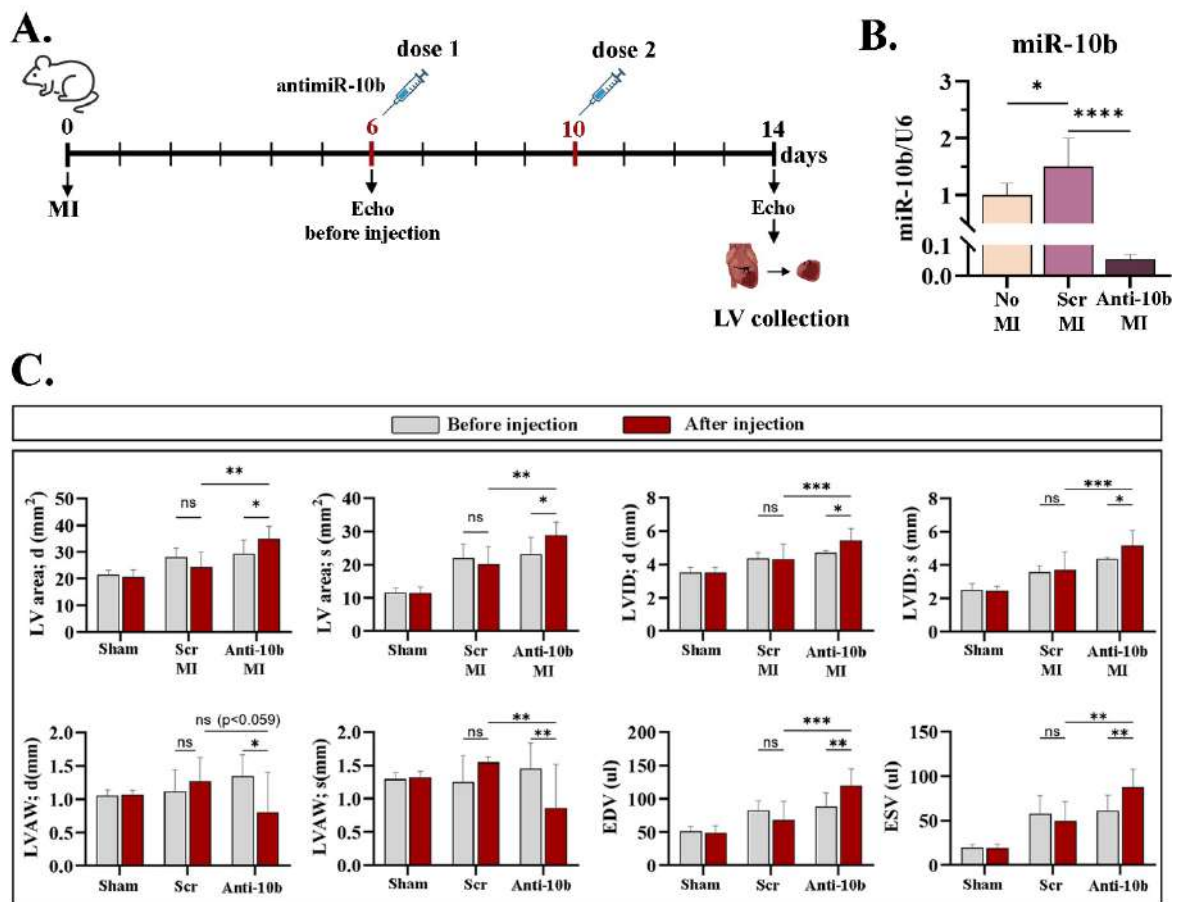
**Figura 12. Identificarea și validarea *Lpar2* ca țintă al lui miR-10b.** (A.) Analiza RT-qPCR a nivelului genic a lui miR-10b în fibroblaștii cardiaci izolați de la șoareci tineri și bătrâni la 7 zile post-IM; (B.) Analiza bioinformatică de identificare a genelor țintă pentru miR-10b. Genele comune identificate ca fiind scăzute în grupurile experimentale Y-MI vs Y-Sham, O-MI vs O-Sham și O-MI vs Y-MI au fost suprapuse cu țintele precise ale miR-10b găsite în 4 baze de date; (C.) Expresia genică și proteică a lui *Lpar2* în fibroblaștii cardiaci izolați din șoareci bătrâni și testul Dual-luciferase reporter care demonstrează interacțiunea directă dintre *Lpar2* și miR-10b-5p.

În plus, testele funcționale au arătat că, în prezența unui agonist specific pentru *Lpar2*, supraexpresia miR-10b reduce proliferarea și expresia genelor pentru colagen I/III în cFb bătrâni, consolidând rolul acestei căi de semnalizare în procesul de fibroză.



**Figura 13. Rolul axei miR-10b/Lpar2 în procesul fibrotic.** (A.) Celulele au fost transfectate cu miR-10b sau Scramble timp de 24 de ore și expuse timp de 98 de ore la agonistul LPA2. Plotul din stânga ilustrează indexul celular normalizat, reprezentând media  $\pm$  DS a două sau trei godeuri individuale dintr-un experiment reprezentativ. Graficul din dreapta cuantifică panta curbelor de proliferare din trei experimente separate, ce descrie gradientul și rata de modificare a curbelor indexului celular în intervalul de 98h de tratament. Rezultatele sunt raportate la controlul Scramble pentru fiecare experiment în parte; (B.) Cuantificarea relativă prin RT-qPCR a genelor Colagen I și III în fibroblasti cardiaci bătrâni imortalizați ce supraexprimă miR-10b după 48 de ore de tratament cu agoLPA2.

În final, am demonstrat că inhibiția *in vivo* a miR-10b prin antagomir a exacerbat remodelarea adversă post-IM la șoarecii bătrâni, determinând agravarea dilatării ventriculare, a subțierii peretelui și a disfuncției cardiace. Aceste date definesc axa miR-10b–Lpar2 ca un mecanism critic de control al proliferării fibroblaștilor și al depunerii matricei extracelulare în contextul îmbătrânirii, cu potențial de a fi exploatată terapeutic.



**Figura 14. Studiul de inhibiție in vivo a lui miR-10b după IM.** (A.) Cronogramă ce ilustrează designul experimental. Șoareci C57Bl6 batrani (de 17-18 luni) au fost supuși intervenției chirurgicale Sham sau IM. O concentrație de 10 mg/kg Scramble (Scr) sau AntagomiR-10b (Anti-10b) a fost administrat grupului IM în ziua 6 și ziua 10 post-procedură; (B.) Nivelul de expresie a genei miR-10b în ventriculul stâng după infarctul miocardic; (C.) Cuantificarea înregistrărilor ecocardiografice într-un ciclu cardiac a ariei VS, diametrului intern al VS (LVID), peretelui anterior al VS (LVAW) și volumelor telesistolice (ESV) și telediastolice (EDV) la șoareci aflați în cohorta de studiu. Măsurătorile au fost efectuate înainte de prima doză de tratament și la sfârșitul timpului experimental (după injecție).

## Contribuțiile originale ale tezei

- Standardizarea protocoalelor pentru obținerea de fibroblaști cardiaci și cardiomiocite murine adulte pentru studii *in vitro*;
- Demonstrarea unui fenotip de fragilitate la fibroblaștii cardiaci din inimi bătrâne, caracterizat prin reorganizarea fibrelor de stres și schimbări metabolice cu preferință pentru glicoliză și pierderea flexibilității energetice în condiții de stres.
- Identificarea și caracterizarea profilul de expresie a miARN-urilor în fibroblaștii cardiaci izolați de la șoareci bătrâni și tineri.
- Identificarea miR-29a ca având un nivel crescut în mod global odată cu îmbătrânirea, modificarea sa exercitând un rol compensator, cu efecte anti-fibrotice în acest proces.
- Demonstrarea că miR-10b este crescut în inima îmbătrânită a indivizilor masculi, datorită supraexpresiei sale în fibroblaștii cardiaci și nu în cardiomiocite.
- Identificarea lui miR-10b ca fiind reglat temporal, expresia lui fiind scăzută în faza inflamatorie post-IM și crescută ulterior, în fazele de reparare și maturare a cicatricei.
- Demonstrarea că expunerea cFb la stimuli inflamatori, precum TNF- $\alpha$ , reduce expresia miR-10b, iar supraexpresia acestuia în aceleași condiții favorizează apoptoza celulară.
- Demonstrarea rolului anti-fibrotic al miR-10b în condiții normale, în cFb, cu impact asupra scăderii proliferării, migrației și a *Ctgf*
- Identificarea și validarea *Lpar2* ca țintă directă a miR-10b, atât la nivel de expresie genică, cât și proteică.
- Demonstrarea că activarea receptorului *Lpar2*, indusă prin expunerea la agonistul LPA2, este inhibată de supraexpresia miR-10b în cFb, ceea ce conduce la reducerea proliferării celulare și la diminuarea expresiei genelor pro-fibrotice, precum colagenul I și colagenul II. Aceste rezultate validând rolul anti-fibrotic al lui miR-10b.
- Demonstrarea ca inhibiția *in vivo* a lui miR-10b după IM duce la exacerbarea remodelării fibrotice după IM în îmbătrânire.

## Bibliografie

- (1) Biernacka, A. & Frangogiannis, N. G. 2011. *Aging and cardiac fibrosis*. Aging Dis, 2, 158–173.
- (2) Dai, D. F., Chen, T., Johnson, S. C., Szeto, H. & Rabinovitch, P. S. 2012. *Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease*. Antioxid Redox Signal, 16, 1492–526.
- (3) Daseke, M. J., 2nd, Tenkorang, M. A. A., Chalise, U., Konfrst, S. R. & Lindsey, M. L. 2020. *Cardiac fibroblast activation during myocardial infarction wound healing: fibroblast polarization after mi*. Matrix Biol, 91-92, 109–116.
- (4) Deb, A. & Ubil, E. 2014. *Cardiac fibroblast in development and wound healing*. J Mol Cell Cardiol, 70, 47–55.
- (5) Ferrucci, L. & Fabbri, E. 2018. *Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty*. Nat Rev Cardiol, 15, 505–522.
- (6) Gupta, S. K., Piccoli, M. T. & Thum, T. 2014. *Non-coding rnas in cardiovascular ageing*. Ageing Res Rev, 17, 79–85.
- (7) <https://heartreport23.world-heart-federation.org/>, accesat august 2024
- (8) Lähteenvuo, J. & Rosenzweig, A. 2012. *Effects of aging on angiogenesis*. Circ Res, 110, 1252–64.
- (9) North, B. J. & Sinclair, D. A. 2012. *The Intersection Between Aging And Cardiovascular Disease*. Circ Res, 110, 1097–108.
- (10) Olivetti, G., Cigola, E., Maestri, R., Lagrasta, C., Corradi, D. & Quaini, F. 2000. *Recent advances in cardiac hypertrophy*. Cardiovasc Res, 45, 68–75.
- (11) Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M. & Anversa, P. 1991. *Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy*. Circ Res, 68, 1560–8.
- (12) Seyhan, A. A. 2024. *Trials and tribulations of microrna therapeutics*. Int J Mol Sci, 25.
- (13) Singam, N. S. V., Fine, C. & Fleg, J. L. 2020. *Cardiac changes associated with vascular aging*. Clin Cardiol, 43, 92–98.
- (14) Smolgovsky, S., Ibeh, U., Tamayo, T. P. & Alcaide, P. 2021. *Adding insult to injury - inflammation at the heart of cardiac fibrosis*. Cell Signal, 77, 109828.
- (15) Tallquist, M. D. & Molkentin, J. D. 2017. *Redefining the identity of cardiac fibroblasts*.

Nat Rev Cardiol, 14, 484–491.

- (16) Theall, B. & Alcaide, P. 2022. *The heart under pressure: immune cells in fibrotic remodeling*. Curr Opin Physiol, 25.
- (17) Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M. A., Licht, J. D., Pena, J. T., Rouhanifard, S. H., Muckenthaler, M. U., Tuschl, T., Martin, G. R., Bauersachs, J. & Engelhardt, S. 2008. *Microrna-21 contributes to myocardial disease by stimulating map kinase signalling in fibroblasts*. Nature, 456, 980–4.
- (18) Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E. & Blaxall, B. C. 2016. *Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens*. Circ Res, 118, 1021–40.
- (19) Van Rooij, E., Sutherland, L. B., Thatcher, J. E., Dimaio, J. M., Naseem, R. H., Marshall, W. S., Hill, J. A. & Olson, E. N. 2008. *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of mir-29 in cardiac fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 13027–32.

## EFICIENȚA ȘI DISEMINAREA CERCETĂRILOR

### Lucrări publicate în reviste ISI – 2 autor principal

1. **Rusu-Nastase EG**, Lupan AM, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Burlacu A. MiR-29a Increase in Aging May Function as a Compensatory Mechanism Against Cardiac Fibrosis Through SERPINH1 Downregulation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2022 doi: 10.3389/fcvm.2021.810241. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2022): 3.6 (Q2)**
2. Lupan AM\*, **Rusu EG\***, Preda MB, Marinescu CI, Ivan C, Burlacu A. miRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging. *Aging (Albany NY)*, 2021, doi: 10.18632/aging.203208 (\* contribuții egale). **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 5.682 (Q1)**

**Manuscris în preparare:** **Rusu-Nastase EG**, Marinescu CI, Neculachi CA, Preda MB, Martelli F, Burlacu A. MiR-10b activation in cardiac fibroblast attenuates the adverse cardiac remodelling after myocardial infarction during ageing by targeting Lpar2.

### Lucrări publicate în reviste ISI – 5 co-autor

1. Laudy Cherry, Sinziana Popescu,&, Carmen Alexandra Neculachi, **Evelyn-Gabriela Nastase-Rusu**, Catalina Iolanda Marinescu-Colan, Bogdan Paul Cosman, Letitia Ciortan, Fabio Martelli, Maya Simionescu, Elena Butoi, Alexandrina Burlacu, Mihai Bogdan Preda. Mesenchymal stromal cells modulate neutrophil phenotype via paracrine signals. *Stem Cell Research & Therapy*, 2025. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 7.3 (Q1).**
2. Neculachi CA, **Nastase-Rusu EG**, Cherry L, Marinescu-Colan CI, Tastsoglou S, Cosman BP, Popa AM, Panciuc C, Zaccagnini G, Catrina SB, Simionescu M, Martelli F, Preda MB, Burlacu A. miR-210 promotes the anti-inflammatory phenotype and M2 polarization in murine macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2025; doi: 10.3389/fimmu.2025.1633163. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 5.9 (Q1).**
3. Preda MB, **Nastase-Rusu EG**, Neculachi CA, Zhong X, Voellenkle C, Mazure NM, Balacescu O, Ivan C, Zheng XW, Gherghiceanu M, Lebrigand K, Simionescu M, Martelli F, Mari B, Catrina SB, Burlacu A, Ivan M. miR-210 locus deletion disrupts cellular homeostasis: an integrated genetic study. *Scientific Reports*.

- 2025;15(1):22659. doi: 10.1038/s41598-025-07572-8. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 3,9 (Q1).**
4. Marinescu-Colan CI, Nastase-Rusu EG, Neculachi CA, Martelli F, Cherry L, Preda MB, Burlacu A. From cancer to heart fibrosis - GLIPR1 highlights a subset of myofibroblasts responsive to mesenchymal stem cell therapy after myocardial infarction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2025; doi: 10.1016/j.biopha.2025.118087. **Factorul de impact al revistei în anul precedent publicării (2024): 7.5 (Q1).**
  5. Marinescu CI, Preda MB, Neculachi CA, Rusu EG, Popescu S, Burlacu A. Identification of a Hematopoietic Cell Population Emerging From Mouse Bone Marrow With Proliferative Potential *In Vitro* and Immunomodulatory Capacity. *Frontiers in Immunology*, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.698070. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2021): 7,561(Q1)**
  6. Preda MB, Lupan AM, Neculachi CA, Leti LI, Fenyó IM, Popescu S, Rusu EG, Marinescu CI, Simionescu M, Burlacu A. Evidence of mesenchymal stromal cell adaptation to local microenvironment following subcutaneous transplantation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, doi: 10.1111/jcmm.15717. **Factorul de impact al revistei în anul publicării (2020): 5.310 (Q2)**

#### Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale: 2 comunicări

1. Rusu Evelyn-Gabriela. Prezentare orală în cadrul simpozionului "39th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology". Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated SERPINH1 in multiple organs, 21-23 Octombrie 2022, Cluj, România- **prezentare orală câștigătoare a „Best Presentation Award” la secțiunea de ”PhD Students Presentations,**
2. Rusu Evelyn-Gabriela. Prezentare orală în cadrul simpozionului "38th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology". MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging, 4-6 Noiembrie 2021, București, România

#### Postere prezentate la manifestări științifice internaționale: 5 comunicări

1. Rusu E.G., Burlacu A. Evaluation of the impact of alginate-based scaffolds on the mesenchymal stem cell properties in vitro. The 10th National Congress With International Participation and 36th Annual Scientific Session of RSCB, 5-9 Iunie 2018, Craiova, România.

2. **Rusu E.G.**, Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture. European Research Area Network (ERA-Net) on Cardiovascular Diseases (ERA-CVD), 13-15 Mai **2019**, Riga, Letonia.
3. **Rusu E.G.**, Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture. International Cell Culture Under Flow Meeting 2020, 18-19 Februarie **2020**, Munich, Germania-**prezentare de poster câștigătoare a „Young Scientist Award”**.
4. **Rusu E.G.**, Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. MiRNAs generated from Meg3-Mirg locus are downregulated during aging. 2nd Olympiad in Cardiovascular Medicine - International Symposium on Experimental and Clinical Cardiology, 27-30 Aprilie **2022**, Heraklion, Crete
5. **Rusu E.G.**, Lupan A.M, Preda B.M, Marinescu C.I, Neculachi C.A, Burlacu A. Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated Serpinh1 in multiple organs. Final CardioRNA COST Action Meeting, 22-24 Aprilie **2023**, Nicosia, Cyprus.

#### Specializări și cursuri realizate pe perioada programului doctoral

1. Cursul internațional “CardioRNA Bioinformatics Training School” organizat de acțiunea COST CA17129 “CardioRNA”, Nicosia, Cipru, 20-22 Februarie 2023.
2. Cursul internațional ”10th International Course: Care and use of laboratory animals (Mice, Rats, Zebrafish),, Creta, Grecia.

#### Premii câștigate

1. **Premiul ” Young Scientist Award”** pentru posterul: **Rusu E.G.**, Lupan A.M, Marinescu C.I, Preda B.M, Burlacu A. Influence of aging on the quality and dynamics of mouse cardiac fibroblasts in culture, în cadrul simpozionului ”International Cell Culture Under Flow Meeting 2020”, 18-19 Februarie **2020**, **Munich, Germania**
2. **Premiul ” Best Presentation Award”** pentru prezentarea: **Rusu Evelyn-Gabriela.** Natural aging process is associated with increased miR-29a and downregulated SERPINH1 in multiple organs, în cadrul simpozionului ”39th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology”, 21-23 Octombrie **2022**, **Cluj, România**

## FINANȚAREA CERCETĂRILOR ȘI COLABORĂRI ÎN PROIECTE DE CERCETARE

1. **Bursă de doctorat:** Academia Română (SCOSAAR): 2018-2021 (contract nr 88/04.11.2018)
2. **PNRR-III-C9-2022-I8-186** - "Targeting Cardiac Fibrosis in Heart Failure; Challenges and Potential Solutions Based on ncRNA Therapeutics (FibroThera)", director de proiect Dr. Fabio Martelli, Director științific al Laboratorului de Cardiologie Moleculară, I.R.C.C.S. Policlinico San Donato
3. **PN-III-P4-ID-PCCF-2016-0172** - "Targeting innate immune mechanisms to improve risk stratification and to identify future therapeutic options in myocardial infarction" (INNATE-MI), director de proiect Acad. Maya Simionescu (colaborator al echipei de implementare în 2022)
4. **PN-III-P4-ID-PCE-2020-1340** - "Mecanisme fundamentale ale remodelării ventriculare evaluate la nivelul populației de fibroblaști cardiaci în miocardul bătrân cu infarct (Inf-OLD)", director de proiect Dr. Alexandrina Burlacu
5. **PN-III-P1-1.1-TE-2019-1893** - "MIR-210 genomic locus at the overlap between hypoxia signalling and inflammatory networks" (210-HINT), director de proiect Dr. Bogdan Preda
6. **COFUND-ERA-CVD-EXPERT-65/2017** - "Exploring new pathways in age-related heart diseases", ERA-CVD Joint Transnational Projects 2017-2020; (1) Hannover Medical School; (2) Maastricht University; (3) Humanitas Research Hospital; (4) Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III; (5) University of Lorraine; (6) Institute of Cellular Biology and Pathology (Responsabil: Dr. Alexandrina Burlacu)
7. **POC-A.1-A.1.1.4-E-2015** – "Îmbunătățirea competitivității instituționale în domeniul diabetului de tip 1 prin dezvoltarea unui concept inovator de imunoterapie cu celule stromale mezenchimale (DIABETER)", director de proiect Dr. Nadir Askenasy (Laboratorul Frankel de Transplant Experimental de Maduva Osoasa, din Centru Medical pentru Copii Schneider, Israel). Coordonator intern activități științifice: Dr. Alexandrina Burlacu.