



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

PROIECT POC NOI TEHNOLOGII SI PRODUSE PENTRU SANATATE P_40_406, COD SMIS 105542, ACRONIM - INOVOPRODFARM

Noutati privind testarea in vitro a sigurantei si eficacitatii bioproduselor



AUTOR - Dr. biochim. Radu Albulescu

Proiectul este cofinantat din Fondul European de Dezvoltare Regionala, prin Programul Operational Competitivitate



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Principiul de baza al toxicologiei:

Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift, allein die Dosis macht dass ein Ding kein Gift ist

Toate lucrurile sunt toxice, și nimic nu este lipsit de toxicitate, doar doza face ca un lucru sa nu fie otrava

Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim,
(Paracelsus), 1493-1541



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Potentiale utilizari ale bioproduselor:

- Substante active
- Adjuvanti
 - Utilizati in preparate farmaceutice, suplimente alimentare, produse nutraceutice, produse cosmetic si dermacosmetice, alte produse destinate ingrijirii sanatatii, inclusiv nanoformulari
 - Forme finale conditionate din clasele de mai sus



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Metodologia de investigare a caracteristicilor biologice

Scop:

- Estimarea potentialelor efecte adverse ale biocompusilor sau preparatelor formulate derivate de la acestia,
- Evaluarea actiunilor specifice,
- Evaluarea unor caracteristici farmacocinetice (absorbție, distribuție, metabolizare, excreție),
- Evaluarea posibilelor interferente cu alte substante active – medicamente, suplimente alimentare, alimente, etc.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Metodologia de investigare a caracteristicilor biologice

Metode utilizate:

- Metode computationale de predicție a efectelor - utilizate din ce în ce mai des, în special pentru produse puri;
- Modele animale (de ex. soarece, sobolan, cobia, iepure) – aplicabile pentru evaluări toxicologice și farmacologice;
- Noi modele experimentale, pe non-mamifere (de ex., *Xenopus levi*, zebra fish, *Chaenorabditis elegans*, *Drosophila*);
- Modele experimentale ce utilizează animale transgenice sau modificate genetic.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Metodologia de investigare a caracteristicilor biologice

- Testarea pe sisteme (modele) de organ izolat;
- Testarea pe modele de culturi celulare, animale sau umane :
 - Teste de citotoxicitate,
 - Toleranta,
 - Actiuni pro- sau antioxidante,
 - Activarea specifica a unor cai de semnalizare,
 - Interferente ale compusilor naturali cu agenti farmaceutic clasici ;
- Utilizarea modelelor 3D (tesut reconstituit) ca model de testare
- Teste de corozivitate;

Proiectul este cofinanțat din Fondul European de Dezvoltare Regională, prin Programul Operațional Competitivitate



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Restrictionari ale metodologiei

- **Aplicarea metodelor de testare pe modele animale cu sange cald nu este permisa pentru produsele cosmetice si dermatocosmetice;**
- **Se recomanda utilizarea de modele alternative, respectiv:**
 - **culturile celulare,**
 - **modelele 3D,**
 - **modelele pe organ izolat sau**
 - **alte modele alternative (de ex. Het-CAM ca alternativa pentru corozivitatea oculara).**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Metode alternative de testare

- Termenul "alternativa" este in general asociat cu *Principiile celor 3R* (in traducere - Inlocuire, Reducere, Rafinare).
- In acest context, o metoda alternativa serveste
 - pentru a inlocui complet un test pe animal,
 - pentru a reduce numarul de animale utilizate in test sau
 - pentru a rafina o procedura de testare pe model animal cu scop final de a reduce durerea si suferinta.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Metode alternative de testare

- Metodele alternative de testare care sunt dezvoltate pentru a reduce sau înlocui experimentele pe animale se bazează de regulă fie pe sisteme *in vitro*, fie pe modele computerizate.
- Metodele de testare *in vitro* folosesc: tesuturi, tesuturi reconstruite, celule integrale sau parti de celule.
- Dezvoltările recente ale cercetării bazate pe celule includ dezvoltarea de culturi bidimensionale, tridimensionale și coculturi, care mimează celulele și tesuturile din corpul uman.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Metode alternative de testare

- **Cresterea utilizarii tehnologiilor 'omice' (de ex. transcriptomica, proteomica si metabonomica) in combinatie cu sistemele de testare *in vitro* permite o analiza comprehensive a impactului unui compus la nivel molecular si poate indica potentialele cai toxicologice care pot conduce la efecte adverse.**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Metode alternative de testare

- **Abordările computationale (numite adesea metode *in silico* sau metode de non-testare) devin din ce în ce mai puternice și se pot utiliza pentru a prezice toxicitatea sau efectul unei substanțe, prezise din proprietățile lor fundamentale.**
- **Modelele computazionale sunt, de asemenea, instrumente pentru integrarea eficientă a datelor care provin din metodele complementare *in vitro* și *in silico*.**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Exemple de metode alternative de testare

- **DB ALM 101 Colony forming unit Granulocyte/Macropage Colony Forming Units (GM-CFU) Assay;**
- **OECD 482 Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells *in vitro*;**
- **OECD 430 *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER);**
- **OECD 431 *In vitro* skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method;**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

- **OECD 432 *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test;**
- **OECD 435 *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion;**
- **OECD 437 Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying: i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage;**
- **OECD 438 Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage;**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

- **OECD 439 *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method;**
- **OECD 442C *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA);**
- **OECD 442D *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method;**
- **OECD 442E *In Vitro* Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT);**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

- **OECD 439 *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method;**
- **OECD 442C *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA);**
- **OECD 442D *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method;**
- **OECD 442E *In Vitro* Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT);**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

- **OECD 455 Performance-based test guideline for stably transfected transactivation in vitro assays to detect estrogen receptor agonists and antagonists;**
- **OECD 471 Bacterial Reverse Mutation Test;**
- **OECD 473 *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test;**
- **OECD 476 *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xpirt genes;**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

- **OECD 480 Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene Mutation Assay;**
- **OECD 481 Genetic Toxicology: *Saacharomyces cerevisiae*, Miotic Recombination Assay;**
- **OECD 487 *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test;**
- **OECD 490 *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene;**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

- **OECD 491 Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage;**
- **OECD 492 Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage;**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Testarea *in silico*

PRINCIPIU

➤ Este, de regula, prima etapa in orice demers de identificare a unor compusi noi cu activitate biologica si permite investigarea (simularea) unui numar de compusi de ordinul a 10^4 - 10^6 entitati.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Testarea *in silico*

➤ Avantaje:

- Nu necesita consum de produs sau de sisteme biologice de testare,
- Capacitatea ridicata de procesare.

➤ Limitări:

- In general se aplica sistemelor monocomponente, si este dificil de aplicat pe sisteme multicomponente, cum sunt majoritatea extractelor vegetale;
- In general, capacitatea de “sortare” are un “bias” dependent de modelul/ algoritmul de calcul. Pe masura ce modelele “*in silico*” sunt dublate de modele *in vivo/in vitro*, acuratetea sistemului se imbunatateste, mai ales cand vorbim de utilizarea de sisteme de tip “learning machine”.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Alte metode de testare

- **Bazate pe utilizarea de “modele” reprezentate de :**
 - **Culturi de organisme prokaryote (bacterii); Evaluarea unor activități specifice, cum ar fi activitatea antimicrobiană; Evaluarea potentialelor efecte adverse – de regula, activitate mutagena (de exemplu SOS cromotest pe *E. coli* L12 ori testul Ames pe *Salmonella*);**
 - **Culturi de celule eukariote (levuri) – in general evidentiaza efecte genotoxice (e.g GreenScreen);**
 - **Culturi de celule si tesuturi animale, preponderent culturi de celule de mamifere, cu o creștere substantiala a utilizarii liniilor celulare umane.**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Metode alternative de testare

➤ Teste de citotoxicitate:

- Generale,
- Specifice;

➤ Teste de genotoxicitate (de ex. testul micronucleilor)

➤ Teste de activitate specifica precum:

- Actiune antitumorală,
- Actiune imunomodulatoare,
- Actiune antiproliferativă,
- Actiune antioxidantă.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Utilizarea celulelor animale

➤ In ultimii circa 20 de ani, CE (Comisia Europeana), FDA (Food and Drug Administration), ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods), EMA (European Medicine Agency), ECHA (European Chemicals Agency) si OMS au facut eforturi considerabile de restrangere a utilizarii metodologiei *in vivo* si inlocuire cu metodologia de testare *in vitro*, astfel fiind puse la dispozitie un numar considerabil de metode alternative de testare bazate pe utilizarea culturilor de celule animale, iar mai recent pe modele de culturi 3D, modele care permit evaluarea unor clase speciale de toxicitati, cum ar fi toxicitati dermale, oculare si asupra diverselor tipuri de mucoase (orala, nazala, gastrica sau intestinala).



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Utilizarea celulelor animale

- Tehnologia de testare utilizand modele de cultura contine un segment “preanalitic” reprezentat de etapele de “conditionare” a probelor pentru testat;
- In sistemele moderne, de tip *high-throughput*, aceasta poate include “biblioteci” de compusi din care se realizeaza extragerea si conditionarea automatizat.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Utilizarea celulelor animale

- Tehnologia de testare utilizand modele de cultura contine sistemul de expunere (cultura, co-cultura) reprezentat de culturi in formate adecvate cu tipul de investigatie - inclusiv cu sistemele finale de masurare a efectelor, de exemplu:
 - Placi de cultura cu 12, 24, 96, 384 sau 1536 de godeuri) normale, pentru sisteme de fluorescenta, scintilator lichid, chemiluminescenta;
 - Flacoane de cultura;
 - Placi de cultura care permit insertii pentru cocultura.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Utilizarea celulelor animale

- **Sistemul de masurare a punctelor finale este reprezentat de:**
 - **Sisteme de evaluare a numarului de celule viabile pe baza masuratorilor unor indicatori metabolici (LDH, respirație celulara, etc) prin sisteme de masura de tip microplate reader;**
 - **Sisteme care permit evaluarea in timp real a numarului de celule (de exemplu, eXcelligence);**
 - **Alte sisteme de detectie (de exemplu: Luminex, on chip monitoring, microarrays, citometrie în flux);**
 - **Sistemele efective de asigurare a conditiilor experimentale.**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Teste *in vitro* - avantaje

- **Cantitati restranse de material biologic pentru realizarea unui test (in functie de sistemul utilizat, 100-500 mg produs permit testarea pe linii celulare multiple si estimarea un parametri pecum CE50 si IC50.**
- **Posibilitatea cuplarii testelor privind viabilitatea cu teste de estimare a unor modificari in profilul de expresie al unor seturi de molecule relevante (cytokine, chemochine, factori de crestere, receptori celulari, factori de transductie a semnalului, acizi nucleici (ARN, miRNA), protein extra- si intracelulare.**
- **Evaluarea unor modificari (fiziologice sau patologice) ale celulelor - de exemplu transformarea tumorală, dediferentiere, diferentiere celulara.**



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

- Prin aplicarea modelelor avansate – de tipul culturilor 3D si a culturilor de tesuturi reconstituite - sunt posibile teste in care se obtine o mai buna stabilitate a modelului experimental (prin conservarea caracteristicilor histologice ale tipului/tipurilor celulare “primare”), si implicit realizarea de testari farmacologice pe perioade mai indelungate (de peste 30 de zile), si cu o acuratete ameliorata.
- Modelele de tip tesut reconstituit si cocultura permit inclusiv evaluarea interconditionarilor celulelor participante la elaborarea raspusurilor biologice.



UNIUNEA EUROPEANĂ



Instrumente Structurale
2014-2020

Teste *in vitro* - dezavantaje

- Indiferent de modelul utilizat, testele *in vitro* nu permit estimarea toxicitatilor de tip subacut, subcronic sau cronic;
- In anumite situatii pot aparea rezultate “fals positive” datorita faptului ca sistemele *in vitro* nu pot reproduce efectele produsilor care sufera transformari semnificative in tractul digestiv (in general, cele cu greutate moleculare ridicate, precum proteinele, compusi esterificati, etc.).