

**Cercetarea preclinică, o etapă
esențială și obligatorie care
precede inițierea studiilor clinice**

Prof. Dr. BOGDAN OVIDIU POPESCU, CS I

Dr. EMILIA MANOLE, CS II

**Laboratorul de Biologie celulară, Neuroștiințe și
Miologie experimentală**

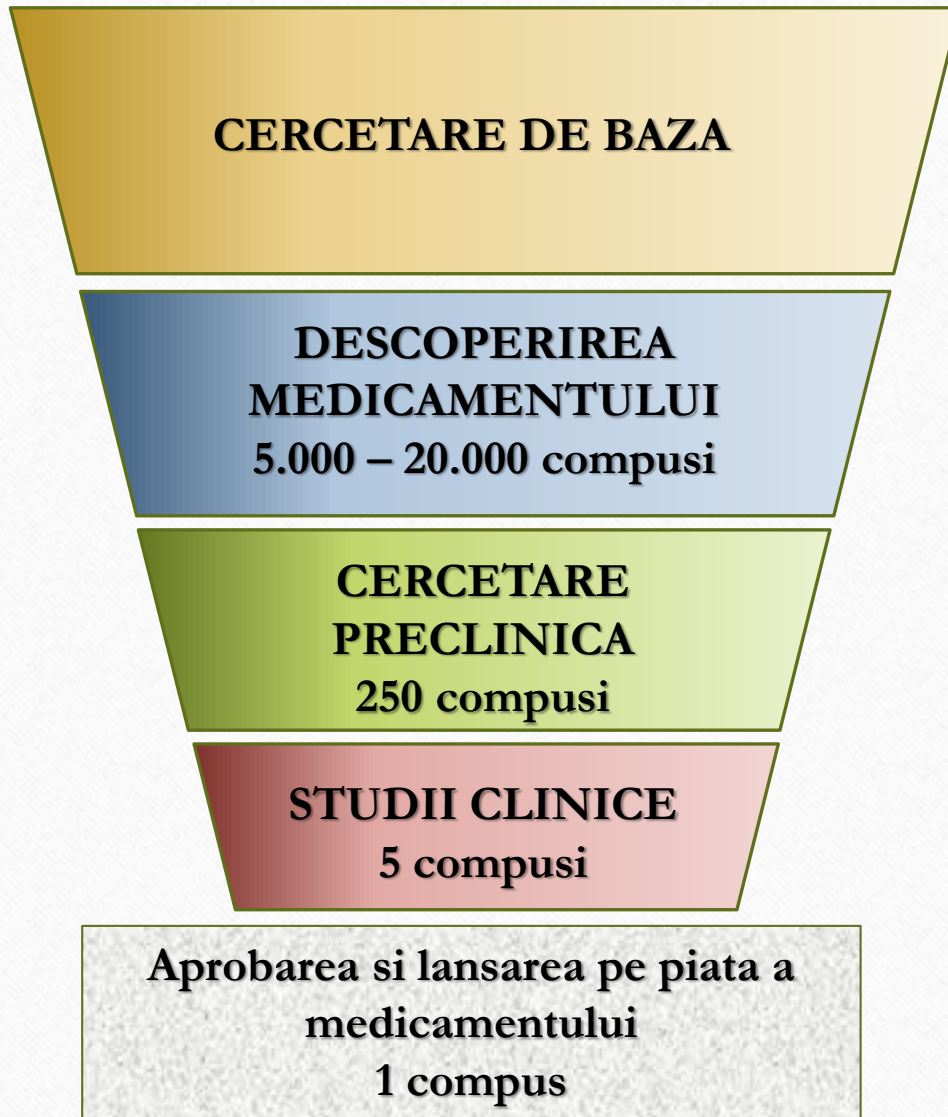
De ce cercetare preclinică ?

- **Demonstrarea siguranței și eficacității produsului testat față de un anumit tip de celule sau un anumit organ țintă, înainte de trialurile clinice**
- **Informații privind doza de start sigură (nu provoacă efecte adverse majore și nu e toxică)**



Din aproximativ 5.000 de compuși care intră în stadiul de “descoperire de noi medicamente”, la finalul studiilor preclinice (care pot dura 12 ani) **doar unul** primește aprobarea pentru a intra mai departe în evaluare pe baza studiilor clinice.

Costul poate ajunge la 1 miliard de dolari americani.



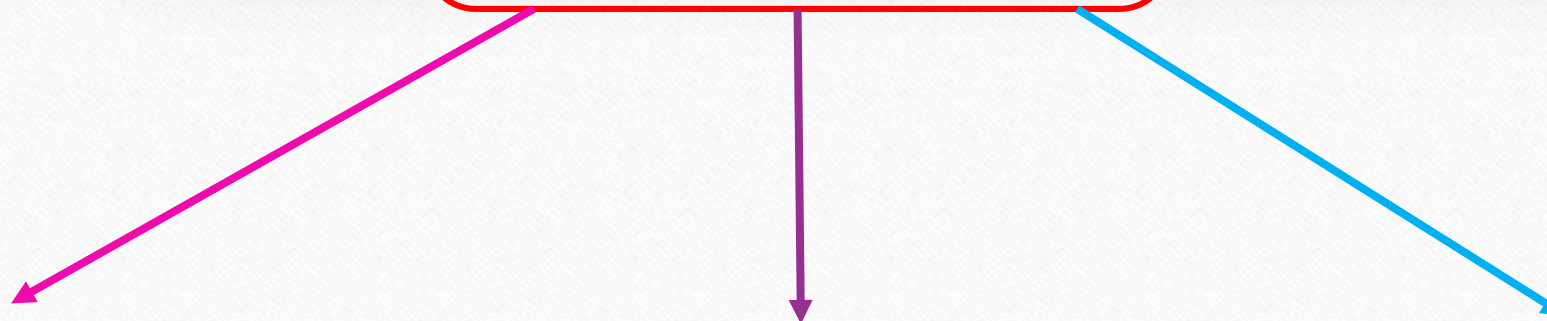
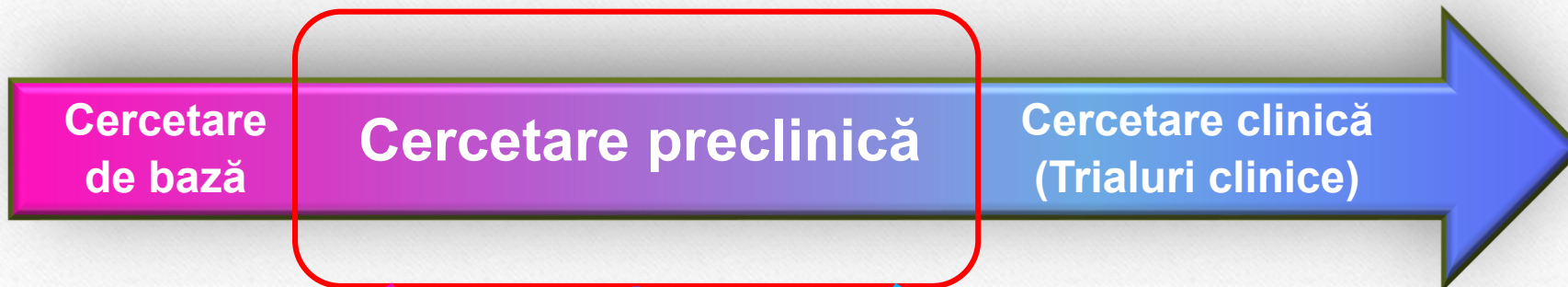
Identificarea si validarea tinte

Obtinerea si optimizarea compusului
Screening virtual (in silico)

Studii farmacodinamice
Studii farmacokinetice
Studii toxicologice

Fazele I, II, si III de studii clinice

Faza IV de studiu clinic, post-marketing



CERCETAREA *IN VITRO*



- *in vitro* (lat.) = "în sticlă" (recipiente pentru culturi celulare)
- studii pe culturi de celule, de țesuturi sau organe, bacterii, virusuri
- comportamentul unui anumit tip de celule în prezența produșilor testați, într-un mediu controlat, care permite o monitorizare strictă a condițiilor experimentale și pune mai clar în evidență modul de acțiune al compusului investigat.
- expresia proteomică/genomică/epigenetică a unor biomarkeri celulari în diferite condiții de mediu/tratament cu produsul testat

CERCETAREA *IN VITRO*



➤ primele studii la nivel celular privind:

- viabilitatea/proliferarea celulară (testul MTS) în prezența compusului testat
- toxicitatea compusului în funcție de doză și durata de acțiune (testul LDH)

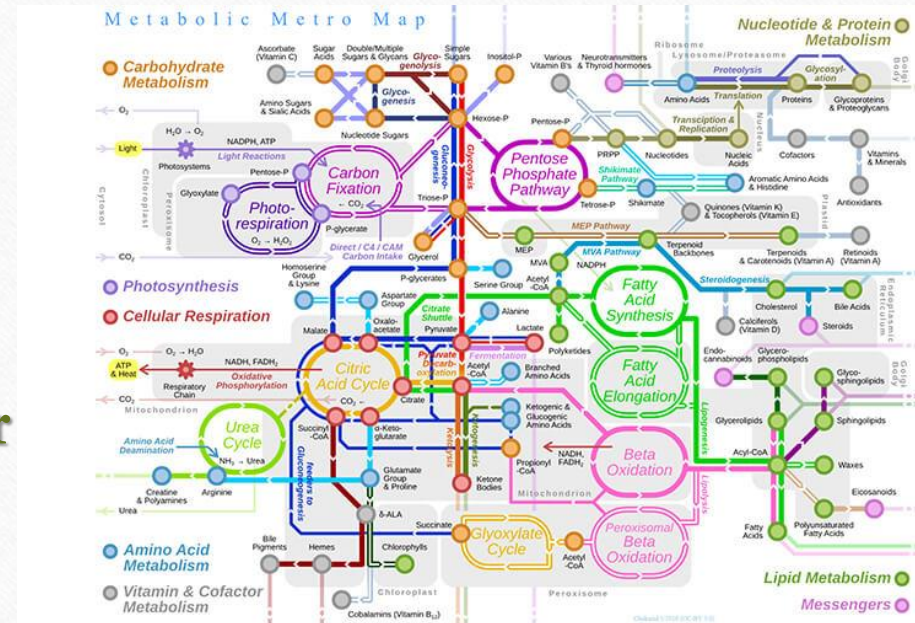
➤ teste adiționale: carcinogenitatea

CERCETAREA *IN VITRO*



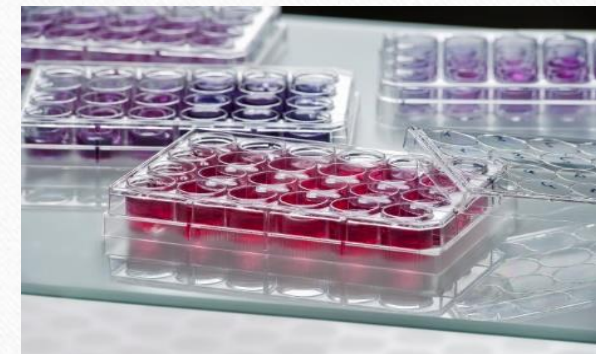
Se culeg date despre compusul testat:

- efectul biologic și eficiența la nivel celular
- modificarea metabolismului celular
- calea/căile de semnalizare pe care acționează



<https://canopybiosciences.com/product/metabolic-pathways/>

CERCETAREA *IN VITRO*



AVANTAJE

- un singur tip celular de interes în patologia abordată
- se poate urmări efectul unui număr mare de compuși biologici diferiți pe un singur tip de celulă țintă
- rezultate mai rapide
- studii mai puțin costisitoare decât cele *in vivo*
- pun mai puține probleme de etică și siguranță
- liniile celulare sunt o sursă inepuizabilă de material biologic dacă sunt crescute în condiții optime

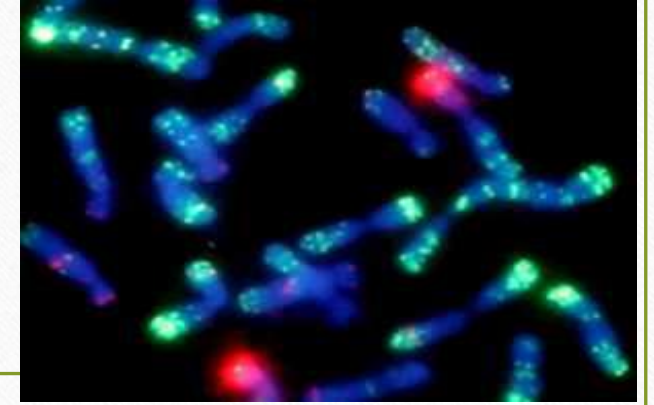
CERCETAREA *IN VITRO*



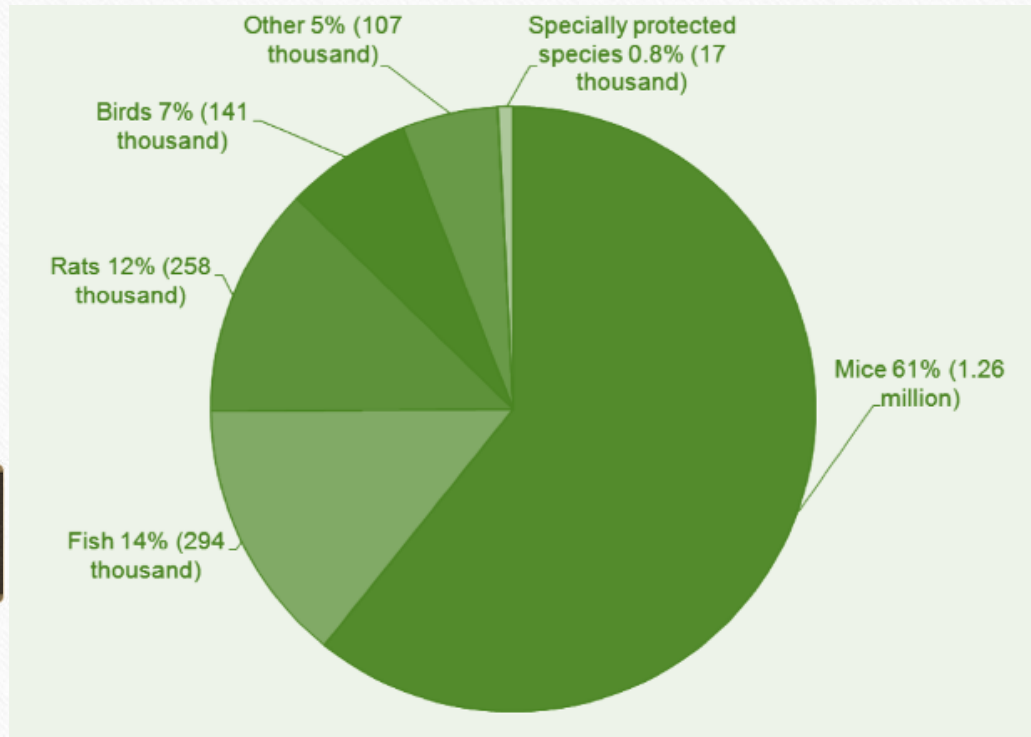
DEZAVANTAJE:

- nu se pot reproduce condițiile mult mai complexe existente într-un organism viu
 - celule de același tip, crescute în condiții controlate de mediu, care nu vin în contact și nu interacționează cu alte zeci de tipuri de celule care se găsesc într-un organism viu
- interpretarea datelor – cu precauție, rezultatele nu prezic în mod obligatoriu reacția la tratament a unui organism viu

STUDII *IN SITU*



- *in situ* = „la locul de origine”, observații în contextul natural, dar în afara organismului viu, într-un țesut sau organ
- plasat cumva între *in vitro* și *in vivo*
- exemple:
 - hibridizarea *in situ*, vizualizarea și localizarea unui anumit fragment de acid nucleic într-o probă de țesut, pe o secțiune observabilă la microscop
 - studii asupra cariilor din dinți proveniți de la pacienți
 - studii pe carcinoame excizate chirurgical de la nivelul diferitelor organe



<https://ysjournal.com/in-vivo-modelling-within-pharmacological-research-its-limitations-and-alternative-methods-of-research/>

Salonee Banerjee June 17, 2020

Animalele utilizate cel mai mult in experimente in UK, 2015

Institutul Național de Patologie "Victor Babeș", Școala din vacanță, 2023

CERCETAREA *IN VIVO*



- implică organisme vii, unde intervine metabolismul și interacțiunea extrem de complexă între diferite tipuri celulare, țesuturi, organe
- în condiții fiziologice controlate
- chiar și trialurile clinice sunt studii *in vivo*, pe om
- sunt mai precise decât experimentele *in vitro*

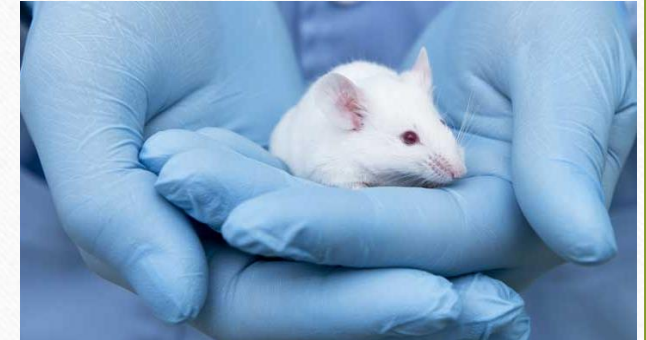
CERCETAREA *IN VIVO*



AVANTAJE:

- Demonstrază efectul unui produs farmaceutic asupra organismului ca un tot, cu interconectări între diferite tipuri de celule, țesuturi, organe, sisteme
- Îmbunătățește studiul de impact al unui potențial produs medicamentos asupra unei boli umane
- Arată mai riguros siguranța, toleranța, toxicitatea și eficacitatea produsului testat asupra organismului decât în studiile *in vitro*

CERCETAREA *IN VIVO*



DEZAVANTAJE:

- **necesită cerințe etice mai importante și mai complexe**
 - **în ultimii ani există dezbateri etice importante asupra necesității testării unor produse pe animale, de ex. produsele cosmetice**
 - **cercetătorii trebuie să demonstreze că nu există metodologii alternative pentru a-și demonstra ipotezele, să arate că beneficiile studiului depășesc dezavantajele (suferința cauzată animalelor)**

CERCETAREA *IN VIVO*



DEZAVANTAJE:

- necesită mai mult timp de desfășurare față de studiile *in vitro*
- sunt mai costisitoare
- există multe metodologii și protocoale pentru același studiu, în funcție de laborator (de echipa de cercetători)
 - într-un studiu amplu, cu mulți parteneri, se impune normalizarea procedurilor pentru obținerea unor rezultate reale, cuantificabile, comparabile

CERCETAREA *IN VIVO*



Considerații etice

- în majoritatea țărilor este necesară aprobarea unor comisii/comitete de etică, conform legislației, pentru a putea face studii pe animale
 - pentru a exista asigurarea că utilizarea animalelor este imperios necesară pentru a obține rezultatele dorite
 - pentru ca tratamentul aplicat animalelor să nu le producă o suferință inutilă sau un grad ridicat de durere sau vătămare

CERCETAREA *IN VIVO*



Evaluarea produsului testat

1. Farmacodinamica:

- descrie relația dintre concentrația unui medicament în organism și efectul lui biologic (răspunsul la doză).
- arată cât de puternic și eficient este un medicament, având în vedere efectul farmacologic dorit, ținând cont și de siguranța utilizării lui.
- stabilește “indexul terapeutic” al unui medicament, descriind raportul dintre doza care cauzează toxicitate și doza care are un efect terapeutic.
 - indexul terapeutic ideal ar trebui să fie destul de mare, astfel încât să indice o fereastră terapeutică largă.

CERCETAREA *IN VIVO*



2. Farmacocinetica:

- arată cum reacționează organismul în prezența medicamentului
- efectul unui medicament este determinat de cantitatea de substanță activă prezentă în organism, la locul țintit.
 - depinde de absorbția, distribuția, metabolismul și excreția medicamentului în corp
- descrie modificările care apar în timp privind concentrația plasmatică a compusului activ testat
 - un pas cheie în stabilirea dozei și a schemei de administrare a medicamentului

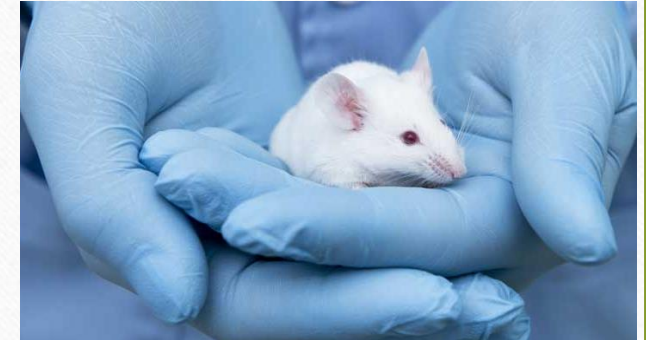
CERCETAREA *IN VIVO*



2. Farmacocinetica:

- *Administrarea orală* trebuie să țină cont de absorbția la nivel gastro-intestinal
 - trebuie evidențiată cantitatea produsului activ care ajunge în sânge, permițând transportul la organul țintă.
 - medicamentul ajunge întâi în ficat, primul obstacol metabolic, concentrația și biodisponibilitatea medicamentului reducându-se.
- *Administrarea intravenoasă* ocolește ficatul, medicamentul fiind transportat direct prin sânge către diferite țesuturi țintă.

CERCETAREA *IN VIVO*



2. Farmacocinetica:

- *Distribuția* compusului activ în organism este determinată de:
- afinitatea medicamentului pentru proteinele plasmaticice
 - proprietățile moleculare și polaritatea medicamentului
 - vascularizația țesutului țintă

CERCETAREA *IN VIVO*



2. Farmacocinetica:

➤ *Eliminarea* medicamentului – intervine metabolismul

- modifică chimic substanța inițială și o transformă în metabolit farmacologic activ sau inert.
- se face renal și hepatic – excepție: substanțe volatile (anestezicele), se elimină și la nivelul plămânilor.
- când rata de eliminare este egală cu rata de absorbție, se atinge așa numita stare stabilă, care poate fi atinsă prin doze repetate.

= informație crucială pentru stabilirea dozelor pe termen lung și a concentrației utilizate.

CERCETAREA *IN VIVO*



3. Toxicitatea:

- **determină dacă un medicament este sigur (“safe”) pentru a fi testat pe subiecți umani**
- **stabilește cel mai mic grad de toxicitate al primei doze, doza de start în trialurile clinice**
- **se stabilesc o serie de biomakeri pentru monitorizarea efectelor adverse**
- **se începe cu studii privind o singură doză, pentru a identifica organele care ar putea suferi din cauza toxicității medicamentului, urmând studii cu doze repetate**

CERCETAREA *IN VIVO*



3. Toxicitatea:

- evaluarea carcinogenității, a toxicității reproductive și a genotoxicității (poate fi studiată și *in vitro*)
- determina durata, schema de terapie și calea de administrare a medicamentului
- carcinogenitatea și toxicitatea reproductivă se face de obicei pe modele *in vivo* de șobolani, cu administrare de minimum 6 luni a medicamentului
 - efectul evident apare doar după o expunere prelungită la medicament.

CERCETAREA *IN VIVO*



Alegerea modelului animal

- Cele mai multe studii *in vivo* se fac pe mamifere: rozătoare și câini.
- Alte studii, în special genetice: insecte (musculita de otet, *Drosophila melanogaster*), viermi (nematodul *Caenorhabditis elegans*), pești (zebra fish).
- Cel mai utilizat animal pentru teste farmacologice este șoarecele
 - genomul se suprapune 99% peste cel uman.
 - manipularea genetică este relativ simplă, obținerea de modele transgenice care să imite patologia umană fiind astfel posibilă și rapidă.

CERCETAREA *IN VIVO*



- **Diferențele sau asemănările dintre organismal uman și modelul animal fac ca anumite specii să fie mai indicate în anumite cazuri.**
- **Există la aceeași specie și aceeași patologie, o multitudine de modele și protocoale experimentale care diferă (în funcție de laborator) și care duc la rezultate diferite, greu de comparat.**

CERCETAREA *IN VIVO*



- Modelele canine nu sunt bune pentru testele cu administrare orală a compusului, tubul digestiv al carnivorelor este mai scurt decât cel al omnivorelor și rata de golire gastrică este crescută.
- Rozatoarele nu pot fi modele pentru administrarea de antibiotice, alterarea la nivelul florei intestinale cauzează efecte adverse semnificative.
- Medicamentul poate fi metabolizat similar sau diferit la diferite specii, fapt care va afecta atât eficacitatea, cât și toxicitatea acestuia.

CERCETAREA *IN VIVO*

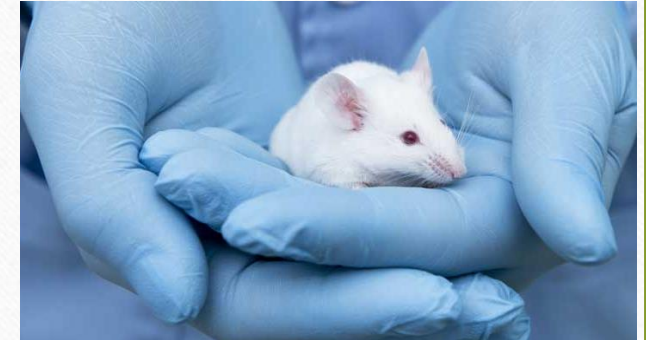


Exemple:

➤ studiul medicamentelor contra cancerului

- modele murine - utilizarea xenogrefelor (celule, țesuturi de la o altă specie) de om pe șoarece imunodeficient
 - ✓ celulele tumorale (din linii celulare sau celule de la pacienți), transplântate de obicei subcutan, determină formarea de tumori pe care se testează diferiți compuși cu rol terapeutic.

CERCETAREA *IN VIVO*



- modele tumorale ortotopice - implantarea de tumori direct în organul țintă (organul de origine al tumorii) pentru a crea condiții care să mimeze mai bine microambientul în care se dezvoltă cancerul și căile de metastazare.
- modelele genetice de șoareci care imită mai îndeaproape patologia umană se dovedesc tot mai valoroase pentru cercetarea translațională.

CERCETAREA *IN VIVO*



➤ studiul distrofiei musculare Duchenne

Alegerea modelului animal se face pe baza a trei considerente:

- similaritate genetică și patologică cu boala umană;
- disponibilitatea datelor în ceea ce privește patologia animală;
- accesibilitatea și costurile pentru menținerea grupului de animale care intră în studiu.

Mai mulți experți în domeniu au sugerat că cele mai bune modele animale pentru testarea eficacității medicamentelor pentru DMD sunt: șoarecele *mdx* și modelul canin de golden retriever cu distrofie musculară (GRMD).

CERCETAREA *IN VIVO*



➤ Unele specii prezintă similitudini cu omul în ceea ce privește fiziologia unui anumit organ sau a unui sistem de organe → exemple:

- suinele sunt utilizate pentru studii dermatologice și coronariene
- caprele pentru studii de implant mamar
- câinii pentru studii de patologie musculară, patologie canceroasă

CERCETAREA *IN VIVO*



Conform ghidurilor speciale privind administrarea medicamentelor:

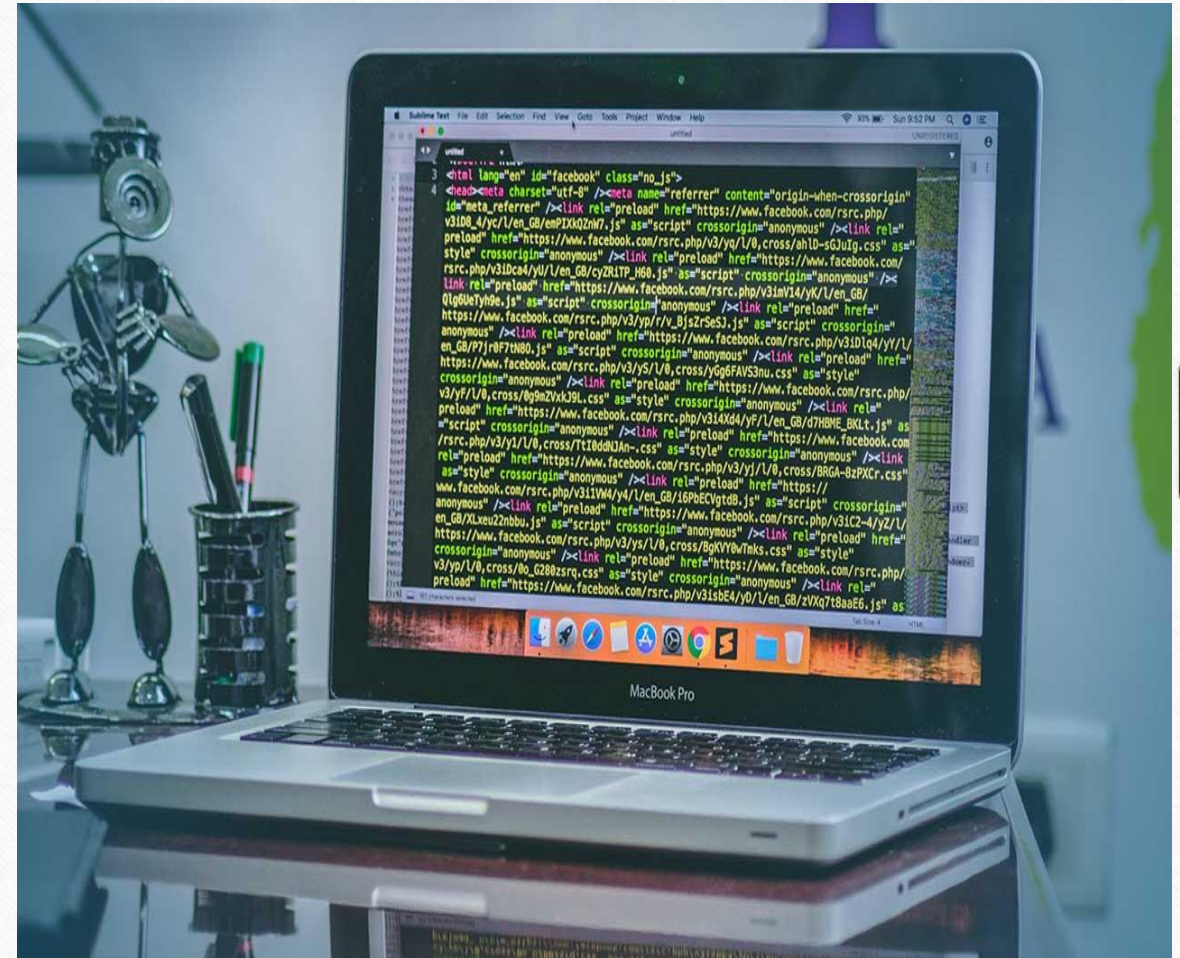
- european al EMA (Agenția Europeană a Medicamentului),
- american al FDA (agenția pentru “Food and Drug Administration”),
- celor emise de autoritațile locale specifice unei țări,

Înainte de a primi autorizarea pentru trialuri pe subiecți umani

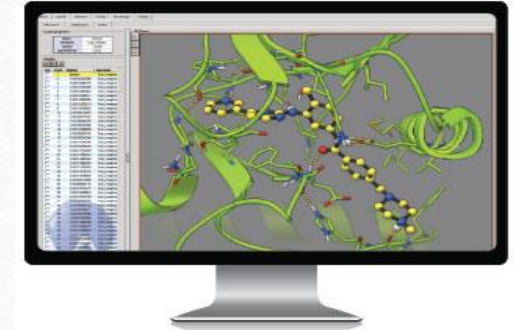
este nevoie de testări *in vivo*, care să prezinte siguranță, **pe cel puțin două specii**, una nefiind de rozătoare

CERCETAREA *IN SILICO*

- **Identificarea țintei**
- **Simulări pe computer**
 - cum s-ar putea comporta o substanță terapeutică în diferite experimente, pe anumite patologii (înainte de testele preclinice; înainte de testele clinice)
- **Bioinformatica - analiza sutelor de modificări produse deja în modelele preclice sau care s-ar putea produce ulterior**

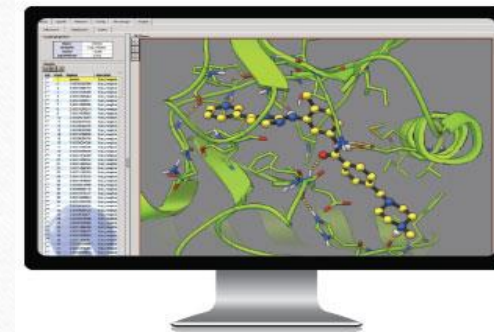


CERCETAREA *IN SILICO*



- Impact în toxicologie, metabolism, farmacogenetică
- Anii 1990 – mai ales în farmacokinetica
- Prezent – științele “omice” – proteomica, genomica, metabolomica

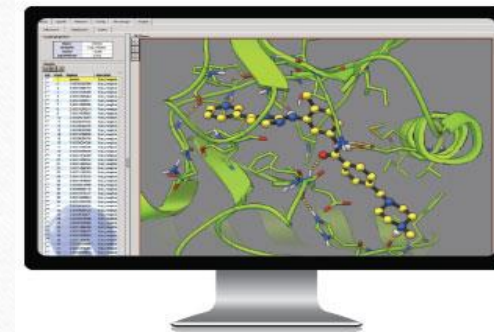
CERCETAREA *IN SILICO*



AVANTAJE

- mai rapidă
- costuri mai mici
- oferă predicție încă din primele faze ale studiului unui medicament, mai ales pentru:
 - ADME (absorbția, distribuția, metabolismul, excreția)
 - transportul prin membrane
 - toxicitatea

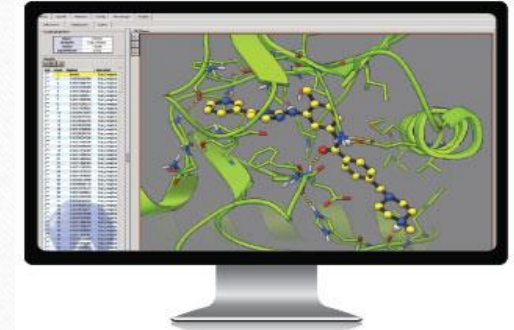
CERCETAREA *IN SILICO*



Poate estima unele proprietăți fizico-chimice ale unor substanțe, cum ar fi:

- lipofilicitatea
- solubilitatea
- permeabilitatea prin membranele biologice
 - diferite sisteme de transport ale moleculelor biologic active pot afecta activitatea și proprietățile acestora
 - există programe software speciale pentru a estima aceste date printr-un screening virtual

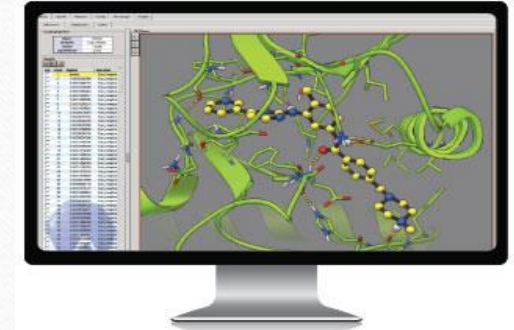
CERCETAREA *IN SILICO*



DEZAVANTAJE

- existența a relativ puține baze de date pentru dezvoltarea/apariția medicamentelor noi
- puțini specialiști care să lucreze cu datele deja existente

CERCETAREA *IN SILICO*



Exemple de studii *in silico*

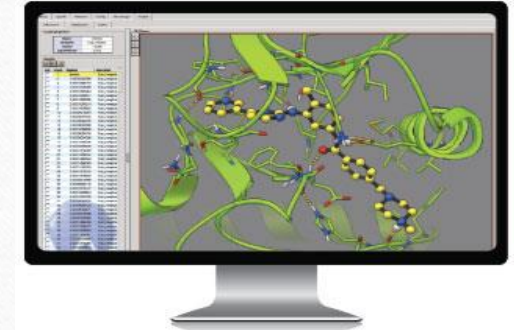
1) KAUST Visualization Core Lab (KVL)

- KVL a colaborat cu mai multe grupuri de cercetători pentru proiectul de Modelare Integrativa a Metabolismului Energetic al Creierului (parte dintr-un proiect mai mare, Blue Brain Project). Printre cercetatori se numara Prof. Pierre Magistretti si Corrado Cali.



O “felie” care face parte dintr-o mare bază de date cu imagini care reprezintă o reconstrucție digitală și simulări ale creierului de șoarece, utilizând un supercomputer

CERCETAREA *IN SILICO*



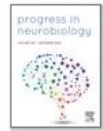
Contribuția lui Cali și Magistretti la proiectul Blue Brain a fost elaborarea unor **modele 3D de astrocite** utilizând o tehnică specială de de microscopie electronică de înaltă rezoluție, reconstituind 4 astrocite.

Imaginile erau prea mici pentru a realiza o morfologie completă a astrocitelor și neuronilor, dar volumul reconstituit conținea toate prelungirile celulare proximale.

S-a făcut ulterior o analiză cantitativă pe modele 3D și s-a descoperit mecanismul prin care lactatul trece din astrocite în neuroni și nu invers.



Progress in Neurobiology
Volume 183, December 2019, 101696

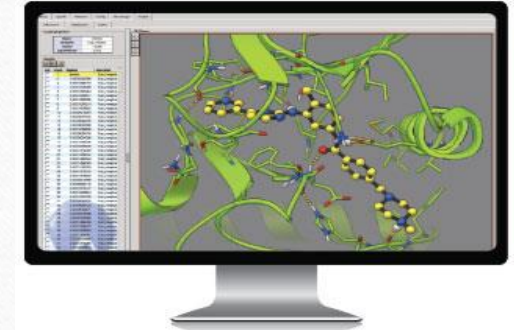


Original Research Article

3D cellular reconstruction of cortical glia and parenchymal morphometric analysis from Serial Block-Face Electron Microscopy of juvenile rat

Corrado Cali ^a, , Marco Agus ^{b, c}, Kalpana Kare ^a, Daniya J. Boges ^a, Heikki Lehmäslaiho ^{a, d}, Markus Hadwiger ^b, Pierre J. Magistretti ^a

CERCETAREA *IN SILICO*



- Tot mai multe studii de tip „**machine learning**”
 - Studierea unor algoritmi generați pe computer care se pot îmbunătăți automat prin experiența rezultatelor anterioare și utilizarea bazelor de date
 - Vazută ca o parte a inteligenței artificiale

Jianhong Kang, Ting Chen, Honghe Luo et al., Machine learning predictive model for severe COVID-19, *Infect Genet Evol.*, 2021; 90: 10473

Marcos-Zambrano LJ, Karaduzovic-Hadziabdic K, Turukalo TL et al, Applications of machine learning in human microbiome studies: a review on feature selection, biomarker identification, disease prediction and treatment, *Front. Microbiol.*, 2021 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.634511>

Exemple de proiecte de cercetare ale laboratorului



- „Efectul produșilor microbiotei intestinale și proteinelor amiloid funcționale asupra agregării patologice a proteinelor și asupra propagării patologiei după un model prionic în modelele de neurodegenerare”
- „Alterarea barierei hemato-nervoase în diferite tipuri de neuropatii periferice: modificarea expresiei proteinelor joncțiunilor strânse ca marker diagnostic”
- “Bazele moleculare ale îmbătrânirii mușchiului”

Metode și protocoale utilizate în laborator

- Studii *in vitro* – realizarea de modele pe culturi celulare
- Studii *in vivo* – realizarea de modele animale pe șoareci/șobolani
- Tehnici pentru studierea biomarkerilor și a proteinelor modificate patologic:
 - IHC/IF
 - Western Blot
 - Electroforeza în gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)
 - Detectarea unor mutații genetice – MLPA, PCR, droplet digital PCR