

TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ ȘI CULTURI CELULARE SI ORGANOTIPICE ÎN EVALUĂRILE CARACTERISTICILOR FARMACOLOGICE ALE FRAȚIILOR STANDARDIZATE ALE PRODUSELOR APICOLE

R. STOJKO¹, Zofia DZIERŻEWICZ³, J. STOJKO², A. STOJKO², Agata PYTEL¹

¹Department of Pathology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLONIA
E-mail: rstojko@slam.katowice.pl

²Department of Sanitation, Bioanalysis & Environment Research, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLONIA

³Department of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLONIA

Introducere

Evoluția medicamentelor a fost determinată de dezvoltarea științelor de bază cât și de medicină și tehnologie. Aceste domenii ale cunoașterii umane au permis și au înlesnit cercetarea farmacodinamică necesară pentru estimarea și standardizarea farmacologică a substanțelor active obținute din materiale de origine biogenică. Observațiile făcute s-au dovedit un punct de plecare pentru obținerea medicamentelor sintetice. Dezvoltarea paralelă a biotehnologiei, farmacologiei și fitochimiei a condus la progrese considerabile în ce privește metodele de detectare, izolare și analizare a unor substanțe precum glicozidele, alcaloizii și flavonoizii. Aceste descoperiri au fost însoțite și de studii farmacodinamice tot mai profunde ce caracterizau accesibilitatea biologică a medicamentului și stabileau caracteristicile sale farmacologice și toxicologice. Dezvoltarea științelor de bază – în special biologia moleculară și genetica – a contribuit la cunoașterea diferitelor mecanisme care însoțesc procesele farmacodinamice și farmacochinetice. Descoperirea lor a depins de tipul medicamentului, de forma și prelucrarea lui în organism, acestea fiind de fapt rezultatul interacțiunii dintre numeroșii factori genetici și non-genetici. Produsele farmacogenetice ne-au înzestrat cu o serie de cazuri în care factorii genetici și de mediu coexistă și conlucrează.

Studii recente au arătat că fiecare rasă umană are o reacție diferită la unele substanțe active prezente în medicamente. În special rasele caucaziană și asiatică prezintă cele mai mari diferențe. Se știe de asemenea că oamenii bolnavi din cadrul aceleiași rase au reacții diferite la medicament în funcție de vârstă, sex, stare generală de sănătate precum și a altor medicamente deja luate de ei. Există dovezi că genele pot influența eficacitatea și eficiența diferitelor metode de tratament farmacologic. Acest lucru se datorează faptului că tocmai genele sunt răspunzătoare de sinteza enzimelor care iau parte la reacțiile chimice care au loc în corpul nostru, inclusiv direcția și durata schimbărilor chimice care rezultă din medicamentele prescrise. Aceste constatări sunt parțial rezultatele observării unor bolnavi de tuberculoză care au fost tratați cu isoniazidă. În cazul unor pacienți medicamentul nemetabolizat a rămas în sânge timp mai îndelungat. Acești pacienți au suferit de tulburări neurologice; ceilalți n-au avut aceste probleme. Studiile genetice efectuate cu acești pacienți – care reacționau diferit la tratament – au indicat două tipuri de metabolism ereditar vizavi de isoniazidă – așa numitul metabolism lent și cel rapid.

În ultimii ani au fost descoperite diferite tipuri de gene ale căror produse proteice participă la procesul schimbărilor chimice ca enzime. Doctorii de obicei nu au nici o îndoială în ce privește tipul și doza unui medicament, când bolile sunt cauzate de o singură genă. Procesul de cartografiere a polimorfismului unicului nucleotid (PUN) prezent în întregul genom este continuat. O singură schimbare a nucleotidului, observată în secvențele de gene codificatoare ale proteinelor ce transportă și metabolizează medicamentele este baza farmacogenomicii. Când mai mult de o genă joacă un rol important într-o anumită boală, alegerea terapiei corecte nu este tocmai simplă. Din păcate bolile cauzate de mai multe gene constituie grupul cel mai numeros din toate bolile. În momentul de față sunt căutate așa numitele "puncte fierbinți", adică fragmente de ADN care tocmai din cauza diferențelor pe care le prezintă în diferiți oameni sunt responsabile pentru reacțiile diferite ale unui organism față de un anumit medicament. Farmacogenomica, un domeniu nou al biomedicinii va trata probabil orice pacient individual, pe baza setului său PUN sau a "punctelor fierbinți" din moleculele de ADN.

Farmacogenomica este un domeniu care va răspunde de "tratamentul țintă" și care va fi parte componentă a viitoarei revoluții din medicină, argumentează într-o revistă de specialitate vestită Francis Collins, președintele Institutului Național American de Cercetări al Genomului Uman (American National Human Genome Research Institute). Această ramură nouă a medicinei ne va permite nu numai să câștigăm timp și bani care adesea se pierd din cauza unui tratament inefficient, dar va minimaliza și efectele secundare ale medicamentelor. Datele farmacoepidemiologice indică fără echivoc efectele nedorite ale numeroaselor medicamente înregistrate. Rapoartele publicate în SUA arată că în această țară o persoană din patru moare din cauza efectelor dăunătoare ale medicamentelor. Date alarmante provin de exemplu din Franța, deoarece ele arată că fiecare al patrulea medicament permis spre comercializare este fie inefficient fie chiar periculos pentru sănătatea sau viața cuiva. Se crede de asemenea că farmacologia va putea înlesni controlul asupra procesului de elaborare a medicamentelor noi. Pentru elaborarea unui medicament nou

trebuie cunoscută structura 3D a proteinelor, enzimelor, acizilor nucleici și a receptorilor de la suprafața celulei. Companiile farmaceutice colectează deja mostre de ADN uman sperând ca în acest fel să poată crea un profil care să le permită clasificarea pacienților și să-i repartizeze apoi în categoria medicamentelor care îi vor ajuta sau îi vor afecta. Elaborarea unui medicament nou este un proces de durată, care începe cu studii de bază efectuate în laboratoare și teste multifazice efectuate în clinici, toate pentru evaluarea eficacității și inofensivității acestuia ca metodă potențială de tratare a unei anumite boli. Înaintea testării medicamentului pe oameni, siguranța acestuia este dovedită prin teste pe animale precum și culturi de celule. În unele cazuri, studiile clinice au dovedit rolul pozitiv al produselor colectate, prelucrate sau produse de albine în tratamentul anumitor boli.

Progresul constant făcut de studiile biomedicale, consecință a dezvoltării rapide a biologiei moleculare, aduce noi posibilități experimentale pentru acumularea de cunoștințe despre mecanismele prin care diferite substanțe chimice luate direct din natură influențează ca atare sau ca un sistem complex organismul uman. Acesta este cazul comunităților de insecte, în cadrul cărora excelează bineînțeles exemplul coloniilor de albine.

Propolisul este unul dintre materialele folosite de apiterapie, bineînțeles în afara mierii de albine. Proprietățile antibacteriene ale acestui produs biogenic sunt cunoscute de foarte mult timp. În prezent se crede că proprietățile bactericide ale propolisului sunt produsul efectului sinergic al flavonoidelor, acizilor aromatici și sesquiterpinei. Studii clinice au arătat efectele sale auxiliare în tratamentul oricărori tipuri de arsuri, escare, ulcere varicoase și eczeme. Rezultatele spectaculoase ale acestui produs în tratamentul numeroaselor boli au arătat că pe lângă proprietățile bactericide propolisul ajută și la regenerarea țesuturilor deteriorate. Studiile efectuate cu un model celular au demonstrat că extractul standard de propolis mărește activitatea prolifică a fibroblastelor. Iar studiile moleculare au relevat că propolisul este responsabil de activitatea crescută de transcriere a genelor care iau parte la procesul angiogenezei^[1]. Confruntarea studiilor clinice cu studiile de bază au permis explicarea mecanismelor activității sale la nivel celular și molecular. Cunoașterea mecanismelor celulare și moleculare ale fracțiunii active a produselor apicole în sistemul fiziologic și patologic va permite umplerea golurilor și va ajuta la folosirea acestora nu numai în prevenirea ci și în tratarea bolilor.

O serie de fapte sprijină idea că acizii grași cu lanț scurt (AGLS) elaborate în intestinul gros uman joacă roluri fiziologice numeroase și importante. Se crede că tulburarea metabolismului lor poate fi una dintre cauzele bolilor infecțioase ale intestinului gros. Din punct de vedere energetic, din toți acizii grași, cel mai dorit de membrana mucoasă este acidul butiric. S-a demonstrat că o reducere a concentrației sale în lumenul colonului, consecință a unui aflux scăzut de substrate care fermentează ușor, duce la atrofierea membranei mucoase ale acestei părți particulare a tractului digestiv. Suplimentarea butiratului regenerează membrana mucoasă, fapt demonstrat prin intensificarea creșterii epitelului ca și prin adâncirea pliurilor intestinale^[2]. Se presupune că butiratul ar putea fi un factor important de protecție împotriva cancerului de intestin gros, deoarece studiile *in vitro* au indicat o influență disciplinară a acestuia asupra celulelor canceroase^[3]. În acest moment, se caută sursele sale naturale. Atenția noastră se îndreaptă asupra păsturii deoarece bibliografiile mai recente^[4, 5] indică că 14% din conținutul lui este alcătuit din acizi organici. În cadrul Institutului nostru de biochimie (secția de biologie moleculară, biochimie și biofarmacie, Universitatea Sileziană de Medicină), am elaborat o metodă cantitativă de determinare a AGLS în păstură^[4, 5]. În păstura analizată, am găsit diferiți AGLS, inclusiv acidul butiric. Am constatat de asemenea că uscarea păsturii a avut un efect negativ asupra conținutului lor AGLS.

Se pare că un important pas înainte în studiul produselor apicole va fi făcut când va exista posibilitatea utilizării culturilor primare ca și a diferitelor tipuri de linii de celule care derivă din organismul uman în analiza influenței acestor preparate brute și standardizate asupra parametrilor morfologici și biochimici ai celulelor folosite la culturi. Este fără îndoială o alternativă bună la studiile pe animale, care oricum nu indică întotdeauna procesele care au loc în organele sau țesuturile umane.

În ultimii 20 de ani au fost dezvoltate noi tehnici de cultivare a celulelor și țesuturilor umane *in vitro*. Posibilitatea obținerii unei mase de cultură dintr-un fragment redus, progresul obținut în descoperirea biologiei numeroaselor tipuri de celule ca și a abilității de modificare a acțiunilor acestora în culturi a condus la creșterea interesului pentru folosirea practică a acestor rezultate nu numai în biologie dar și în medicină. S-a observat că celulele care derivă dintr-un țesut conjunctiv sănătos pot fi mai ușor crescute. Au fost elaborate metode de creștere de celule pe baza celor epiteliale, cum ar fi celulele keratinocite ale pielii, epiteliiile tractului urinar, ale prostatei, ale cavității orale, ale vaginului și ale corneii oculare. Epiderma este un țesut deosebit de bun pentru culturi deoarece peste 90% din ea se încadrează într-o categorie de celule – keranocitele. Keranocitele sunt, în condiții normale, stabile în culturi, nu-și pierd capacitatea de înmulțire și diferențiere. Motivul principal al eșecurilor cu grefe de epidermă este lipsa aderenței la rană, de ex. după arsuri, rezultat probabil din lipsa unei pielii potrivite pentru grefă. Această problemă a fost însă depășită prin elaborarea unui echivalent al pielii vii (EPV). S-a observat că pielea umană obținută din culturi are numeroase similarități cu pielea naturală în ce privește aspectul morfologic și vascular și deaceia este adecvată pentru diferite teste efectuate până în prezent doar pe animale. Datele experimentale au dovedit că expunerea a 2 cm² de EPV la factori chimici care provoacă iritații ale pielii sau corneei, provoacă aceleași reacții biologice ca și la pielea naturală și că sunt eliberați mediatori pro-inflamatori: prostaglandinele E2,

prostaciline, interleukine^[6, 7]. Este de asemenea foarte important că atunci când se folosește EPV pot fi testate substanțe solide, substanțe insolubile, lichide, emulsii și creme, aplicate local în zone expuse la aer. Se pot studia de asemenea mecanismele de aderare a microorganismelor care pot infecta pielea ca și efectele medicamentelor asupra acestor microorganisme. De asemenea pot fi testate pe EPV și medicamente noi, care conțin de exemplu produse apicole active din punct de vedere farmacologic.

În prezent este posibilă reconstruirea în condiții de laborator a altor modele de celule, care prezintă caracteristicile specifice ale organului de la care provin celulele. Astfel pot fi create venele și lobulele mici ale ficatului. Culturile organotipice sunt deosebit de interesante pentru studierea mecanismelor unor produse din nectar sau mană ce influențează pozitiv organismul uman.

Numeroși cercetători și doctori sunt de părere că imunoterapia, cea care are drept scop întărirea sistemului natural de apărare al organismului prin folosirea de imunomodulatori, va fi din ce în ce mai importantă. Actuala influență pozitivă a produselor apicole asupra sistemului imunitar nu mai poate fi pusă la îndoială. Se știe de multă vreme că propolisul mărește imunitatea organismului și că apitoxina stimulează puternic sistemul imunitar. Ce ne-a rămas este procedura studiilor experimentale și ale erorilor. Prin folosirea fitohemaglutininei ca factor mitogenic pot fi crescute limfocite. În acest scop sunt folosite două metode diferite – macrocultura și micrometoda. Macrocultura necesită colectarea a 5 – 10 ml de sânge și cultivarea de limfocite, izolate prin centrifugare sau prin sedimentare. Micrometoda constă din cultivarea unei cantități mici de celule în 0,3 – 0,5 ml de sânge. Dacă analizăm îndeaproape realizările științei biomedicale, atunci va deveni evidentă nevoia de cunoaștere a transcrierii umane. De aceea este necesară cunoașterea secvențelor transscrise de la mRNA la sADN și întocmirea unor date de bănci cADN. Acestea vor permite clonarea eficientă doar a unei regiuni din genă și nu a tuturor secvențelor genomice din jurul ei.

Metodele clasice dar și cele mai moderne ale biologiei moleculare permit constatarea (sesizarea) diferențelor în exprimarea genelor la nivelul transcrierii. Genele diferitelor exprimări au fost identificate până de curând doar cu ajutorul hibridizării diferențiale sau subtractive și prin separarea produselor lor proteice. De când putem folosi resursele bazelor de date despre acizii nucleici și secvențele proteice, numărul de gene, a căror exprimare o putem urmări, a depășit capacitatea analizelor tradiționale.

Una dintre abordarea modernă a diferitelor analize despre exprimarea genelor și care se bazează pe tehnica hibridizării este microprocesorul ADN. Tehnologia se rezumă la imobilizarea pe un substrat a unui purtător stabil a unui număr mare de particule de oligonuclee cu un lanț sau de ADN^[8, 9]. Aceste particule au rolul unor probe moleculare deși nu conțin markeri. Analizați și marcați sunt acizii deoxi și ribonucleic, care hibridizează cu ei. Datorită microaranjamentelor ADN s-a putut studia legarea ADN-ului și a proteinelor sau a altor legături. Tehnici sensibile de detectare fluorescentă permit identificarea exactă a fiecărei componente din amestecul studiat și evaluarea cantitativă a legării ei. Datele obținute sunt colectate și apoi prelucrate cu un software avansat. Această strategie face posibilă analizarea a mii de gene și evaluarea exprimării acestora într-un timp surprinzător de scurt în cadrul aceluiaș experiment. Microneturile ADN sunt din ce în ce mai des folosite în cadrul studierii sensibilității individuale la un medicament, a optimizării eficienței acestuia și în căutarea unor medicamente noi. Oricum, aceste microneturi sunt încă foarte costisitoare.

Oportunitățile adiționale scontate ale microprocesoarelor ADN reies din studiile despre interacțiunile dintre diferite substanțe și a compoziției lor naturale atât cu materialul genetic cât și cu reglatorii activității genelor în cadrul celulelor. De când s-a demonstrat că unele dintre produsele apicole folosite de mult timp au în cadrul chimioterapiei efecte sinergice, adăugarea lor la tratament ne permite folosirea unor doze mai mici a unor medicamente și lărgirea spectrului lor de activitate.

BIBLIOGRAFIE

- [1] Pytel A. (2001), Leczenie ran oparzeniowych Propolem-O, Praca doktorska, Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny
- [2] Dzierżewicz Z. et al. (1999), The role of butyric acid in growth, proliferation and differentiation of colonocytes. *Gastroenter. Pol.*, 6, 153-159
- [3] Dzierżewicz Z. et al. (2002), Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochem. Pol.*, 49, 211-220
- [4] Chodurek E. et al. (2002), Pyrolytic methylation in GC-MS analysis of short-chain fatty acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, (in press)
- [5] Gryczka-Suchy R. (2002), Profile krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w pierzgiach pszczołach. Praca magisterska, Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny
- [6] Marewicz E. (1994), Skin cultures for transplantology and biotechnology. *Post. Biol. Kom.*, 21, (supl.3), 73-87
- [7] Drukała J. (2001), Cell cocultures in skin reconstruction for clinical applications. *Post. biol. kom.* 28,(supl.16) 97-110
- [8] Mirowski M., Bartkowiak J. (2000), DNA microarrays in biomedical studies. *Post. biochem.*, 46, 272-281
- [9] Linkiewicz A., Filipecki M. (2001), From differential gene expression to cDNA clone - a review of methods for identification of genes with variable level of transcription. *Post. biochem.*, 47, 253-263