

ROMVAC - PESTE PATRU DECENII DE PERFORMANȚĂ ÎN MEDICINĂ

ROMVAC - FOUR DECADES OF PERFORMANCE IN MEDICINE

Constantin Chiurciu, General manager

Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

constantinchiurciu@gmail.com

Cuvinte cheie: ROMVAC, company, vaccinuri, medicamente

Key words: ROMVAC, company, vaccines, medicines

Rezumat

Romvac Company S.A. este cel mai mare producător local de vaccinuri și medicamente pentru păsări și animale. Compania a fost înființată în 1974 și a ajuns acum să dețină aproape 20% din piața locală a medicamentelor pentru animale estimată la circa 55 - 60 milioane de euro. Este una dintre puținele fabrici din România, privatizate prin metoda MEBO, care a reușit să crească fără probleme, într-o piață concurențială.

Abstractt

Romvac Company S.A. is the largest local manufacturer of vaccines and medicines for birds and animals. The company was established in 1974 and has now come to hold nearly 20% of the local livestock market estimated at around 55-60 million euros. It is one of the few factories in Romania privatized by the MEBO method, which managed to grow smoothly in a competitive market.

Romvac – Scurt istoric

Romvac Company S.A a apărut inițial în 1974, ca Laboratorul de Virusuri Tumorale Aviare (LVTA), în cadrul Centralei pentru producția avicolă. LVTA producea un singur vaccin, contra Bolii lui Marek, în premieră pe plan european, ajungând la o **producție anuală de 20 de milioane de doze**, în 1977.





Mai târziu, în 1981, LVTA se transformă în Centrul de Cercetări și Biopreparate pentru Păsări și Animale Mici (CCBPAM) care produce până în 1990, **peste 30 de produse biologice**, asigurând întreg necesarul de vaccinuri pentru marile avicole românești, precum și unele vaccinuri pentru vulpi, iepuri și câini.



Având două clădiri cu laboratoare de producție și cercetare, două pavilioane pentru experimente pe animale, două ferme de păsări SPF formate din opt pavilioane echipate cu izolatoare speciale și anexe tehnologice, acest centru medical veterinar a beneficiat de cea mai modernă dotare, fiind considerat până în 1985, **cea mai mare realizare în domeniu, pe plan mondial**.

În plus, la înființarea sa, au participat efectiv, prestigioși specialiști și instituții de talie internațională, precum: profesorul emerit Steve Hitchner, profesorul emerit Julius și profesorul emerit R. Colle; da la Houghton Poultry Research

Station, Huntington, Anglia; Universitatea Cornell Ithaca, New York, SUA.

În 1990, prin preluarea activului și pasivului CCBPAM, se înființează Societatea Comercială ROMVAC COMPANY S.A. - Voluntari, aflată la câteva minute de București.

Acum, Romvac **începe să producă vaccinuri și pentru bovine, ovine și suine**.

Dar, cea mai bună mișcare din istoria companiei, a fost decizia de a **produce și medicamente**, pe lângă **vaccinuri, seruri și reagenți pentru animale**.



Altfel, Romvac a rezistat pe piață ajungând cel mai mare producător din România, pe acest segment. **La ora actuală, producția de medicamente reprezintă 75 - 80% din cifra de afaceri a companiei**.

În 1995, Romvac este una dintre puținele fabrici din țară, **privatizate prin metoda MEBO**, care **a reușit să crească fără probleme, într-o piață concurențială**.

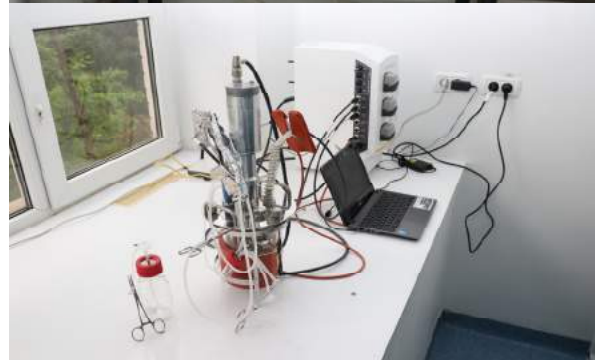
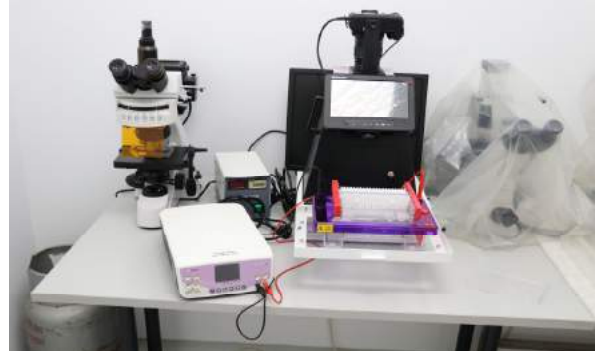


Romvac astăzi

Cu o cifră de afaceri de **12.000.000 de euro**, Romvac Company S.A. realizează peste **60 de produse biologice** (vaccinuri, substanțe revelatoare, kituri de diagnostic) și peste **200 de medicamente de uz veterinar**: tonice generale și rehidratante, premixuri vitamino-minerale, promotori de creștere și vitamine, antimicrobiene și antimicotice, medicamente antiparazitare, produse pentru dezinsecție, dezinsecție și deratizare, antiinfecțioase locale, cicatrizante și produse desensibilizante și antitoxice.



Romvac Company S.A. este cel mai mare producător local de vaccinuri și medicamente pentru animale, **deținând aproape 20% din piața locală a medicamentelor pentru animale**, estimată la circa 55 - 60 milioane de euro.



Compania este recunoscută pentru faptul că asigură **o gamă variată de produse în toate formele** (soluții, comprimate, pulberi, unguente etc.) și pentru toate speciile de animale crescute în România.

Produsele sunt realizate pe tehnologiile proprii, unele unicat, nefiind necesară achiziționarea know-how-ului.



Înțelegând perfect evoluția domeniului și a pieței, Romvac a investit mereu, atât în pregătirea profesională a angajaților, cât și în re tehnologizare, deținând, astfel, laboratoare

moderne de control al medicamentelor și vaccinurilor, dar și propriul **Laborator Sanitar - Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor (LSVSA)**. Acesta este autorizat sanitar - veterinar și posedă Certificatul de Acreditare **RENAR**. În cadrul acestuia, se pot efectua toate analizele necesare, se indică schema de tratament și se asigură produsele conforme.

Romvac a continuat activitatea de cercetare științifică și prin intermediul nou-înființatului **Compartiment de Biotehnologii**, în cadrul căruia au fost create două produse noi, respectiv **Bioenterom - probiotic preparat cu *Enterococcus faecium*** și **Rom-Agrobiofertil NP - îngrășământ biologic** pe bază de culturi bacteriene.



Romvac – Divizia de Medicină Umană

Romvac a continuat să facă cinste domeniului cercetării științifice, deoarece, în ultimii ani, a abordat cu rezultate excepționale, **cercetarea științifică fundamentală** care are ca scop completarea cu biopreparate specifice și suplimente alimentare, a mijloacelor utilizate **în medicina umană**.

În acest fel, în structura organizatorică a societății au luat ființă două noi subunități, respectiv **Compartimentul de Biotehnologii** și **Laborator de Cercetare - Dezvoltare în domeniul medicinei umane**.

Ținând cont de contextul global care prezintă o realitate foarte dură pentru sănătate prin rezistența bacteriilor la antibiotice, Romvac a lansat în anul 2014 și a dezvoltat considerabil, **Oul hiperimun PC2 și gama de produse Imunoinstant pentru uz uman**, pe bază de anticorpi (IgY) specifici.

Romvac produce la ora actuală, anticorpi naturali IgY utilizați ca adjuvant în tratarea specifică a infecțiilor date de 18 tulpini bacteriene rezistente la antibiotice, respectiv: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus grup B*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile* - corpi bacterieni, *Clostridium difficile* - anatoxina, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*.



Romvac deține din 2016, propriul **Cabinet de Medicină Complementară** și are astăzi, un număr de peste **4000 de pacienți** aflați sub tratament sau vindecați.

Terapia cu Imunoinstant facilitează vindecarea clinică rapidă, iar testările bacteriologice cu rezultat negativ confirmă eliminarea agentului patogen din organism.

În plus, cercetătorii de la Romvac au reușit să vindece infecții bacteriene vechi de ani de zile și chiar psoriazisul (forma clinică), contribuind considerabil, și la îmbunătățirea stării de sănătate a copiilor bolnavi de epidermoliză buloasă, fapt unic în lume la ora actuală.



Romvac și propria rețea de distribuție

Datorită rețelei proprii de distribuție create (**35 de depozite județene și 8 farmacii proprii**), compania este o societate reprezentativă a medicinei veterinare, asigurând desfacerea atât a

produselor sale, cât și a unei palete de 1200 de medicamente și produse de uz zootehnic, realizate de firme internaționale.

Certificări în domeniu

De-a lungul anilor, Compania Romvac a investit enorm în rețehnologizare, obținând **certificarea SMI** (Sistemul de Management Integrat), care cuprinde: Managementul Calității ISO 9001, Sistemul de Management al Mediului ISO 14001 și Sistemul de Sănătate și Securitate Ocupațională OHSAS 18001:2004.

În anul 2004, compania ROMVAC a primit din partea Autorității Naționale Sanitare Veterinare, confirmarea încadrării în normele de bună practică de fabricație (**GMP**), certificatele obținute fiind confirmate (reexamine) în ani următori.



Romvac Company S.A. este unitate **atestată** pentru **efectuarea activității de Cercetare – Dezvoltare în domeniul Medicinii Veterinare**, unitatea aflându-se în coordonarea științifică a Academiei de Științe Agricole și Silvicultură.

Romvac pe piața internațională

Obținerea tuturor certificărilor a facilitat pătrunderea și dezvoltarea companiei pe piața internațională, produsele Romvac ajungând acum, pe trei continente, în țări precum: Lituania, Nigeria, Albania, Kosovo, Malta, Macedonia,

Georgia, Kuwait, Moldova, Spania, Olanda, Irlanda, Ungaria, Irak, Iran, Italia și Qatar.

415 angajați

Dezvoltarea continuă a Romvac Company S.A. este asigurată și de colectiv, care în prezent numără 415 angajați.

Dintre aceștia, peste 100 sunt absolvenți de învățământ superior (medici veterinari, chimiști, biochimisti, biologi, ingineri chimiști etc.), iar mai mult de 100 sunt angajați de-ai societății, de mai bine de 35 de ani.

Romvac în proiecte și produse noi

Timpul a demonstrat până acum, că toate demersurile întreprinse de Romvac în medicina veterinară și mai nou, în cea umană, au fost extrem de inspirate, fiind rezultatul unor acțiuni inițiate în momentul potrivit și la locul potrivit.

Acesta este și motivul pentru care Romvac va își va continua activitatea de cercetare care vizează obținerea de noi produse medicinale, biopreparate, aditivi furajeri, alimentari, substanțe fitoterapeutice, dar și produse bio destinate agriculturii și zootehniei.

Laboratorul



sanitar - veterinar
și pentru
siguranța alimentelor
Romvac

Compania Romvac deține propriul
**Laborator Sanitar - Veterinar și pentru
Siguranța Alimentelor (LSVSA).**

LSVSA este autorizat sanitar - veterinar și
posedă **Certificatul de Acreditare RENAR.**

Aici:

- se pot efectua analizele necesare:
**antibiograme, analize bacteriologice,
micologice, parazitologice,
serologice, hematologice**
etc.
- se indică **schema de
tratament** și
- se asigură la cerere,
produsele conforme prin
depozitele și farmaciile
Romvac.

Tel.: 021 350 31 09,
interior 218 sau 259

Mobil:

Dr. Catalin Tudoran – 0723 610 322

Dr. Ion Iacob – 0767 53 81 86

Program de lucru: 08:00 – 14:00, de luni până vineri.



Romvac Company S.A.
șos. Centurii, nr. 7, Voluntari, jud. Ilfov
Tel.: 021 350 31 09, Fax: 021 350 31 10
romvac@romvac.ro, www.romvac.ro

▼ *Educatie continuă / Continuous education*

Elemente de chimioterapie si radioterapie la animale

Elements of chemotherapy and radiotherapy in animals

Romeo T. Cristina, Eugenia Dumitrescu*, Andreia B. Chirilă

Facultatea de Medicină Veterinară Timisoara

cris_tinab@yahoo.com

Cuvinte cheie: chimioterapie, radioterapie, animale

Key words: chemotherapy, radiotherapy, animals

Rezumat

Tratamentul cancerului este de obicei unul polimodal, care include: chirurgie, radioterapie, chimioterapie sau orice combinație a acestora. Pentru a alege o procedură terapeutică corectă, și potrivită fiecărui pacient, trebuie cunoscute următoarele: rezultatul examenului histologic, stadiul de malignitate, istoricul medical al pacientului și posibilitățile financiare ale proprietarului. În acest sens, se cere o bază de date minimă asupra stării de sănătate/boală a pacientului, ceea ce se obține prin examen de sânge (biochimia și hematologia) și examen de urină. Pentru stadializarea corespunzătoare și emiterea unui prognostic corect se vor efectua radiografiile (simple sau/și cu contrast), ecografiile sau examinările prin CT (computer tomograf). O dată pus diagnosticul este importantă definirea obiectivelor și așteptărilor de la tratamentul aplicat. Creșterea tumorală prezintă o fază de dezvoltare exponențială, iar apoi intră rapid într-o fază de platou. Răspunsul la chimioterapie depinde de punctul în care se află pe curba de dezvoltare (dacă sunt puține celule în diviziune atunci și fracțiunea distrusă de chimioterapie va fi mică). În concluzie, tumorile mici cu fracțiune de creștere mare sunt mai sensibile la chimioterapie pentru că au un număr mai mare de celule în faza proliferativă. În prezentul referat bibliografic sunt prezentate principalele elemente ale chimioterapiei și radioterapiei la animale.

Abstract

Cancer treatment is usually a polymorphic one, which includes: surgery, radiotherapy, chemotherapy or any combination of these. In order to choose a correct and appropriate therapeutic procedure for each patient, the following should be noted: the result of the histological examination, the malignancy status, the patient's medical history and the financial possibilities of the owner. In this regard, a minimum database on the health / illness of the patient is required, which is obtained by a blood test (biochemistry and hematology) and a urine test. For proper staging and correct prognosis, X-rays (simple or / and contrast), ultrasound or CT scan (CT) will be performed. Once the diagnosis is made, it is important to define the goals and expectations of the treatment applied. Tumor growth presents an exponential development phase, and then quickly enters a plateau phase. Response to chemotherapy depends on where it is on the development curve (if there are few cells in the division then the fraction destroyed by chemotherapeutics will be small). In conclusion, small tumors with high growth fraction are more sensitive to chemotherapeutics because they have a larger number of cells in the proliferative phase. In this bibliographic reference are presented the main elements of chemotherapy and radiotherapy in animals.

Introducere

Cel mai mare obiectiv al terapiei este acela de a prelungi viața pacientului, fără a afecta / compromite calitatea acesteia. La majoritatea pacienților din medicina veterinară,

obiectivul este de a ajunge la o remisie completă. Remisia completă se poate exprima prin dispariția tumorii și semnelor clinice, dar aceasta nu înseamnă că nu există celule canceroase în organism. Când pe lângă excizia chirurgicală se folosește și

chimioterapia, aceasta se recunoaște ca terapie adjuvantă pentru boala micrometastazică.

1. Elemente de chimioterapie la animale

Chimioterapia este folosită și pentru a micșora volumul tumoral pentru îmbunătățirea condițiilor de viață (terapie paleativă) sau înainte de excizia chirurgicală (terapie neoadjuvantă). Efectele secundare parțiale cele mai frecvent întâlnite sunt:

- acute (vomă și diaree);
- cumulative (supresia măduvei osoase);
- idiosincrazice, (cistita hemoragică la ciclofosamidă).

Chimioterapia se adresează în principal animalelor de companie și se administrează sistemic.

Ea este considerată a fi cea mai eficientă modalitate de terapie pentru unele neoplasme sensibile la acest tip de tratament (limfoame, leucemii), sau ca terapie adjuvantă după exciziile chirurgicale ale tumorilor cu indice metastazic crescut (osteosarcoame) și a micrometastazelor, pentru prevenirea recurențelor, pentru micșorarea tumorilor cu volum mare în scop paleativ sau înainte de extirparea chirurgicală și pentru sensibilizarea țesuturilor înainte de radioterapie.

Unele chimioterapice acționează sinergic cu radiațiile și îmbunătățesc distrugerea celulelor tumorale.

Administrarea lor se face sistemic, intravenos, dar se pot administra și intratumoral, intracavitar sau inhalator în neoplasme unde administrarea sistemică nu ar duce la concentrații destul de crescute pentru a avea un efect favorabil.

Raționamentul pentru care chimioterapicele se administrează intratumoral este de a obține o concentrație mai mare în țesutul tumoral și de a-l proteja pe cel sănătos.

Acest procedeu se utilizează frecvent în carcinom scvamocelular și în cazul melanoamelor bucale și epulidelor acantomatoase la animalele de companie.

Ca medicație se utilizează în special:

- cisplatinul,
- carboplatinul,
- 5-fluorouracilul,
- metotrexatul și
- carmustinul.

Alegerea agentului chimioterapic se face în funcție de specie, tipul de cancer, disponibilitate și eventual experiența medicului veterinar, având în vedere că pentru medicamentele mai des folosite se cunosc dozele exacte și intervalele de administrare.

Intervalele de administrare trebuie astfel stabilite încât să nu fie prea apropiate pentru că induc toxicitate, dar nici prea îndepărtate pentru că apare rezistența și repopularea cu celule tumorale.

Acestea au enzime reparatoare mai puțin eficiente decât cele ale celulelor normale, deci tratamentele se programează astfel încât celulele sănătoase să aibă timp să își revină, dar cele tumorale nu, și pe lângă acest aspect trebuie urmărită și starea de sănătate a pacientului, respectiv dacă este foarte alterată se întârzie tratamentul.

Obiectivul oncologilor veterinari care utilizează chimioterapia este de a controla cancerul și de a prelungi durata de supraviețuire și în același timp de a menține o calitate corespunzătoare a vieții pacientului.

În tabelul 1. sunt prezentate câteva Asocierile medicamentoase asigură protocoale terapeutice pentru sarcoame și distrugerea crescută a celulelor tumorale, carcinoame ale sistemului tegumentar. limitând toxicitatea individuală a Tumorile sistemului tegumentar sunt mai ușor medicamentelor. tratabile prin chirurgie sau radioterapie.

Tabelul 1.

Protocoale terapeutice în sarcoamele și carcinoamele sistemului tegumentar
(după Villalobos, 2007).

Sarcom - câine	1. Sarcomul celulelor fusiforme	<i>Doxorubicină</i> 30 mg/m ² , i.v., la 3 săptămâni <i>Dacarbazine</i> 1000 mg/m ² , i.v. perfuzie timp de 6-8h, repetată la 3 săptămâni <i>Sulfa + trimetoprim</i> 15 mg/kg, p.o., 2x1/zi
	2. Alte sarcoame (ciclu terapeutic: 21 zile)	<i>Doxorubicină</i> 30 mg/m ² , i.v., ziua 1 <i>Vincristina</i> 0.75 mg/m ² , iv., în zilele 8, 15 <i>Ciclofosfamidă</i> 200-300 mg/m ² , p.o., ziua 10 <i>Sulfa + trimetoprim</i> 15 mg/kg p.o., 2x1/zi
Sarcom - pisică	1. <i>Carboplatin</i> 300 mg/m ² , i.v., la 3-4 săptămâni	
	2. Ciclu terapeutic 21 de zile	<i>Doxorubicină</i> 1mg/kg, i.v., ziua 1 <i>Ciclofosfamidă</i> 100-150 mg/m ² în ziua 10 și 11 <i>Doxorubicină</i> 1mg/kg, i.v., ziua 1
	3. Ciclu terapeutic 28 de zile	<i>Vincristina</i> 0.5-0.75 mg/m ² , i.v., ziua 8, 15, 22 <i>Ciclofosfamidă</i> 100-150 mg/m ² în ziua 10 și 11
	4. Ciclu terapeutic 21 de zile	<i>Mitoxantron</i> 4-6 mg/m ² , i.v. perfuzie în 4 h, ziua 1 <i>Ciclofosfamidă</i> 200-300 mg/m ² , p.o., în ziua 10
	5. Ciclu terapeutic 21 de zile	<i>Mitoxantron</i> 4-6 mg/m ² , i.v. perfuzie în 4 h, ziua 1 <i>Vincristină</i> 0.5-0.6 mg/m ² , i.v. în ziua 8 și 15 <i>Ciclofosfamidă</i> 200-300 mg/m ² , p.o., în ziua 10
Carcinom - câine	1. <i>Carboplatin</i> 300 mg/m ² , i.v., la 3-4 săptămâni	
	2. <i>5-fluorouracil</i> 150 mg/m ² , i.v., săptămânal <i>Ciclofosfamidă</i> 50 mg/m ² , p.o., 4 zile pe săptămână sau o dată la două zile <i>Metotrexat</i> 2.5 mg/m ² , p.o., de 2 sau 3 ori pe săptămână	
	3. <i>Doxorubicină</i> 30 mg/m ² , i.v., ziua 1 <i>5-fluorouracil</i> 150 mg/m ² , i.v., ziua 8 și 15 <i>Ciclofosfamidă</i> 200-300 mg/m ² , p.o., ziua 10 <i>Sulfa-trimetoprim</i> 15 mg/kg, p.o., 2x1/zi, pe toată durata tratamentului	
	4. <i>Cisplatin</i> 60-70 mg/m ² , i.v. în perfuzie, la 3 săptămâni, înainte de administrare diureză intensă	
	5. <i>Vincristină</i> 0.75 mg/m ² , i.v., ziua 8, 15 <i>Doxorubicină</i> 30 mg/m ² , i.v., ziua 1 <i>5-fluorouracil</i> 150 mg/m ² ziua 1, 8 și 15	
	6. <i>Doxorubicină</i> 30 mg/m ² , i.v., ziua 1 <i>Vincristina</i> 0.75 mg/m ² , iv., în zilele 8, 15 <i>Ciclofosfamidă</i> 200-300 mg/m ² , p.o., ziua 10 <i>Sulfa-trimetoprim</i> 15 mg/kg p.o., 2x1/zi, pe toată durata tratamentului	
	7. <i>5-fluorouracil</i> 150 mg/m ² , i.v., o dată pe săptămână <i>Ciclofosfamidă</i> 50 mg/m ² , p.o., 4 zile pe săptămână, sau o dată la două zile	
Carcinom - pisică	1. <i>Carboplatin</i> 200-240 mg/m ² , i.v., la 3-4 săptămâni	
	2. Ciclu terapeutic de 28 de zile	<i>Doxorubicina</i> 1 mg/kg, i.v. ziua 1 <i>Ciclofosfamidă</i> 100-150 mg/m ² în ziua 10 și 11 <i>Doxorubicină</i> 1 mg/kg, i.v., ziua 1
	3. Ciclu terapeutic de 28 zile	<i>Vincristina</i> 0.5-0.75 mg/m ² , i.v., ziua 8, 15 și 22 <i>Ciclofosfamidă</i> 100-150 mg/m ² în ziua 10 și 11
	4. <i>Vincristină</i> 0.5 mg/m ² , i.v., o dată pe săptămână <i>Ciclofosfamidă</i> 50 mg/m ² , p.o., 4 zile pe săptămână sau o dată la două zile	
	5. Ciclu terapeutic 21 de zile	<i>Mitoxantron</i> 4-6 mg/m ² , i.v., perfuzie în 4 h, în ziua 1 <i>Ciclofosfamidă</i> 200-300 mg/m ² , p.o., în ziua 10
	6. Ciclu terapeutic de 21 zile	<i>Mitoxantron</i> 4-6 mg/m ² , i.v., perfuzie în 4 h, în ziua 1 <i>Ciclofosfamidă</i> 200-300 mg/m ² , p.o., în ziua 10 <i>Vincristina</i> 0.5-0.6 mg/m ² , i.v., în ziua 8 și 15
! 5-fluorouracilul este toxic pentru pisici, dă semne nervoase grave, adesea fatale. Cisplatinul este de asemenea toxic, dă toxicitate pulmonară acută la pisici		

Utilizarea combinată a medicamentelor, care au mecanisme diferite de acțiune, ajută la reducerea dezvoltării rezistenței în populațiile heterogene de celule tumorale.

Cele mai bune șanse în tratarea cancerului sunt reprezentate de efectuarea unei chimioterapii combinate, prin administrarea chimioterapicelor la dozele cele mai apropiate de cele toxice, dar care să nu aibă efecte toxice care se suprapun și, ideal, ar fi ca, în mod singular, să aibă acțiune asupra tumorii.

Aceste combinații au ca obiective creșterea numărului de celule distruse și menținerea toxicității la nivele acceptabile, lărgirea spectrului de acțiune asupra populațiilor celulare heterogene sau rezistente din tumori și prevenirea sau încetinirea apariției rezistenței. Selecția agenților chimioterapici se face pe baza eficacității dovedite asupra anumitor tumori și posibilitatea de a fi administrate la intervale consecutive, intervalul fiind cel mai scurt posibil necesar recuperării celor mai sensibile țesuturi din organism (măduva osoasă).

1.1. Principii farmacologice în chimioterapie

Farmacocinetica agenților chimioterapici este importantă deoarece arată distribuirea medicamentului și a metaboliților săi prin organism și biodisponibilitatea lui de a distruge celulele canceroase, deci efectul terapeutic.

Prin administrare intravenoasă se presupune biodisponibilitate 100%, dar pentru alte tipuri de administrări (per os, intramuscular sau subcutanat) aceasta poate fi parțială.

Dintre factorii care afectează biodisponibilitatea se pot menționa

vascularizația organelor țintă, difuzia substanței active din patul vascular, legarea lor la proteine și liposolubilitatea, interacțiunea cu alte substanțe medicamentoase, produse din plante, diferențele genetice între rase și indivizi (gena MDR la Collie).

Eficacitatea terapeutică este bazată pe administrarea dozei maxime de medicament care să cauzeze toxicitate minimă.

Pentru majoritatea chimioterapicelor limita dintre terapeutic și toxic este foarte mică.

Dozele se calculează în mg/m² sau în mg/kgc, dar s-a observat că la câinii de talie mică și la pisici calcularea dozei după suprafața corporală produce adesea toxicitate, mai ales în cazul doxorubicinei, cisplatinului și a carboplatinului. Astfel la câinii sub 15 kg și la pisici se recomandă utilizarea calculării dozei în funcție de greutatea corporală (mg/kgc).

Ciclul celular

Fazele ciclului celular sunt:

- F = 1 (sinteza ARN -ului și a proteinelor),
- F = 2 (sinteza ADN-ului),
- F = 3 (o a doua perioadă de sinteză a ARN-ului și a proteinelor).
- F = 4 (mitoza) și

Celulele în repaus sunt în faza G₀. Ciclul celular prezintă importanță deoarece chimioterapicele afectează o anumită fază a acestuia, de exemplu alcaloizii tip *vinca* (vincristina, vinblastina) afectează faza de mitoză (M), sau pot acționa în orice fază a acestuia, exemplu agenții *alchilanți*.

Toxicitatea

Ținta agenților chimioterapici sunt celulele cu diviziune rapidă, cum sunt și celulele neoplazice, dar vulnerabile sunt și celulele

normale cu diviziune rapidă, cum sunt cele din măduva osoasă sau tractul gastrointestinal. Majoritatea protocoalelor terapeutice oncologice sunt bine tolerate de animalele de companie. Cele mai frecvente **efecte secundare** sunt:

Hematologice

Celulele măduvei osoase sunt sensibile la acțiunea distructivă a chimioterapicelor, deoarece prezintă rată mare de diviziune.

În majoritatea cazurilor, neutrofilele circulante sunt afectate primele, iar mai apoi trombocitele. La pacienții supuși terapilor îndelungate cu aceste substanțe poate apărea anemia ușoară.

Neutropenia este frecventă și este un factor limitant al dozei de chimioterapic. Valoarea minimă a neutropeniei apare după 7-10 zile și revine la limitele fiziologice, de obicei, după 4-5 zile de la întreruperea tratamentului.

De aici, importanța examenului hematologic, mai ales al numărului total de leucocite.

La pacienții cu neutropenie gravă (sub $3.0 \times 10^9/l$) se impune întârzierea următoarei ture de tratament, și repetarea examenului hematologic, până când valorile sunt acceptabile.

Dacă valorile sunt puțin scăzute și pacientul nu prezintă semne clinice de boală, nu are febră, nu este necesară întârzierea următoarei doze de chimioterapic, dar tratamentul va fi făcut sub monitorizare atentă.

Pacienții cu număr total de leucocite scăzut, care prezintă și modificări clinice, febră, necesită administrarea de antibiotice.

La cazurile grave, cu număr leucocitar sub $1,5 \times 10^9/l$ se impune spitalizarea și aplicarea

unui tratament de susținere și antibioticoterapie i.v., plus se poate administra factorul de creștere a coloniilor de granulocite 1-2 doze s.c. de 2,5-10 $\mu m/kgc$.

Pe lângă acestea se recomandă reducerea dozei de chimioterapic cu 10-20% și, dacă nici acest lucru nu are efect, se schimbă medicația.

Digestive

Voma. Este un efect secundar comun care se datorează acțiunii directe al agentului chemoterapeutic asupra centrului vomei din bulb, sau prin acțiunea iritantă asupra tractului gastrointestinal.

Voma apare acut la maxim 8h de la administrarea medicației antitumorale (stimularea directă a centrului vomei), sau cel mai frecvent după 2-5 zile.

Centrul vomei este responsabil pentru mecanismul motor al emezei și primește informații de la receptorii specifici agenților chemoterapeutici, vestibul și tractul gastrointestinal.

Receptorii sunt reprezentați de H_1 pentru histamină și $5-HT_3$ pentru 5-hidroxitriptamină, și se găsesc atât în centrul vomei, cât și în tractul gastrointestinal.

De cele mai multe ori (în urma administrării chemoterapeuticelor) voma este autolimitantă, iar la pacienții la care nu cedează se recomandă antiemetice (**Tablelul 2.**) și tratament de susținere, deoarece produce deshidratare gravă, deficiențe nutriționale, eventual amânarea următoarei doze de medicament.

Se mai poate administra profilactic, cu 3-5 zile înainte, un antiemetic, metoclopramid, sau se va recurge la reducerea dozei de chemoterapeutic.

Tabelul 2.

Antiemetice folosite în medicina veterinară
(după North și Banks, 2009)

Medicamentul	Locul acțiunii	Indicații	Doza
Metoclopramid	Acționează central asupra centrului văomei, la doze mari are activitate anti-dopaminergică și antiserotoninergică. Crește tonusul sfincterului esofagian și relaxează pilorul. Este contraindicat la pacienții cu obstrucție intestinală	Este cel mai des utilizat în cazul vomitării ușoare spre moderate	0.2-0.4 mg/kg, p.o. 3x1/zi sau 4x1/zi 1-2 mg/kg/zi în perfuzie cu ritm constant
Citrat de maropitant (Cerenia)	Blochează receptorii NK-1 din centrul văomei	O medicație nouă atât pentru voma de natură centrală, cât și pentru cea periferică	Injectabil 1mg/kg s.c. 1x1/zi Tablete: 2 mg./ kg 1x1/zi Se pot utiliza ambele formulări pentru maximum 5 zile
Fenotiazine ex. clorpromazina	Antagonist central de dopamină	Are efect în noseea ușoară	0.5 mg/kg i.m. sau s.c. 3x1/zi sau 4x1/zi
Butorfanol	Agonist/antagonist opioid, are efect asupra centrului văomei din bulb	Se utilizează în principal înainte de terapia cu cisplatin	0.2-0.6 mg/kg s.c., i.m.
Antagoniști de serotonină (ondansetron)	Inhibă receptorul 5-hidroxitriptamină din centrul văomei	Indicat la pacienții cu vomă severă	0.1-0.5 mg/kg i.v., p.o., 2x1/zi Oral se poate administra până la 1 mg/kg

Diareea este un efect secundar des întâlnit, și este și ea de obicei autolimitantă. Dar în cazul tratamentelor cu doxorubicină diareea poate fi severă, necesitând spitalizare și tratament de susținere. Se recomandă dietă până la oprirea diareei și amânarea următorului ciclu de tratament până la vindecarea clinică și reducerea dozei.

Dermatologice

a. Alopecia, în cazul medicinei veterinare, este dependentă de rasă și apare de cele mai multe ori la rasele la care părul crește continuu - Caniche, Bichon, Old English Sheepdog, terieri, Lhasa Apso, ShiTzu. Localizarea este cu predilecție pe cap, inclusiv pierderea mustăților (pisici), iar la câinii cu păr mai lung, pe picioare (Golden Retriever, Setteri, Cockeri etc.) se pierde părul mai lung, fără alte zone specifice. Părul de pe zonele tunse sau rase poate crește mai lent la loc, poate avea culoare sau textură diferită. Medicația care dă cel

mai adesea acest efect secundar este doxorubicina și ciclofosfamida.

b. Reacțiile alergice idiosincrazice pot apărea la oricare agent chimioterapic, dar cel mai frecvent la L-asparaginază (în caz de tratamente repetate) și doxorubicină. Semnele clinice care apar sunt tremurul capului, urticaria, eritemul, neliniștea, vomitarea, edemul și, în caz de reacții severe, hipotensiunea, care duce la colaps și moarte, motiv pentru care se recomandă administrarea preventivă înainte de tratament a clorfeniraminei. **Dacă apar reacții alergice se sistează tratamentul și se administrează: difenhidramină - 0.2-0.5 mg/kg i.v. lent, clorfeniramină - 2.5-10 mg i.m., dexametazonă - 0.5-2 mg/kg i.v., fluidoterapie i.v. și adrenalină (epinefrină).**

c. Extravazarea. Majoritatea chimioterapicelor se administrează intravenos printr-un cateter introdus în condiții aseptice. Este necesară plasarea strict intravenoasă și verificarea plasării corecte prin irigarea cu

soluție salină înainte de administrarea medicației antitumorale. Majoritatea chimioterapicelor provoacă distrugerii semnificative dacă sunt administrate perivenos sau dacă extravazează, cea mai periculoasă fiind doxorubicina.

Reacțiile nefrotoxice

Cel mai frecvent asociat cu nefrotoxicitatea este cisplatinul, dar utilizarea lui s-a redus datorită apariției carboplatinului. La pacienții tratați cu cisplatin se induce diureză cu soluție salină înainte de începerea tratamentului, deoarece în medii cu concentrații crescute de ioni de clor se reduce toxicitatea cisplatinului.

Pe lângă diureză, North și Banks, recomandă administrarea **dexametazonei în doză de 0.025 mg/kg i.v., butorfanolului 0.1 mg/kg i.v. și a clorpromazinei 0.5 mg/kg i.m., iar imediat după administrarea cisplatinului se administrează manitol 0.5 g/kg i.v. și continuarea diurezei cu soluție salină timp de 6-8h.**

După și înainte de fiecare ciclu de tratament se recomandă examenul urinei și a parametrilor renali.

Cisplatinul este fatal pentru pisici, iar doxorubicina este toxică și ar trebui administrată cu precauție la pisicile cu disfuncții renale.

Cistita hemoragică sterilă este un potențial efect secundar al ciclofosfamidei și al ifosfamidei, de aceea se recomandă administrarea concomitentă a 2-mercapto-etansulfonatului.

Majoritatea cazurilor apar după o utilizare îndelungată a acestor medicații.

Ca patogeneză, cistita rezultă în urma

iritației mucoasei vezicii urinare de către metabolitul acroleină.

Semnele clinice se traduc prin hematurie uneori severă, polakisurie și strangurie.

Se recomandă efectuarea uroculturii pentru a exclude infecțiile urinare.

Dacă apare acest efect secundar tratamentul va fi întrerupt și se administrează anti-inflamatoare.

De obicei, răspunsul la oprirea tratamentului este bun, dar remiterea totală a semnelor clinice se realizează în mai multe săptămâni.

Folosirea ulterioară a ciclofosfamidei este contraindicată și se va substitui cu un alt agent alchilant, de exemplu clorambucil.

Pentru prevenirea apariției cistitei hemoragice sterile se va administra furosemid și apă la discreție pentru a favoriza eliminarea acroleinei

Neurotoxice

Apar rar în medicina veterinară, cel mai adesea în urma administrării vincristinei, cisplatinului și 5-fluorouracilului.

În cazul cisplatinului s-au semnalat apariția convulsilor și a unor cazuri de orbire.

Vincristina poate cauza neuropatie periferică, greu detectabilă cu slăbirea membrelor pelvine, alergarea / mușcarea cozii sau un comportament anormal care nu poate fi altfel explicat, în acest caz se recomandă întreruperea tratamentului și substituirea cu vinblastină.

Pe lângă aceste efecte secundare, vincristina mai poate provoca ileus paralic, care se manifestă prin anorexie, dureri abdominale, constipație și vomă, uneori se pot recupera în **24-48 de ore.**

Se impune fluidoterapia și managementul durerii.

Efectul vincristinei poate fi cumulativ, se reduce doza, iar dacă semnele clinice nu se îmbunătățesc se întrerupe tratamentul. 5-fluorouracilul este contraindicat la pisici deoarece dă semne clinice neurologice uneori fatale, iar la câine semnele neurologice sunt mai puțin severe.

Carcinogeneze

Medicația citostatică pe lângă beneficiile pe care le are, poate avea și efect carcinogenic, putând induce cancer secundar.

Acest aspect este mai frecvent observat la agenții alchilanți, cum ar fi ciclofosfamida.

În medicina veterinară carcinogeneza secundară apare mai rar, poate datorită faptului că majoritatea pacienților oncologici sunt reprezentați de animale cu vârstă înaintată.

La animalele tinere, la care se așteaptă să aibe o durată de viață relativ normală, posibilitatea apariției unor tumori secundare, fără legătură cu problema inițială, nu trebuie neglijată. Ca exemplu se pot aminti carcinoamele celulelor de tranziție în urma tratamentului îndelungat cu ciclofosfamide.

Hepatotoxice. Sunt cel mai frecvent asociate cu tratamentul cu lomustin.

Pacienților care urmează acest tratament le trebuie monitorizată frecvent funcția hepatică, iar dacă apar modificări, tratamentul trebuie întrerupt.

Cardiotoxice. Sunt asociate frecvent cu doxorubicina, mai ales la câine. Se datorează unui efect cumulativ care poate duce la

cardiomiopatie dilatativă, rezultatul final fiind insuficiența cardiacă congestivă.

Efectele toxicității acute asupra cordului sunt aritmiile, de obicei trecătoare.

Toxicitatea este dată de acțiunea radicalilor liberi asupra miocardului, deoarece acesta dispune de un nivel limitat de enzime protectoare, deci este expus deteriorării oxidative.

Câinii par a fi mai sensibili, în această situație doza cumulativă nu ar trebui să depășească 220-240 mg/m².

O dată apărute semnele cardiotoxicității acestea sunt ireversibile.

Pacienților cu antecedente cardiace și raselor predispușe la cardiopatii dilatative se recomandă efectuarea unui ECG înainte de începerea tratamentului și a fiecărui ciclu de tratament.

Pacienților cu probleme cardiace li se va substitui tratamentul cu mitoxantron.

1.2. Evaluarea eficacității chimioterapiei

Remisia completă (totală) reprezintă dispariția totală a unei tumori (remisie clinică) sau a celulelor canceroase (remisie moleculară) și a simptomelor după administrarea chimioterapiei și este obiectivul tratării tumorilor vizibile.

Cel mai important indicator al răspunsului complet este rata de supraviețuire fără recidivă după terminarea tratamentului.

Răspunsului parțial totalizează reducerea de minim 50% a volumului tumoral și de peste 30% a diametrului, la unii pacienți acesta este de ajuns pentru îmbunătățirea calității vieții.

Se măsoară cele mai lungi diametre ale leziunii tumorale la patru săptămâni după

tratament și se vede diferența. Se consideră **răspuns favorabil** dacă diferența depășește 30% de la începutul tratamentului.

În cazul în care boala devine stabilă și nu există o reducere măsurabilă a volumului tumoral, estimarea eficacității tratamentului este dificilă.

În acest caz dacă nu există un răspuns parțial, după patru săptămâni de la începerea tratamentului se consideră că evoluția este rezistentă la terapie.

Nu se consideră eficient tratamentul până când mai mult de jumătate din pacienți au prezentat remisie completă.

1.3. Mecanismele rezistenței

Chiar dacă obiectivul este tratarea afecțiunii, realitatea poate fi foarte diferită datorită rezistențelor care apar.

Celulele cu diviziune rapidă au de obicei un răspuns rapid la chimioterapice, dar dezvoltă la fel de repede rezistență.

În cazul tumorilor cu volum mare doar 5% din celule sunt susceptibile la acțiunea chimioterapicelor, iar cele aflate în faza G₀, adică în repaus, care contribuie la volumul tumoral sunt, de obicei, rezistente la acțiunea chimioterapicelor.

Dezvoltarea rezistenței ține de mai mulți factori, de aceea un protocol terapeutic corect ar trebui să fie compus din chimioterapice cu mecanisme de acțiune diferite, altfel rezistența va duce la eșecul tratamentului.

Cauzele intrinseci sunt reprezentate de **tipul tumorii**, unele având de la început un răspuns slab la agentul chimioterapic, deci nu sunt tratabile cu acest tip de terapie.

În medicina veterinară, în această categorie intră melanoamele, sarcoamele țesuturilor moi și carcinoamele gastrice.

În cazul rezistenței dobândite, răspunsul inițial la tratament este bun, dar în cele din urmă se observă o recidivă, ceea ce duce la necesitatea schimbării protocolului terapeutic.

Rezistența anatomică, de exemplu bariera hemato-encefalică, împiedică distribuția medicamentului și, implicit, duce la eșecul tratamentului, chiar dacă în mod normal tumora ar fi sensibilă la acțiunea chimioterapicului.

Un număr de pompe de eflux legate la membrana celulară influențează distribuția substanțelor citotoxice.

O formă comună de rezistență dobândită se datorează **glicoproteinei P (P-170)** care este cea mai bine cunoscută și este codificată de gena **MDR-1 (Multidrug Resistance)**.

Funcția naturală a glicoproteinei P este de a proteja organismul contra agenților xenobiotici și se găsește distribuită în tractul gastrointestinal, hepatocite, canalul biliar și tubulii renali.

Creșterea producției de glicoproteină P favorizează efluxul citotoxicelor derivate din produse naturale, cum ar fi alcaloizii vinca, antraciclinele și actinomicina D.

Gena MDR-1 a fost legată de toxicitatea crescută a unor chimioterapice la rasa Collie.

La animalele testate pozitiv pentru gena MDR-1 se observă toxicitate gastrointestinală crescută la citostaticele amintite.

Mutațiile **genei p53** sunt alte mecanisme prin care apare rezistența. Deci se poate spune că mecanismul instalării rezistenței este multifactorial.

Regimul metronomic folosește agenți chimioterapici standard la doze mai mici într-un program continuu, fără pauze, în loc de administrări de doze mari la intervale mari.

Scopul acestui mod de administrare este de a afecta pe lângă celulele tumorale și vasele sanguine tumorale, care sunt într-o continuă dezvoltare, deci sunt sensibile la acțiunea citotoxicelor, iar celulele endoteliale vasculare normale sunt stabile genetic, nu prezintă defecte caracteristice celor tumorale.

Efectul acestui tip de tratament este mai mult stabilizator decât curativ.

În timp s-au dezvoltat agenți anti-angiogeneză: **inhibitori de metalproteinază matriceală, agenți care au ca țintă factorii pro-angiogenetici (factorii de creștere vasculară endotelială și factorul de creștere a fibroblastelor bazale) și agenți care inhibă celulele endoteliale (angiostatin).**

Acest tip de tratament este considerat unul citostatic, deci reducerea completă s-ar putea să nu fie obiectivul acestuia, iar terapia se menține pe un timp îndelungat.

Tirozinkinazele sunt enzime importante în comunicarea celulară, iar atunci când acționează sub influența mutațiilor oncogenice duc la creșterea celulară anormală, deci la formarea unui neoplasm.

Ele inhibă reacția dintre ATP și proteinele din substrat prevenind fosforilarea substratului și rezultă de aici inhibarea transmiterii semnalelor în aval.

Imatinib mezilatul este un inhibitor de tirozinkinază care acționează asupra unor gene responsabile de producerea unor neoplasme, cum ar fi leucemia mielogenă cronică.

Acest inhibitor a avut un răspuns favorabil și în tumorile de la locul de injectare al vaccinului la pisici și în tumorile mastocitare la câine.

Lipozomii sunt particule coloidale care se auto-asamblează, și sunt formate dintr-un strat lipidic dublu care încapsulează o fracțiune din mediul lichid înconjurător.

Se găsesc sub formă de lipozomi convenționali, lipozomi polimorfici sau cationici și lipozomi non-reactivi sau pegilați.

Lipozomii non-reactivi sunt formați dintr-un strat bilipidic care conține glicolipide sau polietilen glicol.

Agenții chimioterapici încapsulați au timp de înjumătățire crescut și traversează mai ușor vasele sanguine tumorale.

Doxorubicina pegilată încapsulată în liposomi (Doxil) are timp de înjumătățire plasmatic mai mare, clearance plasmatic mai mic și volum de distribuire mai mic față de doxorubicina clasică.

Prin folosirea formei încapsulate se va îmbunătăți acumularea lui în țesuturi și se reduce toxicitatea cardiacă, dar poate produce hipotensiune.

A fost utilizat cu succes în tumori la câine, incluzând hemangiosarcomul, limfomul cutanat prin administrări intravenoase și intraperitoneale. Se administrează în doză de 1 mg/kg intravenos, la trei săptămâni.

În **tabelul 3.** sunt prezentați câțiva agenți chimioterapici, mecanismul lor de acțiune, precauțiile, indicațiile, precum și dozele acestora.

Tabelul 3.

Principali agenți chimioterapici utilizați în medicina veterinară

(sinteză după Chun, Gustafson, North și Banks și Villalobos)

Agentul chimioterapic	Mecanism de acțiune	Metabolizare	Toxicitate	Precauții	Doze	Indicații
Ciclofosfamida	Alchilarea ADN-ului	Hidrolizare microzomală în ficat la forma activă, hidroliză la acroleină, excreție ca produs inactiv prin urină	Mielosupresie, cistită hemoragică sterilă, alopecie	Tabletele nu se divizează, manevrarea corespunzătoare a pudrei liofilizate	Câini: 200-250 (300) mg/m ² Pisici: 10 mg/kg	Limfom, leucemie, mielom multiplu, plasmocitom, carcinoame și sarcoame
Clorambucil	Alchilarea ADN-ului	Descompunerea chimică în produși activi și eliminarea sub formă inactivă prin urină și fecale	Mielosupresie cu afectarea trombocitelor nosee, vomă	Tabletele nu se divizează	Câini: 0.1-0.2 mg/kg 1x1/ zi Pisici: 2 mg, 1x2/zi	Leucemie limfocitară cronică, limfom, mielom multiplu
Melfalan	Alchilarea ADN-ului	Se hidrolizează rapid în plasmă și se elimină prin urină și fecale	Mielosupresie cu nadir întârziat 4-6 săptămâni	Tabletele nu se divizează	Câini: 0,1 mg/kg zilnic pentru 10 zile, apoi 0,05 mg/kg zilnic 1x2/zi	Mielom multiplu, limfom
Ifosfamid	Alchilarea ADN-ului, izomer al ciclofosfamidei	Excretat prin tractul urinar	Mielosupresie, cistită hemoragică severă, uroprotecție cu 2-mercapto-etansulfonat (MESNA)	La fel ca ceilalți agenți alchilanți	Câini: 350-375 mg/m ² , i.v. la 3 săptămâni	Sarcom, hemangiosarcom cutanat și leiomiomasarcom
Lomustin (CCNU)	Nitrozourea alchilează ADN-ul și ARN-ul, nu produce rezistență încrucișată cu alți agenți alchilanți	Metabolizat în ficat, metabolii sunt excretați prin urină	Mielosupresie severă la doze mari, toxic renal și hepatic	Se recomandă reducerea dozelor la pacienții cu probleme hepatice și renale	Câine: 60-90 mg/m ² , p.o., o dată la 3 săptămâni Pisică: 50-60 mg/kg, p.o., la 3 săptămâni	Limfom, mastocitom, sarcoame histiocitare în combinație cu radioterapia și în gliom
Carmustin (BCNU)	Nitrozourea, alchilează ADN-ul ca Lomustinul	Liposolubilitate crescută, după administrarea i.v. se obțin concentrații bune în LCR, excreția se realizează prin urină	Mielosupresie severă, nosee, vomă, pneumonie interstițială	La oameni se asociază cu fibroza pulmonară	Câini: 50 mg/m ² i.v. o dată la 6 săptămâni	Se utilizează rar în MV, traversează bariera hemato-encefalică
Busulphan	Agent alchilant	Metabolizat în mai multe produse excrete prin urină	Mielosupresie și trombocitopenie prelungită	Tabletele nu se divid	Câine: 2mg/m ² p.o.	Leucemie mieloidă cronică
Procarbazin	Alchilarea ADN-ului, inhibarea ADN și ARN-ului și a sintezei de proteine	Metabolizat de ficat, excretat de rinichi	Leucopenie și trombocitopenie instalată târziu, semne gastro-intestinale anorexie, vomă, diaree	Capsulele orale nu se divizează	Câine: 50mg/m ² zilnic, timp de 14 zile	Protocol de rezervă pentru limfom
Dacarbazin	Mecanismul exact este	Metabolizat în ficat, și	Mielosupresie,	Efect vezicant și	Câine: 200 mg/m ² iv. în	Protocol de rezervă

	necunoscut, dar în parte acționează ca agent de alchilare	excretat prin tubulii renali	hepatotoxicitate, anorexie, nosee, vomă, alopecie, anafilaxie	necrozant dacă ajunge extravascular, incompatibil cu hidrocortizonul hemisuccinat	bolus lent, 1x1/zi timp de 5 zile sau 1000 mg/m ² la 3 săptăm. i.v. (în 8-10 h) sau combinat cu doxorubicina sau lomustin	pentru limfom
Vincristina	Inhibă polimerizarea tubulinei în faza mitotică	Metabolizare hepatică, cu excreție biliară, eliminare prin fecale	Poate produce ileus, constipație, neuropatie periferică	Administrat perivascular este vezicant, necrozant Nu se administrează la animalele cu disfuncții hepatice	Câine: 0,5-0,75 mg/m ² i.v. Pisici: 0,25 mg/m ² - 0,75 mg/m ² i.v.	Leucemii, limfom, carcinoame și sarcoame, tumori mastocitare
Vinblastina	Inhibă polimerizarea tubulinei, specifică pe faza celulară (metafază)	Metabolizare hepatică, cu excreție biliară, eliminare prin fecale	Neutropenie, trombocitopenie, semne gastrointestinale	Dacă se administrează perivascular este vezicant	Câini și pisici: 2mg/m ² i.v. la 1-2 săptămâni	Limfom, leucemie, tumori mastocitare
Vinorelbina	Derivat semisintetic al vinblastinei (acționează în metafază)	Metabolizat hepatic, eliminat prin fecale	Neutropenie, neuropatie periferică mai accentuată decât la vincristină, constipație	Nu la animalele cu disfuncții hepatice, administrat perivascular este vezicant	Câine: 15-18 mg/m ² i.v. la 1-2 săptămâni	Carcinoame
Doxorubicina	Are efecte multiple: Inhibiția topoizomerazei II a ADN-ului Acționează ca radical liber Produce apoptoză	Metabolizat în ficat, metabolitul principal doxorubicinolul, substanța activă se elimină în principal calea biliară, prin fecale. Se poate lega de ADN și cardioplină în țesuturi, de unde disociază lent	Mielosupresie, toxicitate gastrointestinală și cardiacă, alopecie. Dacă extravazează – necroze. Reacții de hipersensibilizare (prurit, urticarie, vomă, neliniște, dispnee)	Leagă heparina și formează agregate. Cardiomiopatie legată de doză, nefrotoxicitate, necesitatea de a reduce doza în cazul pacienților cu afecțiuni hepatice	Câine: 30 mg/m ² i.v. la interval de 2-3 săptămâni La câinii sub 10 kg 1 mg/kg Pisici: 20-25 mg/m ² sau 1 mg/kg la interval de 3 săptămâni	Leucemie, limfom, carcinoame, sarcoame (hemangiosarcoame)
Epirubicina	Are efecte multiple similare doxorubicinei, fiind un stereoisomer semisintetic al acesteia	Substanța activă se elimină pe căile cunoscute de eliminare, în principal calea biliară	Ca la doxorubicină, dar mai toxic gastro-intestinal și mai puțin toxic cardiac	Incompatibil cu heparina. Vezicant dacă extravazează	Câini: 30 mg/m ² i.v. la 3 săptămâni	Substituit pentru doxorubicină.
Mitoxantron	Antibiotic antitumoral sintetic, inhibă topoizomeraza II	Este metabolizat în ficat și eliminat prin urină și fecale	Mielosupresie, vomă și diaree și dă mai puține reacții alergice și cardiotoxice	Incompatibil cu heparina. Efect vezicant mediu	Câini: 5.0-5.5mg/m ² la 3 săptămâni Pisici: 5.0-6.5 mg/m ² la 3-4 săptămâni	Carcinom scvamocelular, limfom, carcinoame. Adjuvant în radioterapie
Actinomicina D Sau Dactinomycin	Antibiotic antitumoral produs de muceți din specie Streptomyces	Este foarte puțin metabolizat, excreție prin urină și fecale	Mielosupresie, efecte gastrointestinale (nosee și vomă, diaree)	Dacă extravazează provoacă durere, edem și necroze, este vezicant	Câine: 0.5-0.7 (0,9) mg/m ² o dată la 2-3 săptămâni	Medicație de rezervă pentru pacienții cu limfom. Poate fi de ajutor pentru pacienții cu leucemie limfoblastică acută
Cisplatin	Conține platină, se leagă covalent la ADN, inhibă sinteza proteinelor	Este inactivat intracelular. Eliminare: în proporție mare prin excreție renală	Nefrotoxic, ototoxic, nosee și vomă, mielosupresie, neuropatie periferică, hipersensibilizare.	Sunt necesare diureza agresivă și terapia antiemetică. Monitorizarea creatininei și examenul urinei. Nu se	Câine: 50-70 mg/m ² ! Nu se administrează la pisici	Osteosarcoame, mezoteliom intracavitar, carcinosarcom, sarcom

			! Edem pulmonar fatal la pisică	administra cu alte substanțe nefrotoxice		
Carboplatin	Compus ce conține platină, se leagă la ADN, inhibă sinteza proteinelor	Este excretat în proporție de 90% prin urină	Mielosupresie, nosea, vomă. La pacienții cu probleme renale, posibil nefrotoxic	La pacienții cu antecedente renale se recomandă diureza înainte de tratament. Monitorizarea parametrilor renali	Câini: 300mg/m ² i.v. Pisici: 180-210 (260) mg/m ² i.v. La 3-4 săptămâni	Osteosarcom, carcinom scvamocelular, sarcom
Citarabin/ citozinarabinozidă	Inhibă ADN polimeraza. Este incorporat în ADN și termină elongarea lanțului ADN. Este un analog al pirimidinei și acțiunea ei depinde de ciclul celular (faza 2)	Este bine metabolizat și se elimină prin urină. Ajunge la nivel terapeutic în LCR	Leucopenie, trombocitopenie, anemie, vomitare, diaree	Incompatibil cu heparina. Acționează sinergic cu L-asparaginaza Poate fi antagonist al metotrexatului	Câine și pisică: 100-150 mg/m ² s.c., divizat în două doze la 24h distanță, sau 600 mg/m ² i.v. sau s.c. O dată pe săptămână	Limfom, meningoencefalită granulomatoasă
Metotrexat	Inhibă reductaza acidului dihidrofolcic, deci interferează cu sinteza ADN-ului, reparația și replicația celulară.	Administrat oral se metabolizează parțial în intestin, dar metabolizarea se face predominant în ficat, iar eliminarea prin rinichi	Mielosupresie, denudarea mucoasei intestinale, diaree, nosea, vomă, anorexie, hepatotoxicitate, nefrotoxicitate, alopecie	Nu se administrează împreună cu AINS, sulfamide și tetraciline cresc toxicitatea L-asparaginaza reduce toxicitatea și activitatea antitumorală	Câini și pisici: 0.5-0.8 mg/kg i.v., p.o.	Limfom, tumori venerice transmisibile, tulburări mieloproliferative
Gemcitabin	Analog al deoxicitidinei, se activează intracelular este incorporat în ADN., specific pe faza celulară	75% din substanță este excretat prin urină în 24h	Toxic gastrointestinal, provoacă mielosupresie		Câine: 100-400 mg/m ² i.v., perfuzie săptămânal timp de 3 săpt. Sau 650 mg/m ² i.v. la două săpt.	Carcinom gastric, limfom, melanom malign, carcinom scvamocelular perianal
L-asparaginaza	Enzimă de origine bacteriană degradează aminoacidul asparagină, inhibă sinteza de proteine	Se elimină prin urină și fecale	Scade sinteza de proteine, poate produce pancreatită, șoc anafilactic, crește nivelul enzimelor hepatice	Se administrează cu precauție la pacienții cu disfuncții hepatice sau pancreatice. Produce rapid rezistență.	Câine: 400 UI/kg i.m. sau 1000 UI/m ² i.m. Pisică: 400 UI/kg	Limfom
Hidroxiurea	Inhibă conversia ribonucleotidelor în deoxiribonucleotide prin distrugerea ribonucleozid difosfat reductazei	Este metabolizat în ficat și eliminat prin rinichi	Mielosupresie, paronichie, semne gastrointestinale - vomă, diaree	Contraindicat pacienților cu tulburări renale	Câine: 50 mg/kg p.o. 2x1/zi sau 1x1/zi apoi 1x2/zi Pisică: 10 mg/kg, 1x1/zi	Leucemie mielogenă cronică, policitemie, acționează sinergic cu radioterapia
5-fluorouracil 5-FU	Interferează cu sinteza de ADN, acționează specific inhibând faza S	Metabolizat intracelular, eliminat prin plămâni și rinichi	Toxic gastrointestinal slab, neurotoxic puternic la depășirea dozei sau ingerat în doză mai mare de 20 mg/kg	În cazul administrării topice a nu se ingera de către animale La pisică produce neurotoxicitate fatală	Câine: 150 mg/m ² i.v. 1 pe săptămână	Carcinoame, sarcoame

2. Elemente de radioterapie oncologică

Managementul pacienților cu cancer este complex și alegerea celei mai bune metode de tratament este adesea dificilă.

În cazul **tumorilor solide** se pune problema controlului tumoral loco-regional și controlul posibilelor metastaze.

Pentru **tratamentul local** opțiunile de tratare includ de obicei chirurgia și radioterapia, iar dacă se pune problema metastazării acestea se pot combina cu chimioterapia.

Alegerea unei **alternative** dintre tratamentul chirurgical sau radioterapie sau chimioterapiei se face în funcție de dorințele proprietarului, probabilitatea de a controla local sau locoregional neoplasmul, rezultatele posibile ale tratamentului și, eventual, alte boli concurente pe care le are pacientul.

Medicul veterinar are obligația de a prezenta toate alternativele, beneficiile și riscurile tratamentelor propuse.

Dacă o masă tumorală poate fi excizată cu un prognostic bun, fără afectarea funcțională a organelor și țesuturilor remanente, cu un rezultat cosmetic (afrontarea plăgii operatorii) bun, atunci tratamentul chirurgical ar trebui să fie cel electiv.

Acest tip de tratament se poate aplica la majoritatea tumorilor orale, la sarcoamele țesuturilor moi de pe trunchi și extremități și unele tumori mastocitare. În cazul sarcoamelor de dimensiuni mari cu localizare pe membre, care ar necesita amputarea membrului pentru a elimina în totalitate neoplasmul se poate combina chirurgia oncologică cu radioterapia post excizională, fără amputarea membrului.

Radioterapia se poate aplica și înainte de excizie pentru reducerea masei tumorale. Deci, radioterapia ca tratament unic este rară în medicina veterinară și, de obicei, va fi folosită ca tratament adjuvant, mai ales pentru tumorile celulelor mastocitare și a sarcoamelor.

Următoarele tumori ale pielii sunt susceptibile la acțiunea radiațiilor: **tumorile celulelor mastocitare, sarcoamele, sarcoamele induse de vaccin la pisici, fibrosarcoamele, carcinoamele scvoamocelulare, adenocarcinoamele glandelor sudoripare și sebacee, melanoamele, plasmocitoamele.**

Tumorile cu localizare orală răspund bine la radioterapie. Radioterapia se pretează pentru această regiune deoarece regiunea are o structură anatomică complexă și adesea o intervenție chirurgicală ar fi foarte dificilă și ar lăsa disfuncții funcționale. Se tratează astfel **sarcoamele, fibrosarcoamele și carcinoamele cu localizare mai rostrală.**

Melanomul malign cu localizare orală metastazează frecvent atât local, cât și la distanță, deci necesită pe lângă radioterapie și chimioterapie. Melanoamele răspund bine la radioterapia fracționată.



Figura 1. Aplicarea radioterapiei la câine
Sursa: <http://www.csuanimalcancercenter.org/varian-radiation-machine>

Tumorile cu localizare truncale și pe extremități sunt tratabile prin excizie chirurgicală (cele mici) și / sau radioterapie.

Combinarea celor două metode de tratament îmbunătățește rezultatul terapeutic și pe cel funcțional.

Pentru tumorile care nu pot fi excizate chirurgical, radioterapia, ca metodă terapeutică unică, are de obicei un rezultat bun.

Cele mai frecvente tumori sunt hemangiopericitoamele, sarcoamele, fibrosarcoamele, care de obicei sunt invazive local.

Dacă există posibilitatea unei excizii complete și „curate” se rezolvă chirurgical, dar dacă există dubii în această privință se intervine prin radioterapie.

Radioterapia este folosită cel mai des ca terapie adjuvantă, mai ales în cazul exciziei unor tumori fără posibilitatea garantării unor margini „curate” și imposibilitatea de a mai interveni chirurgical.

În cazul tumorilor cu volum mare se apelează la radioterapie pentru reducerea volumului tumoral în vederea excizării acestora.

Mastocitoamele cutanate se tratează cu succes prin radioterapie. Sarcoamele asociate cu vaccinarea prezintă o problemă la pisici, și tind să nu răspundă la tratamentele doar prin radiație sau doar prin chirurgie.

Prin combinarea celor două metode, totuși, s-au obținut rezultate, cu un timp mediu de supraviețuire de aproximativ 1 an.

Volumul tumoral se va reduce în urma tratamentului și astfel durerea sau incompatibilitatea funcțională pe care o dă va fi diminuată sau abolită.

Radioterapia paleativă se aplică mai ales la pacienții care din cauza bolii avansate și a eventualelor metastaze ar avea un deces timpuriu.

Majoritatea pacienților vor fi tratați cu megavoltaj, prin doze fracționate în decurs de câteva săptămâni în funcție, de beneficiile și riscurile tratamentului.

2.1. Principii de bază ale radioterapiei

Radiațiile ionizante distrug celulele prin afectarea directă a ADN-ului, care va duce la moartea celulară.

Efectul poate fi și unul indirect deoarece se acționează și asupra apei din celulă și a oxigenului, rezultând radicali liberi de hidroxil care afectează ADN-ul.

Efectul acestor fenomene este de a face incapabilă diviziunea sau moartea celulară datorită aberațiilor cromozomale care apar.

Sunt sensibile la radiații celulele cu rată mare de diviziune (atât cele tumorale, cât și cele normale), deci efectele nu sunt specifice doar pentru celulele tumorale.

Efectele radiațiilor asupra țesuturilor normale cu proliferare rapidă apar în cursul sau imediat după ședința de radioterapie, acestea fiind țesuturi cu răspuns acut sau timpuriu.

Sunt afectate și celulele cu diviziune lentă sau cele care nu se divid (celulele osoase și nevoase), dar schimbările produse de radiații apar lent, aceste țesuturi fiind cu răspuns întârziat.

Dozele de radiații se calculează în unități Gray (Gy), care reprezintă cantitatea de energie absorbită de țesuturi.

O unitate Gy este echivalentă cu 1 Joule/kg de țesut sau 100 rad (unitate de măsură folosită).

Doza totală administrată trebuie să aibă posibilitate scăzută de a afecta țesuturile cu răspuns întârziat, în regiunea iradiată.

Dar răspunsul acestor țesuturi depinde de mărimea fracțiunii.

O fracțiune de mărime mai mică permite administrarea unei doze totale mai mari fără a crește posibilitatea afectării țesuturilor cu răspuns întârziat.

În medicina veterinară o fracțiune se va încadra între 2,7-4 Gy, timp de 3-5 ori pe săptămână, timp de 3-6 săptămâni.

Doza totală mai mare permite un efect mai bun asupra tumorii, dar dacă se întinde pe o perioadă de timp destul de lungă încât să permită repopularea tumorală, rezultatele nu vor fi satisfăcătoare.

Doza totală se stabilește în funcție de țesuturile adiacente zonei iradiate (creierul și măduva spinării sunt mai sensibile, iar mușchii și oasele sunt mai rezistente), volumele mari de țesuturi sunt mai sensibile la iradiații decât volumele mici.

Doza totală de radiații depinde de probabilitatea afectării țesuturilor cu răspuns întârziat, obiectivul radioterapiei fiind acela de a distruge capacitatea de multiplicare a celulelor tumorale, fără a afecta grav țesuturile normale adiacente.

Doza totală se calculează în așa fel încât să nu fie nici doza minimă, care ar acționa asupra tumorii, dar nici doza maximă, care ar putea afecta iremediabil țesuturile cu reacție întârziată. Deci, dacă tumoarea ar fi sensibilă la o terapie cu 50-55 Gy și s-ar administra doar

40 de Gy, animalul s-ar afla la limita minimă a toxicității, iar dacă ar primi 60 de Gy s-ar afla la limita maximă și animalul ar fi dispus la o toxicitate maximă.

Dozele de radiații sunt în general între 30-60 Gy. Acest lucru este realizabil prin fracționarea dozei totale de radiații într-o anumită perioadă de timp.

Pentru a avea succes trebuie să se țină cont de relația dintre timp, doză și fracțiune.

Fracționarea se referă la împărțirea dozei totale de radiații în fracțiuni mai mici.

S-a observat că această administrare permite o doză totală mai crescută, iar rezultatele obținute sunt mai bune, atât în ceea ce privește răspunsul tumorii cât și cel al țesuturilor sănătoase.

Fracționarea permite regenerarea țesuturilor normale între administrări, dar nu și a celor tumorale.

S-a observat că celulele sunt capabile de regenerare în 24 de ore de la expunerea la radiații, dacă s-au produs deteriorări subletale.

Regenerarea depinde de celulele stem disponibile, de aceea în cazul neoplasmelor este mai lentă.

Dozele fracționate permit regenerarea și repopularea țesuturilor cu răspuns imediat, dar dacă se prelungeste timpul dintre iradiații se vor regenera și cele neoplazice.

Celulele se vor redistribui prin ciclul celular în așa fel încât cele care au rezistat la un ciclu de iradiere se sincronizează în faza S.

Cea mai sensibilă fază a ciclului celular la radiații este mitoza, de aceea dozele standard de radiații afectează doar celulele în diviziune.

Cea mai rezistentă este faza S, prin fracționare radiațiile acționează asupra mai

multor celule în faza de mitoză pentru că acestea au timp să se redistribuie și să intre în faza de diviziune.

Pentru a acționa asupra celulelor din faza S se administrează doze mari de radiații.

Datorită creșterii rapide și vascularizației anormale, tumorile sunt adesea hipoxice.

Hipoxia protejează celulele tumorale de acțiunea iradierii, aceasta putând fi o problemă deoarece rezultă deteriorarea mai slabă a ADN-ului.

Prin fracționare, tumorile se reoxigenează, deoarece sunt distruse celulele oxigenate, iar la acțiunea următoarei doze de radiații vor fi mai sensibile.

Timpul dintre administrări este important, datorită repopulării celulare. Iradierile se efectuează în doze mici pe mai multe fracțiuni pe zi, dar la o distanță de minim 6 ore între ele pentru a permite repararea ADN-ului celulelor normale.

Radiațiile ionizante se pot aplica din surse externe (teleterapia), aplicarea sursei interstițial (brahiterapia) sau administrare sistemică de izotopi radioactivi (Iod-131).

Radioterapie externă prin Ortovoltaj, Cobalt-60 - megavoltaj, Accelerator linear (Linac) - megavoltaj. Brahiterapie cu Iridiu-192,

Stronțiu-90, se utilizează rar în medicina veterinară deoarece necesită introducerea unor implante.

Efectele secundare ale radiațiilor se pot clasifica în efecte secundare acute și întârziate. Cele acute se observă în timpul tratamentului și trebuie tratate simptomatic, iar dacă sunt severe se amână tratamentul cu radiații.

Cele mai frecvente manifestări (fig. 2.) sunt inflamația locală, descuamarea uscată sau umedă și alopecia (durează mai multe luni), hiper sau hipopigmentarea (afectarea melanocitelor) în cazul pielii.

Mai pot apare:

- inflamația mucoasei orale,
- jetaj,
- conjunctivită,
- keratoconjunctivită sicca,
- căderea unghiilor,
- colită.

Efectele acute ale iradiei sunt observate cel mai frecvent pe țesuturile cu diviziune rapidă, mai ales pe epiteliile, de aceea dacă leziunile au apărut pe o suprafață foarte motrică (pielea de pe articulația cotului, jaretului etc.), vindecarea va fi dificilă.

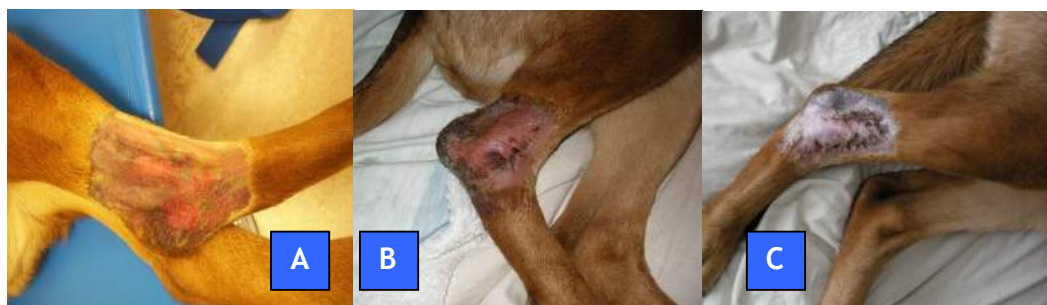


Figura 2. Câine cu (A) alopecie și hiperemie, (B) descuamare umedă și (C) descuamare uscată

Sursa: <http://www.vetoncology.org/2011/06/22/radiation-therapy-skin-side-effects/>

Efectele secundare întârziate pot fi declanșate acut, dar semnele clinice pot întârzia să apară luni sau ani după terminarea tratamentului. Unul dintre efectele secundare la nivelul pielii este leucotrichia sau melanotrichia (fig. 3), care are importanță mai mult estetică decât medicală, altele ar fi fibroza sau ulcerale fără tendință de vindecare.

Efectele secundare mai grave depind de regiunea tratată și tipul tumorii; pentru tumorile mastocitare și sarcoame aflate pe extremități există posibilitatea necrozei osoase, care se poate manifesta prin fracturi după câțiva ani, sau apariția unor tumori secundare. La ochi pot apărea cataracta (A) (fig. 4), cheratoconjunctivita sicca (B) sau afectări ale retinei.

Se mai pot constata encefalopatii, neuropatii, mielopatii, pneumonii.

Nu sunt de neglijat nici apariția tumorilor secundare datorate iradierii, deoarece se cunoaște că radiațiile sunt carcinogene.

Acestea apar mai frecvent la animalele tinere care au fost tratate prin radiații (deoarece acestea au o durată de viață mai lungă). Pentru a fi clasificat ca efect secundar întârziat al radioterapiei, neoplasmul trebuie să apară în zona iradiată dar, din țesut normal, la un timp suficient de lung, de obicei peste un an de la tratament, iar histologic trebuie să fie diferit față de tumora veche.



Figura 3. (A) leucotrichie la un Labrador și (B) melanotrichie la un Pudel după radioterapie

Sursa: http://www.veterinarycancer.com/nasal_tumors.html

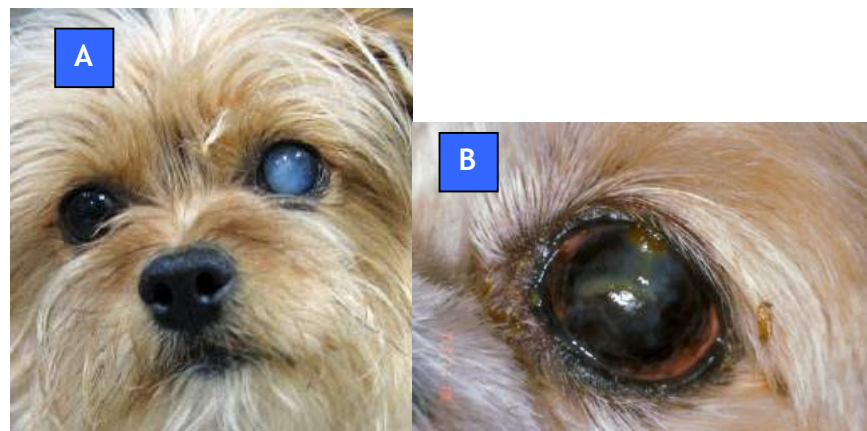


Figura 4. (A) cataractă și (B) cheratoconjunctivită sicca

Sursa: <http://www.dog-health-handbook.com/dog-eye-cataracts.html>

<http://www.merckmanuals.com/vet/multimedia/v4733690.html?Ref=n&ItemId=v4733690&RefId=x&Speed=256&Plugin=WMP&Error=?qt=&sc=&alt>

Excizia chirurgicală completă a tumorilor localizate tratează mai mulți pacienți cu cancer decât orice altă formă de tratament. Prin această metodă se tratează pacienții care au tumori singulare localizate, sau cu potențial metastazic scăzut.

Chirurgia oncologică va avea un rol sau altul la majoritatea pacienților oncologici: diagnostic prin biopsie, rezecția tumorii pentru terapie, paleativ sau reducerea unor simptome sau reducerea volumului tumoral.

Majoritatea pacienților oncologici sunt bătrâni, dar termenul bătrân este unul relativ, deoarece ar trebui știută vârsta fiziologică a pacientului și funcționalitatea organelor.

În concluzie, unui pacient căruia funcțiile organelor sunt în limite fiziologice nu ar trebui să i se refuze tratamentul doar pentru că, cronologic vorbind, este bătrân.

În cazul în care se dorește realizarea tratamentului prin chirurgie trebuie avute în vedere următoarele: tipul, stadiul și gradul cancerului, dacă vor apărea efecte sistemice sau locale, dacă există alte opțiuni alternative de tratament.

Se consideră că prima intervenție chirurgicală are cele mai bune șanse de reușită în tratament, deoarece tumorile netratate au avut timp mai puțin pentru metastazare decât cele recurente și vor avea structuri anatomice aproape normale, pe când cele recurente la locul de excizie vor afecta și alte planuri anatomice.

Pacienții cu tumori recurente vor avea mai puțin țesut sănătos necesar închiderii plăgii.

Tehnica chirurgicală va fi adaptată în funcție de locația, dimensiunea și stadiul de dezvoltare al tumorii. Orice locație pentru

biopsie trebuie poziționată în așa fel încât să poate fi ulterior excizată în cadrul operației de eliminare a tumorii.

Tumorile nu sunt plate deci rezecția într-un singur plan nu asigură eliminarea completă. Tumorile ar trebui manipulate cu grijă deoarece majoritatea sunt foarte friabile.

Dacă se elimină mai multe mase tumorale din regiuni corporale diferite se va folosi instrumental chirurgical steril pentru fiecare tumoră în parte.

În medicina veterinară, chirurgia oncologică se utilizează în combinație cu chimioterapia, cel mai des, chiar dacă unele chimioterapice încetinesc vindecarea plăgii. Se recomandă o pauză de 7-10 zile după operație până la începerea tratamentului cu chimioterapice.

În cazul folosirii radioterapiei se recomandă sistarea acesteia cu 3-4 săptămâni înaintea operației deoarece aceasta afectează celule sănătoase într-un mod mai distructiv decât chimioterapia.

Reluarea radioterapiei se poate face după 10-14 zile. Pentru „sterilizarea” plăgii chirurgicale și a planurilor anatomice rămase după excizia tumorii se poate face lavaj cu chimioterapice (administrare intracavitară) sau radioterapie.

Chirurgia oncologică în scop paleativ încearcă îmbunătățirea vieții pacientului și nu vindecarea acestuia sau prelungirea duratei de viață. Tratamentele aplicate au rolul de a reduce durerea, disconfortul sau de a reda pe cât posibil funcționalitatea.

Chirurgia citoreductivă (pentru reducerea volumului tumoral) se referă la excizia incompletă a neoplasmului, fiind rar indicată și

niciodată folosită ca metodă unică și se efectuează pentru a crește efectivitatea altor tratamente oncologice: radioterapie, chimioterapie, crio-chirurgie.

3. Alte metode de terapie în oncologie

3.1. Terapia fotodinamică

Terapia fotodinamică este o terapie fără efecte termice. Distrucția tisulară intervine în urma administrării unui agent fotosensibilizant și activarea luminoasă a acestuia.

Agentul fotosensibilizant este mai bine reținut în neoplasme decât în țesuturile sănătoase. Acest proces inițiază necroza și apoptoza celulelor țintă prin formarea oxigenului molecular și a radicalilor liberi. Stresul oxidativ acționează de asemenea și asupra microvasculaturii tumorale, producând ischemie.

În ultimii ani, ca agent fotosensibilizant s-a utilizat **acidul 5-aminolevulinic**, care este un precursor al protoporfirinei IX, sau verteporfinul, care este un fotosensibilizant de generația a doua.

După administrarea acidului 5-aminolevulinic celulele generează protoporfirină IX pe calea sintezei hemului.

Efectul este de scurtă durată, nu mai mult de 48 de ore, ceea ce reprezintă un avantaj. Eficacitatea este totuși limitată de caracterul hidrofil al moleculei, ceea ce duce la penetrarea mai slabă a unor țesuturi.

3.2. Crioterapia

Este numită și crio-chirurgie sau crioablație. Este un tratament minimal invaziv, care îngheață leziunile, utilizând temperaturi de -40°C.

Se utilizează în cazul leziunilor localizate, de dimensiuni mici și fără metastaze. Are aplicabilitate bună în tumorile pielii, leziunile precanceroase, noduli, efelide etc, dar și pentru tumori localizate în corp (pe rinichi, ficat, plămâni, prostată etc.).

Pentru înghețarea țesuturilor dorite se utilizează azotul sau argonul lichid aplicat prin tamponare, spray-ere sau cu ajutorul unor criosonde pe piele (fig. 5).

Înainte de începerea procedurii terapeutice se recomandă administrarea de analgezice, pentru a reduce eventualele disconforturi, și antibioticoterapie pentru prevenirea infecțiilor.

Distrugerea țesuturilor se realizează prin înghețarea apei intracelulare (spargerea celulei datorită formării cristalelor de gheață) și a celei extracelulare (deshidratarea celulei).

În urma înghețării la temperaturi de -40°C vascularizația tumorală este întreruptă, vasele tumorale de dimensiuni mici îngheață și se formează trombi intravasculari.



Figura 5. Sonde de crioterapie

Sursa:

<http://www.radiologyinfo.org/en/photocat/gallery3.cfm?pid=1&image=cryo-ir-probes.jpg&pg=cryo>

Atingerea temperaturii de îngheț se va face brusc, iar dezghețarea țesuturilor lent.

În urma ciclului îngheț-dezgeț rezultă necroză tisulară, care va fi resorbită mai apoi de organism prin celulele sanguine din linia albă. Cele mai bune rezultate se obțin atunci când manopera este repetată de două ori la o săptămână.

3.3. Electrochimioterapia

Este o metodă terapeutică care combină administrarea unui chimioterapic și favorizarea pătrunderii acestuia în celula canceroasă prin impulsuri electrice (electroporare) cu ajutorul unei sonde speciale.

Impulsurile electrice modifică permeabilitatea celulelor canceroase.

Metoda este utilizată în tumorile pielii, cum ar fi tumorile celulelor bazale sau scuamoase, melanomul, sarcomul Kaposi, alte cancere cu localizare pe piele.

Administrarea chimioterapicului (cisplatin sau bleomicin) se realizează topic, intratumoral sau intravenos într-o doză mai mică decât în mod normal, deoarece prin electroporare se favorizează difuzia medicamentului în celule.

În cazul administrării topice și intratumorale, injecția va fi precedată de administrarea locală a unui anestezic, iar apoi a impulsurilor electrice.

La administrarea intravenoasă se așteaptă circa 20-30 de minute după care se administrează anestezia locală și impulsurile electrice.

În cazul animalelor cu caracter dificil, sau zonelor mai sensibile (planul nazal, pleoape) se recomandă anestezia generală.

Sonda are dimensiunea unui pix și conține un electrod care va lua contact cu pielea.

În funcție de numărul de tumori, durata tratamentului poate fi între 10 și 60 de minute.

Ca efecte secundare poate apărea senzația de disconfort sau durere la locul de acțiune, sau contracții musculare slabe.

3.4. Agenții de întrerupere vasculară (*Vascular disrupting agents*)

Angiogeneza tumorală este foarte activă fiind necesară dezvoltării și metastazării tumorale.

Angiogeneza se află sub influența factorilor de creștere endotelială vasculară, factorilor de creștere derivați din trombocite, factorilor de creștere a fibroblastelor și a metaloproteinazelor matriceale și este inhibată de factori de necroză tumorală, serotonină, oxidul nitric, angiostatin sau endostatin.

Toți acești factori sunt eliberați de celulele tumorale și de celulele gazdă.

Agenții de întrerupere vasculară blochează selectiv sau distrug vasele sanguine preexistente din tumori, ceea ce duce la moartea celulelor tumorale prin hipoxie și lipsa nutrienților.

Țintesc preferențial vasele sanguine tumorale de neoformație deoarece acestea diferă structural față de cele deja existente în organismul sănătos.

Există agenți de întrerupere vasculară la care se atașează un antigen sau un factor de creștere specific pentru a se lega la endoteliul vaselor tumorale.

Acidul dimetilxantenon acetic-DMXAA produce colabarea vaselor tumorale după 30 de minute (tumori la rozătoare).

Combretastatin A₄ acționează asupra tubulinei din vasele sanguine, producând retracție celulară gonflarea membranei și reorganizarea citoscheletului, ceea ce duce la creșterea permeabilității vasculare și la

creșterea presiunii lichidului interstițial, care va duce la colabarea vaselor intratumorale.

Alți derivați sintetici din combrestatin cu o acțiune asemănătoare sunt:

- ZD6126,
- AVE8062A sau
- OXi4503.

3.5. Materialele magnetice

Familia largă a materialelor controlabile prin câmp magnetic, includ atât nano-, cât și microparticule, structuri (nanotuburi, nanofire), pelicule subțiri.

Pot servi ca exemple:

- ferofluidelor (fluidelor magnetice),
- fluidele magnetoreologice,
- polimerii magnetici,
- materiale anorganice magnetice,
- structurile biologice modificate magnetic,
- particule magnetice cu biomolecule legate.

În multe cazuri materialele composite sensibile magnetic, constau din particule magnetice mici (cel mai adesea formate din magnetită, maghemită sau diverși feriti), de la scară nanometrică la cea micrometrică, dispersați în polimeri, biopolimeri sau matrice anorganică; ca metodă alternativă particulele magnetice pot fi adsorbite pe suprafața externă a unei particule diamagnetice (nu conține electroni desperecheați și deci nu este atras de câmpul magnetic).

În majoritatea cazurilor s-au dezvoltat nano- / microparticule sintetice sensibile magnetic, dar s-au produs cu succes și particule magnetice biologice (magnetozomi

prođuși de o bacterie magnetotactică) care au fost utilizați cu succes în bioaplicații.

Sinteza nanoparticulelor magnetice

Multe proceduri chimice s-au utilizat pentru a sintetiza nano-/microparticule magnetice pentru bioaplicații, de exemplu:

- co-precipitarea clasică,
- reacții în medii constrânse (microemulsii),
- sintezele sol-gel,
- reacțiile sono-chimice,
- microunde,
- reacții hidrotermale,
- hidroliză și
- termoliza precursorilor.

Cea mai simplă și eficientă cale chimică de a obține particule magnetice este tehnica coprecipitării.

Oxizii de fier, sub forma magnetitei (Fe_3O_4) sau maghemitei (Fe_2O_3), sunt preparați prin „îmbătrânirea” mixturilor stoichiometrice de săruri feroase și ferice în mediu apos alcalin (stoichiometria = ramură a chimiei care studiază raporturile cantitative dintre elemente, în combinații sau în reacții



Magnetita (Fe_3O_4) nu este foarte stabilă și este sensibilă la oxidare ceea ce duce la formarea maghemitei (Fe_2O_3).

Principalul avantaj al procesului de coprecipitare este că se pot sintetiza o cantitate mare de nanoparticule; totuși controlul distribuției dimensiunilor particulelor este limitat.

Adăugarea de anioni organici chelatanți (carboxilați, ioni de -hidroxicarboxilați, acid citric, a.gluconic sau oleic) sau agenți de suprafață complexanți (dextran, carboxidextran, amidon, polivinilalcool), în timpul formării magnetitei, poate ajuta controlul dimensiunii nanoparticulelor.

Potrivit raportului molar dintre ionii organici și sărurile de fier, chelația acestor ioni organici pe suprafața ionilor de oxid de fier, poate preveni nucleația și duce la formarea nanoparticulelor mai mari, sau inhibă creșterea nucleilor de cristal și duce la formarea nanoparticulelor mici.

Metoda de coprecipitare clasică generează o distribuție largă a dimensiunilor. Sinteza unor nanoparticule de oxid de fier cu dimensiuni uniforme se poate face în nanoreactori sintetici și biologici, ca structuri micelare în solvenți non-polari, cuști de proteine de apoferritină, dendrimere, ciclodextrine și lipozomi.

Sinteza hidrotermală a nanoparticulelor de magnetită este efectuată în medii apoase în reactoare sau autoclave, unde presiunea poate fi mai mare de 2,000 psi (cca 13,8 Mpa), iar temperatura mai mare de 200 °C.

În acest proces, condițiile de reacție, cum ar fi solventul, temperatura și timpul de obicei au efect asupra produsului.

Dimensiunea, particulelor din pudrele de magnetită, a crescut odată cu prelungirea timpului de reacție și o cantitate mai mare de apă a rezultat în urma reacției de precipitare a particulelor mari de magnetită.

Procesul sol-gel este o cale umedă adecvată pentru sinteza oxizilor metalici nanostructurați.

Acest proces se bazează pe hidroxilarea și condensarea precursorilor moleculari în soluții rezultând o soluție de particule nanometrice mai departe condensarea și polimerizarea anorganică duce la o rețea tridimensională de oxizi metalici de gel umed.

Pentru că aceste reacții se efectuează la temperatura camerei, sunt necesare viitoare tratamente termice pentru a dobândi forma finală cristalină.

Principalii parametri care afectează cinetica, reacția de creștere, hidroliza, reacțiile de condensare și prin urmare, structura și proprietățile gelului sunt: solventul, temperatura, natura și concentrația sărurilor precursore folosite, pH-ul și agitația.

Procesul polioli este o abordare chimică versatilă pentru sinteza nanoparticulelor și microparticulelor cu forme bine determinate și dimensiuni controlate.

Poliolii selectați (polietilenglicolii) folosiți ca solvenți prezintă constante dielectrice mari și pot dizolva compuși anorganici.

Datorită punctului de fierbere relativ înalt, oferă o gamă largă de temperaturi de operare pentru prepararea compușilor anorganici.

Poliolii pot servi ca agenți reducători și deasemenea ca stabilizatori pentru controlul creșterii particulelor și prevenirea agregării interparticulare.

Nanoparticulele de magnetită neagregate (7 nm diametru) au fost sintetizate în timpul reacției trietilenglicolului cu Fe, la o temperatură ridicată.

Recent a fost dezvoltată o nouă metodă de sinteză a nanoparticulelor de magnetită – sinteza prin injectare în flux (**FIS = flux injection syntesis**).

Tehnica constă în amestecarea continuă sau segmentară a reagenților în regim de flux laminar într-un reactor capilar.

Prezintă următoarele avantaje: reproductibilitate mare și cauza curgerii în bloc și condițiilor laminare, omogenitate mare și oportunitate pentru un control extern precis al procesului.

Nanoparticulele de magnetită obținute au dimensiuni cuprinse între 2-7 nm.

Pirolizele (pyrolysis) cu spray și laser sunt reprezentanți tipici ai tehnologiei cu aerosoli, sunt procese chimice continue care permit rata mare de producție a nanoparticulelor.

Prin piroliza cu spray, o soluție de săruri ferice și un agent reducător în solvent organic este spray-at într-o serie de reactori, unde soluția de aerosoli condensează și solventul se evaporă reziduul uscat rezultat este format din particule ale căror dimensiuni depinde de mărimea inițială a picăturilor originale.

Particulele de magnetită cu dimensiuni între 5-60 nm cu diferite forme au fost obținute utilizând diferiți precursori de săruri de fier în soluții alcoolice. S-au studiat o gamă largă de reacții chimice accelerate prin iradiere cu microunde a reactanților.

Recent s-a dezvoltat o metodă cu microunde, simplă, rapidă și eficientă pentru prepararea nanoparticulelor de magnetită relativ uniforme (80 ± 5 nm) direct din săruri de Fe^{2+} , formarea acestora necesită de la câteva secunde la câteva minute.

Deasemenea utilizând această procedură se pot obține nanoparticule de magnetită „umplute” cu nanoparticule de argint.

Pulberi de nanoparticule de magnetită se mai pot sintetiza pe cale mecano-chimică.

Măcinarea cu ajutorul morii cu bile a cloridului feros și feric cu hidroxid de sodiu a dus la o mixtură de magnetită și clorură de sodiu.

Pentru a evita aglomerarea excesul de NaCl este adăugat precursorului înainte de moară. Pentru obținerea particulelor de diferite dimensiuni, pulberile măcinate au fost reîncălzite la temperaturi de la 100 la 800 °C timp de o oră.

Stabilizarea particulelor magnetice

Pentru a obține materiale sensibile magnetic biocompatibile de obicei este necesar să se stabilizeze nanoparticulele de oxid de fier prin modificarea suprafeței lor sau prin încorporarea în matrici biocompatibile corespunzătoare.

Nanoparticulele magnetice modificate ar trebui să fie stabile contra agregării în mediul biologic și în câmpul magnetic.

Mai mulți compuși cu grupări funcționale de carboxil, fosfat și sulfat sunt cunoscute că se leagă de particulele de magnetită și le stabilizează.

Acidul citric poate fi utilizat cu succes pentru stabilizarea fluidelor magnetice pe bază de apă prin coordonarea prin una sau două grupări reziduale de carboxil; acesta lasă cel puțin o grupare de acid carboxilic să fie expus solventului, care ar trebui să fie responsabil pentru a face suprafața cu încărcarea negativă și hidrofilică. Alte ferifluide pot stabilizate prin interacțiuni ionice, utilizând de exemplu acid percloric sau hidroxid de tetrametilamoniu. În majoritatea cazurilor biopolimeri biocompatibili sunt utilizați pentru

stabilizarea și modificarea particulelor magnetice.

Materialele polimerice naturale sau sintetice utilizate pentru stabilizarea particulelor ar trebui să aibe proprietățile: **să fie biocompatibile, biodegradabile, netoxice, netrombogence, non-imunogenice și ieftine.**

Nanoparticulele ideale, compozite polimer biocompatibile sensibile magnetic trebuie să aibe următoarele proprietăți:

- diametrul particulelor sub 100 nm,
- stabilitate în sânge,
- să nu activeze neutrofilele,
- să nu agregheze trombocitele,
- să evite sistemul reticuloendotelial,
- comportament neinflamator,
- timp de circulație prelungit,
- posibila imobilizare a compuşilor biologici corespunzători (anticorpi) și
- producție ieftină.

Dextranul este un polimer de polizaharid compus exclusiv din unități de D-glucopironil cu diverse lungimi de lanț și ramificații; a fost utilizat ca înveliș de polimer mai ales pentru biocompatibilitatea excelentă.

Formarea magnetitei în prezența dextranului 40.000 a fost raportată pentru prima dată în 1982.

Această procedură s-a utilizat pentru prepararea agentului de contrast pentru MRI Ferumoxtran-10; acest material are un diametru hidrodinamic de dimensiuni mici, 15-30 nm și prezintă rezistență în sânge, ceea ce permite acestor particule foarte mici să acceseze macrofagele localizate adânc în țesuturile patologice.

Alți biopolimeri care servesc ca înveliș sunt formați din dextran carboximetilat, carboxidextran, amidon, arabinogalactan sau glicozaminogalactan, iar ca polimeri sintetici biocompatibili avem polietilen glicolul (PEG) și polivinil alcoolul (PVA).

Nanoparticulele magnetice adesea formează o parte magnetică dintr-un compozit de microparticule sensibile magnetic format din diferiți polimeri sintetici, biopolimeri, materiale anorganice, celule microbiale sau materiale vegetale.

Microparticulele superparamagnetice monodisperse compuse dintr-o matrice de polistiren cu nanoparticule de maghemită (cca. 8 nm diametru), cunoscute ca Dynabeads (Invitrogen), au fost utilizate la un număr mare de bioaplicații, mai ales în biologia moleculară, biologia celulară, microbiologie și izolarea proteinelor.

Progresele recente

Particulele sensibile magnetic au deja multe aplicații stabilite sau potențiale în variate domenii din bioștiințe, biotehnologie și tehnologiile mediului înconjurător.

Aplicațiile referitoare la biomedicină sunt bazate în special pe utilizarea unor proprietăți selectate, cum ar fi separarea magnetică, țințirea magnetică, producerea de căldură, creșterea contrastului MRI.

Proprietățile magnetice a asemenea materiale au permis utilizarea lor în numeroase domenii:

- nano-/microparticulele pot fi separate din probele complexe utilizând un câmp magnetic extern (un separator magnetic, magnet permanent sau un

electromagnet). Această proprietate este importantă pentru că majoritatea materialelor biologice au proprietăți diamagnetice care permit separarea selectivă eficientă a materialelor magnetice.

- particulele magnetice pot fi conduse și menținute la un loc anume utilizând un câmp magnetic extern.
- supuse unui câmp magnetic alternativ cu frecvență înaltă, particulele magnetice, sunt capabile să genereze căldură. Acest fenomen este utilizat în special în timpul hipertermiei pe bază de fluide magnetice în tratamentul cancerului (de exemplu).
- nanoparticulele de oxid de fier magnetic generează un contrast T_2 negativ în timpul RMN-ului, au rol de agent de contrast
- pot fi utilizate pentru modificarea diamagnetică a materialelor biologice (materiale derivate din celule sau plante), polimeri organici și materiale organice, pentru etichetarea magnetică a compușilor biologici activi (anticorpi, enzime, aptameri).

Diagnoza medicală și transportul adecvat și eficient al medicației sunt domeniile medicale unde particulele nanometrice și-au găsit aplicația practică.

Sunt multe alte propuneri interesante pentru utilizarea instrumentelor nanomecanice în domeniul cercetărilor medicale și practică clinică. Nanodispozitivele din științele medicale ar putea înlocui celule, care funcționează defectiv sau necorespunzător, de exemplu **respirocitele** propuse de Freitas.

Aceste eritrocite artificiale teoretic sunt capabile să furnizeze (asigure) oxigen mai eficient decât un eritrocit natural. Ar putea înlocui celulele roșii defecte din circulația sanguină.

Aplicațiile respirocitelor ar putea include înlocuitori de transfuzii de sânge, tratamentul parțial al anemiei, probleme neonatale/prenatale și tulburări pulmonare.

Nanodispozitivele ar putea administra medicamente direct în corpul pacientului.

Asemenea nanostructuri ar putea transporta medicamente în locuri bine determinate, realizând un tratament mai precis.

Mecanisme similare cu „arme” specifice ar putea fi utilizate pentru îndepărtarea obstacolelor din sistemul circulator sau în identificarea și distrugerea celulelor tumorale.

Nanoroboții care funcționează în corp, ar putea monitoriza nivelul diferiților compuși și înregistra informația într-o memorie internă.

Pot fi utilizați rapid în examinarea unui anumit țesut, prin controlarea caracteristicilor biochimice, biomecanice și histometrice ale acestuia.

Biotehnologia își extinde sfera și eficacitatea privind opțiunile tratamentelor disponibile din nanomateriale.

Nanotehnologia moleculară va dezvolta eficacitatea, confortul și viteza viitoarelor tratamente medicale și în același timp le va scădea semnificativ riscul, costul și invazivitatea.

Biotehnologia permite fabricarea personalizată, biofarmaceutică și biotehnologică a medicamentelor pentru a învinge problemele asociate cum ar fi solubilitatea slabă, stabilitate chimică slabă

după administrate *in vivo* și *in vitro* (perioada de înjumătățire scurtă), biodisponibilitate slabă și potențiale efecte secundare.

Nanoparticulele transportoare au fost dezvoltate ca o soluție pentru a depăși problemele de transport – nanocristale de substanțe medicamentoase, nanoparticule solide de lipide (SLN), transportoare lipidice nanostructurate (NLC), nanoparticule din conjugate medicament-lipid (LDC).

Transportorii (cărăușii), după cum a arătat **Muller și col. (cit.de Herbert Ernest și Shetty Rahul)**, sunt adecvați pentru a rezolva problemele de livrare a medicamentelor cu solubilitate diferită.

Quantum Dot (punctul cuantic) cu nanoparticule de o culoare specifică, poate oferi o verificare ieftină și ușoară, a unei probe de sânge, pentru prezența în acelaș timp a diferte virusuri. În ceea ce privește cercetarea, capacitatea de a eticheta mai multe biomolecule, atât în exteriorul cât și în interiorul celulei, ar putea permite cercetătorilor să vadă schimbări celulare complexe și evenimente asociate cu boala, furnizând indicii valoroase pentru dezvoltarea viitoarelor produse farmaceutice și terapeutice.

Prima nanosită artificială cu porți voltaice a fost fabricată de **Charles R. Martin și col. la Colorado State University în 1995.**

Membrana lui Martin conține o matrice din nanotubi cilindrici de aur cu diametrul de 1,6 nm. Când tubii sunt încărcăți pozitiv, sunt excluși ionii pozitivi și pot trece cei negativi, iar când membrana primește voltaj negativ, pot trece doar cei pozitivi.

Pentru a obține un nanodispozitiv similar, dar cu specificitate moleculară semnificativă,

ar putea combina porțile voltaice cu dimensiunile și forma porilor pentru a obține control asupra ionilor transportați.

Domeniul multidisciplinar al aplicațiilor nanotehnologice pentru descoperirea de noi molecule și manipularea celor disponibile în mod natural, ar putea fi orbitoare în potențialul său de a îmbunătăți îngrijirea sănătății.

Pe viitor, ne putem imagina o lume în care nanodispozitivele medicale sunt implantate în mod curent sau chiar injecta în circulația sanguină pentru a monitoriza sănătatea și a participa automat în repararea sistemelor care au deviat de la funcționarea normală. Avansarea continuă în domeniul nanobiotehnologiei biomedicale este stabilirea și colaborarea grupurilor de cercetare din domeniile complementare.

Asemenea colaborări trebuie menținute nu doar la nivelul domeniilor de specialitatea ci și la nivel internațional.

Ar trebui menționat faptul că nanotehnologia însăși nu este o disciplină unică în curs de dezvoltare ci mai degrabă un punct de întâlnire a științelor tradiționale cum ar fi chimia, fizica, biologia pentru a aduce împreună cunoștințe colective și expertiza necesară dezvoltării acestei noi tehnologii.

În **tabelul 5.** se regădesc câteva domenii de aplicare ale nanotehnologiei.

Abilitatea de a structura materiale și dispozitive la nivel molecular aduce beneficii imediate și va revoluționa cercetarea și practica medicală. S-au început experimente teoretice și practice asupra biocompatibilității nanomaterialelor și nanodispozitivelor.

Tabelul 6. oferă o privire de ansamblu asupra acestui domeniu în plină evoluție.

Tabelul 5.

Aplicabilitatea nanotehnologiei
(după: Ernest H, Shetty R., 2005)

Nanomateriale brute	Simulare și diagnostic celular	Cercetare biologică
Învelișul nanoparticulelor Materiale nanocristaline	Chip-uri celulare Simulatoare celulare	Nanobiologie Nanostiința în științele vieții
Materiale nanostructurate	Manipulare ADN, secvențializare, diagnostic	Transportul medicamentelor
Peptide ciclice Dendrimere Agenți detoxifianți Fulerene Transportori de medicamente Nanoparticule pt. Scanare MRI Nano-coduri de bare Nano-emulsii Nano-fibre Nano-particule Nanoshell Nano-tubi de carbon Nano-tubi noncarbon puncte cuantice (quantum dots)	Testări genetice Micro-matrice ADN Secvențiere ADN ultra-rapidă Manipulare și control ADN	Descoperirea de medicamente Biofarmaceutice Încapsularea de medicamente Medicamente "inteligente"
Locuri artificiale de fixare	Instrumente și diagnosticare	Medicină moleculară
Anticorpi artificiali Enzime artificiale Receptori artificiali Polimeri imprimați molecular	Sisteme de detectare bacteriană Bio-chip-uri Imagistică biomoleculară Biosenzori și biodetectare Aplicații de diagnostic și apărare Roboți de endoscopie și microscopie Senzori bazați pe fulerene Imagistică Laborator pe un chip Monitorizare Nanosenzori Micro-matricea proteinelor Scanare microscopică prin sondare	Terapie genetică Farmacogenomică Enzime artificiale și controlul lor Manipularea și controlul enzimelor Nanoterapeutice Nanoparticule antibacteriene și antivirale Farmaceutice bazate pe fulerene Terapie fotodinamică Radiofarmaceutice
Controlul suprafețelor	Dispozitive intracelulare	Biologie sintetică și nano-dispozitive primitive
Adezivi de suprafață artificiali Suprafețe biocompatibile Suprimarea biofilmului Suprafețe prelucrate Suprafețe model Înveliș filmat	Analize (teste) intracelulare Biocomputere intracelulare Senzori/reporteri intracelulari Implante în celule	Tecto-dendrimere Nanoplatforme dinamice "nanozomi" Celule și lipozomi artificiali Micelii polimerice
Nanopori	BioMEMS (micro-electro-mechanical systems)	Biotehnologie și biorobotică
Imunoizolare Site și canale moleculare Membrane nanofiltrante Nanopori Separare	Materiale și instrumente implantabile BioMEMS, chip-uri, și electrozi implantați Protetică bazată pe MEMS /nanomateriale Ajutoare senzoriale (retină artificială) Micromatrice Senzori bazați pe micro-structuri Microfluide Micro-ace MEMS medical Instrumente chirurgicale MEMS	Terapie virală biologică Hibridi bazați pe viruși Celule stem și clonarea Ingineria țesuturilor Organe artificiale Nanobiotehnologia Biorobotică și bioboți
		Nanorobotică
		Nanoroboți și dispozitive ADN Nanoroboți bazați pe diamante Dispozitive de reparare a celulei

Tabelul 6.

Lista aplicabilitatea nanotehnologiei în științele biomedicale
(după Freitas Jr., 2004)

Nano-aplicații
Biodetectarea patogenilor
Detectarea proteinelor
Cercetarea structurii ADN-ului
Ingineria țesuturilor
Distrușterea prin căldură a tumorilor (hipertermia)
Studii fagocinetice
Intensificarea contrastului MRI
Separarea și purificarea biomoleculilor și celulelor
Markeri biologici fluorescenți
Transportul de medicamente și gene
Celule artificiale
Construcția de proteine pentru transportul eficient de electroni, sau cu proprietăți mecanice
Biosenzori
Nanobiomotori
Biomineralizare
Nanorobotică
Nanocomputere

3.5.1. Aplicații principale – Terapia în cancer

Dimensiunile mici ale nanoparticulelor îi înzestreaază cu proprietăți care pot fi foarte folositoare în oncologie, mai ales în imagistică.

Punctele quantice (nanoparticule cu proprietăți de confinare cuantică, ca de exemplu emisia luminoasă ajustabilă după dimensiune), utilizate în legătură cu MRI-ul, pot produce imagini excepționale ale localizării tumorale.

Aceste nanoparticule sunt mult mai luminoase decât coloranții organici și necesită doar o sursă luminoasă pentru excitație.

Acest lucru înseamnă că particulele cuantice fluorescente pot produce o imagine de contrast mai bună.

O altă proprietate a acestora este suprafața mare raportată la volum, care permite atașarea multor grupări funcționale la nanoparticule, care apoi caută și se conectează la anumite celule tumorale.

Dimensiunea mică a nanoparticulelor (10 la 100nm) le permite acumularea preferențială la localizarea tumorală (pentru că tumorile nu au un sistem limfatic efectiv).

Terapia anticancerosă fotodinamică se bazează pe distrucția celulelor canceroase cu ajutorul oxigenului atomic generat de laser, care este citotoxic.

Celula cancerosă preia o cantitate mai mare, față de celulele sănătoase, din colorantul special care se folosește pentru obținerea oxigenului atomic, deci doar celulele canceroase vor fi distruse (fig. 6).

Din nefericire moleculele de colorant rămase migrează în piele și ochi și produc

reacții de sensibilizare la expunerea solară, timp de aproape 6 săptămâni.

Pentru evitarea acestui efect secundar, varianta hidrofobică a acestui colorant este închisă într-o nanoparticulă poroasă.

Colorantul rămâne în nanoparticulă, nu se împrăștie în tot organismul, dar nici nu își pierde capacitatea de a produce oxigen atomic, care va fi eliberat prin pori de 1 nm.

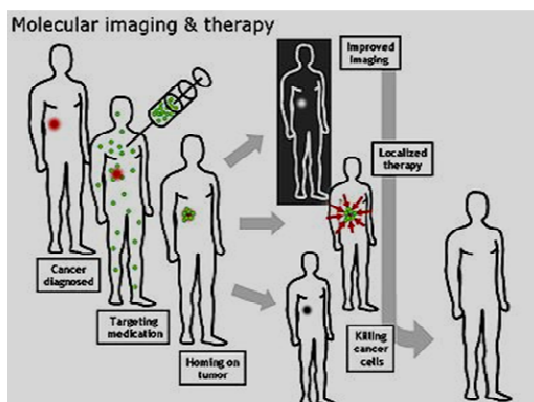


Figura 6. Utilizarea nanoparticulelor în terapia și diagnosticul imagistic al cancerului

Sursa: <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanomedicine>

Halas și West de la Rice University din Houston, au dezvoltat un sistem de transportare a substanțelor medicamentoase denumite **nanoshell – nanosfere** din metal dielectric (siliciu acoperit cu aur).

Aceste nanosfere încorporate în polimeri hidrogel care conțin substanțe medicamentoase anti-tumorale, sunt injectate în organism și se acumulează lângă celulele tumorale (fig. 7).

Când sunt încălzite cu un laser infraroșu, nanosferele (puțin mai mari decât virusul poliomielitei) absorb selectiv o frecvență specifică de infraroșii, topesc polimerul și eliberează substanța activă într-un loc specific.

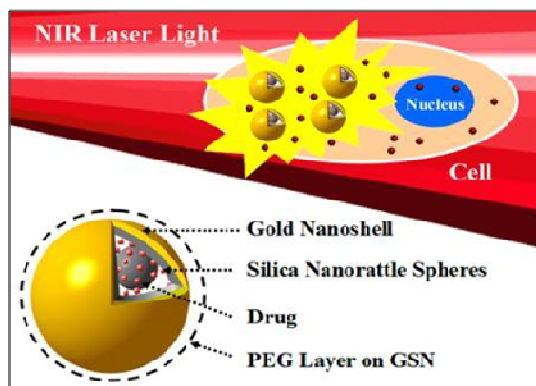


Figura 7. Nanosfere de aur

Sursa: http://english.cas.cn/Ne/CASE/201101/t20110121_64693.shtml

Dendrimerele sunt molecule sintetice de forma stelată cu diametrul de 5-20 nanometri, formate din structuri ramificate (fig. 8).

Baker și Tomalia (cit. de Freitas, 2004) sintetizează nanodispozitive multicomponente numite tectodendrimere. Au în mijloc un dendrimer de care se atașează alte tipuri de module dendrimerice, fiecare tip fiind proiectat pentru a îndeplini funcții necesare pentru a forma un nanodispozitiv terapeutic inteligent.

Un număr mare de combinații se pot realiza pentru a fabrica (produce) nanodispozitivul dintr-o „bibliotecă” de componente dendrimerice, care îndeplinesc următoarele funcții: recunoașterea celulelor bolnave, diagnosticul bolilor, transportul de substanțe medicamentoase, determinarea locației și determinarea rezultatului terapiei.

De exemplu, odată ce dendrimerele raportează de apoptoză, intensificatoare de contrast și eliberatoarele de chemoterapeutice sunt atașate la dendrimerul central, există posibilitatea de a produce cantități mari din acest tectodendrimer.

Acest schelet poate fi modificat pentru a fi utilizat împotriva unui tip anumit de cancer prin substituirea dendrimerele pentru recunoaștere

tumorală, creând un nanodispozitiv „personalizat” pentru a distruge doar un anumit tip de cancer, evitând celulele sănătoase.

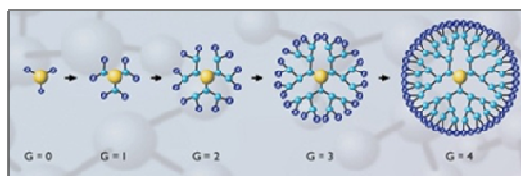


Figura 8. Dendrimere de la generația 0 la 4

Sursa: <http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/microelectronics-and-nanotechnology/tomalia.aspx>

La nanodispozitive sintetizate utilizând generația 5 de dendrimere din poli-amidoamidă cu centrul din etilendiamină, cu acid folic, fluoresceină și metotrexat atașat covalent la suprafață, aceștia țintesc celula tumorală, ajută în imagistică și au capacitatea de a livra intracelular substanța medicamentoasă (livrarea țintită a îmbunătățește răspunsul citotoxic al celulelor la metotrexat de 100 de ori față de cel liber).

Câteva tipuri de celule canceroase au fost asociate cu cel puțin o proteină unică pe care dendrimerele de localizare ar putea să le folosească pentru identificarea celulelor canceroase, și datorită progresiei genomice este foarte probabil să se identifice proteine unice pentru fiecare tip de tumoră.

Același tip de recunoaștere a proteinelor de suprafață ar putea fi utilizat împotriva celulelor infectate cu virusuri sau paraziți.

Hipertermia produsă de fluide magnetice, este bazată pe faptul că particulele magnetice biocompatibile produc căldură prin diverse tipuri de pierdere energetică în timpul aplicării unui câmp magnetic sau unei surse de lumină laser.

Este o metodă promițătoare în terapia cancerului, datorită faptului că țesuturile se

încălzesc la 42-46°C, ceea ce reduce, în general, viabilitatea celulelor canceroase și le crește sensibilitatea la chimioterapice și radiații. Spre deosebire de chimioterapie și radioterapie, hipertermia are mai puține efecte secundare.

Pentru tratamentul prin hipertermie au fost utilizate diferite tipuri de nanoparticule magnetice biocompatibile, cum ar fi fluidele magnetice stabilizate cu dextran, alte tipuri de fluide magnetice biocompatibile, nanoparticule modificate cu aminosilan, magnetolipozomi cationici sau magnetolipozomi cu afinitate.

Se folosesc:

- nanosfere (nanoshells),
- nano dispozitive din aur în formă de cuști (nano-cages),
- nanoparticule de aur sau
- nanoparticule magnetice (particule din oxid de fier) acoperite cu polimeri naturali sau sintetici pentru a preveni aglomerarea particulelor.

Bolile hiperproliferative ale pielii nu se limitează doar la tumori, ci și la leziunile precanceroase.

Mai multe medicații anticanceroase și antiproliferative au fost transportate cu ajutorul dendrimerelor și a nanoparticulelor printre care 5-fluorouracilul, podofilotoxina, paclitaxelul sau acidul 5 aminolevulinic.

Acidul 5 aminolevulinic și metilaminolevulinatul induc producția de protoporfirină în celulele pielii. Terapia fotodinamică este utilizată în cheratoza actinică și cancere nemelanomice ale pielii.

Battah și col.2001 citat de Prow a utilizat dendrimere conjugate la acidul 5 aminolevulinic (ALA) pentru a atenua

caracterul hidrofili al acestuia și a îmbunătății sinteza de porfirină și efectul de fotosensibilizare. Acest conjugat nu a fost utilizat topic deoarece nu penetrează pielea suficient, dar a fost utilizat sistemic, ceea ce a dus la fotosensibilizare generalizată.

Di Venosa și col., au administrat topic dendrimere conjugate la acidul 5 aminolevulinic, trei molecule de ALA la un dendron (3m-ALA) în soluție salină și dimetil sulfoxid. Cele în soluție salină au avut niveluri intracelulare mai ridicate și producție mai bună de protoporfirină. S-a observat că își fac efectul maxim cu o oră mai târziu, probabil datorită faptului că fiind lipofile sunt reținute în stratul cornos.

Podofilotoxina este o substanță antiproliferativă cu administrare topică extrasă din rizomii de *Podophyllum species*.

Această substanță s-a utilizat la fabricarea gelului Condylax 0,5% pentru papiloamele produse de HPV (Human Papilloma Virus) prin inhibarea dezvoltării celulelor epiteliale infectate, dar prezintă efecte toxice grave după absorbție.

Chen și col., au reușit încapsularea podofilotoxinei în nanoparticule lipidice solide (SLN - solid lipid nanoparticle, fig. 9) pentru reducerea toxicității și urmărirea gradului de penetrare al pielii.

Nanoparticulele lipidice solide pot încapsula o cantitate relativ mare de substanță activă față de alte nanostructuri. Se pot administra oral, topic și intravenos. SLN asigură eliminarea controlată a medicamentului mai multe zile, aderă la suprafața mucoaselor și pot traversa bariera hemato-encefalică.

Ca modele experimentale Chen și col. au utilizat pielea porcină de pe abdomenul unui singur individ. Pielea a fost curățată de păr, țesut adipos și a fost secționată.

Toate experimentele de permeabilitate au fost repetate de trei ori. Ca etalon s-a luat permeabilitatea tincturii de podofilotoxină 0,15%.

Cantitatea de SLN cu podofilotoxină și cea de tinctură de podofilotoxină s-a măsurat după 8 ore. Din studiu a reieșit că permeabilitatea SLN-podofilotoxină este de 3,84 de ori mai bună decât cea a tincturii (SLN-podofilotoxină 23,38 μg, tinctură 6,08 μg), iar ca localizare în piele: SLN-podofilotoxina se localizează în epidermă și în foliculii piloși, ceea ce îi limitează absorbția sistemică și toxicitatea, iar tinctura se găsește în toate straturile pielii.

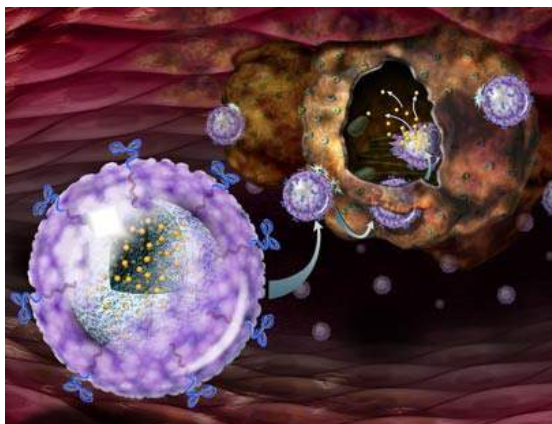


Figura 9. Nanoparticule lipidice solide

Sursa: <http://www.jhunewsletter.com/wp-content/uploads/2012/09/b7nanoparticles.jpg>

Venuganti și col., (2008) citat de Prow a folosit dendrimere de poliamidoamină (PAMAM, cu 5-fluorouracil (5-FU) pentru a observa permeabilitatea acestora în piele.

Studiul a utilizat modele experimentale pe piele porcină, pe mai multe loturi. Lotul martor a fost tratat cu 5-FU în următoarele soluții: soluție tampon fosfat, ulei mineral și miristat de

izopropil, pentru lotul martor. S-au mai utilizat un lot care a fost tratat cu 5-FU conjugat pe dendrimere în aceeași solventi și un lot la care s-a făcut pre-tratare cu dendrimere, iar apoi s-a aplicat 5-FU.

Lotul tratat simultan cu dendrimere și 5-FU în ulei mineral și miristat de izopropil a prezentat un flux crescut, iar cel în soluție tampon fosfat nu a prezentat modificări față de lotul martor. Cele în vehicule lipofile au avut coeficient de partiție mai ridicat și au crescut solubilitatea 5-FU în piele.

La lotul pretrat cu dendrimere s-a observat creșterea permeabilității 5-FU de 4 ori la cel în ulei mineral, de 2,5 ori la cel în miristat de izopropil și la cel în soluție tampon fosfat s-a observat scăderea la jumătate a permeabilității față de lotul martor.

Studiul a arătat că dendrimerele au crescut permeabilitatea pielii pentru 5-FU din solventii lipofili prin alterarea barierei hidrolipidice a pielii.

Zhao și col. 2009 citat de Prow a utilizat nanoparticule de Realgar. Realgarul este un medicament utilizat în medicina tradițională chinezească, dar fiind foarte puțin hidrosolubil și foarte toxic, utilizarea lui în medicină a fost dificilă. Are ca substanță activă tetrasulfid tetrasenicul (As_4S_4).

Particulele au dimensiunea de 150 nm și au fost obținute prin „crio-măcinare” și încorporate într-un unguent, și au fost capabile să inhibe proliferarea celulelor canceroase în melanom la șoareci.

S-au utilizat două loturi experimentale unul pentru aplicare topică (livrare transdermală a medicamentului), iar celălalt lot pentru administrarea prin injectare

intraperitoneală a 25 mg nanoparticule realgar pentru fiecare, plus un lot de control tratat doar cu unguent. Celulele tumorale au fost injectate în șoareci intradermic în zona dorsală și s-au lăsat să se dezvolte până la un volum de 40-60 mm³. Tratamentele s-au făcut timp de 14 zile, o dată la două zile.

Lotul de control a dezvoltat tumori cu un volum de aproximativ 500 mm³, lotul tratat intraperitoneal a dezvoltat tumori cu un volum de aproximativ 300 mm³, iar la cei tratați cu unguent cu nanoparticule de realgar s-a observat reducerea dezvoltării tumorale, volumul tumoral fiind de aproximativ 100 mm³.

Moartea celulelor tumorale s-a produs prin apoptoză și necroză, iar la doze de până la 5μM a indus reducerea viabilității celulare la aproximativ 45%.

Rezultatele obținute pentru unguentul cu nanoparticule de realgar sugerează că administrarea topică are efecte mult mai benefice decât administrarea intraperitoneală.

Bibliografie

- BATTAH S., O'NEILL S. et al. (2006)** - Enhanced porphyrin accumulation using dendritic derivatives of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy: An in vitro study, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38:1382–1392
- BAUST J.G., GAGE A.A. (2014)** - Mechanisms of cryoablation: Clinical consequences on malignant tumors, *Cryobiology* 68:1–11
- CHIRILA A.B. (2014)** - Metode de terapie alopătă și de nano-terapie. Referat II în cadrul pregătirii doctoratului. FMV Timișoara.
- CHEN H, CHANG X, DU D. et al. (2005)** - Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting, *Journal of Controlled Release* 110: 296 – 306
- CHUN R., GARRETT L. D., VAIL D. M. (2007)** - Cancer Chemotherapy in Eds. Withrow S.J., Vail D.M. - Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology ed. IV, p. 163-192, Saunders-Elsevier, St. Louise, Missouri, USA.
- CRISTINA R.T. (2009)** – Noutăți în nanomedicină, <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/585-NANOMEDICINA.pdf>
- CRISTINA R.T. (2013)** - Mijloace nano-terapeutice în medicină. Suport de curs electronic pentru studenții la doctorat. <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1289-2013-Mijloace%20nano-terapeutice%20in%20medicina.pdf>
- DI VENOSA G.M., CASAS A.G., BATAH S. et al. (2006)** - Investigation of a novel dendritic derivative of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38:82–91.
- DINKOVA-KOSTOVA A.T. (2008)** - Phytochemicals as Protectors Against Ultraviolet Radiation: Versatility of Effects and Mechanisms, *Planta Med* 2008; 74(13):1548-1559.
- DUMITRESCU, E, CRISTINA RT. (2016)**. Elemente de terapie alternativă și complementară în medicina veterinară. Ed. Solness Timisoara, ISBN: (13)978-973-729-451-7.
- ERNEST H., SHETTY R. (2005)** – Impact of Nanotechnology on Biomedical Sciences: Review of Current Concepts on Convergences of Nanotechnology with Biology, *AZoNano* 1:1-14.
- FARESE J.P., WITHROW S.J. (2013)** - Surgical Oncology in Eds. Withrow S.J., Vail D.M. - Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology ed. V, p. 149-156, Editura Saunders-Elsevier, St. Louise, Missouri.
- FREITAS R.A. (2005)** - What Is Nanomedicine? - *Disease-a-Month*, 5(16):325–341.
- GAYA A. M., RUSTIN G.J.S. (2005)** - Vascular Disrupting Agents: A New Class of Drug in Cancer Therapy, *Clinical Oncology* 17:277–290.
- GUSTAFSON D.L., PAGE R.L. (2013)** - Cancer Chemotherapy in Eds. Withrow S.J., Vail D.M. - Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology ed. V, p. 157-179, Saunders-Elsevier, St. Louis, Missouri, USA.

16. **KLEINSTREUER C., CHILDRESSA E., KENNEDY A. (2013)** - Targeted Drug Delivery: Multifunctional Nanoparticles and Direct Micro-Drug Delivery to Tumors, in Eds. Becker S., Kuznetsov A. - *Transport in Biological Media*, p. 391–416.
17. **LARUE S.M., GORDON I.K. (2013)** - Radiation Therapy in Eds. Withrow S.J., Vail D.M. - *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* ed. V, p. 180-197, Saunders-Elsevier, St. Louise, Missouri, USA.
18. **LARUE S.M., GILLETTE E.L. (2007)** - Radiation Therapy in Eds. Withrow S.J., Vail D.M. - *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* ed. IV, p. 193-210, Saunders-Elsevier, St. Louise, Missouri, USA.
19. **MERWE D., PICKRELL J.A. (2012)** - Toxicity of nanomaterials, in Eds. Gupta, Ramesh C - *Veterinary Toxicology (Second Edition)*, p. 383–390.
20. **NORTH S., BANKS T. (2009)** - Introduction to Small Animal Oncology, Saunders-Elsevier, London, UK.
21. **OTA J., GIULIANO E.A. (2007)** - Local photodynamic therapy for equine squamous cell carcinoma: Evaluation of a novel treatment method in a murine model, *The Veterinary Journal* 176:170–176
22. **PROW T.W., GRICE J.E. et al. (2011)** - Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery - *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 30:470-491.
23. **ROBINSON N.G. (2013)** - Complementary and Alternative Medicine for Cancer: The Good, the Bad, and the Dangerous in Eds. Withrow S.J., Vail D.M. - *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* ed. V, p. 280-292, Editura Saunders-Elsevier, St. Louise, Missouri, USA.
24. **SAFARIC I., HISKA K., SAFARIKOVA M. (2011)**– Magnetic Nanoparticles for Biomedicine, in: *Intracelular delivery: Fundamentals and Applications, Fundamental Biomedical Technologies*, Ed. Prokop.Springer, p. 363-372.
25. **SAFARIC I, SAFARIKOVA M. (2009)** - Magnetic nanobiocomposites and their possible applications, *NanoCon* 20. - 22. 10. 2009, Rožnov pod Radhoštěm, Česká Republika.
26. **ŠAFAŘÍK I., HORSKÁ K., ŠAFAŘÍKOVÁ M. (2011)** - Magnetic Nanoparticles for Biomedicine, *Intracellular Delivery Fundamental Biomedical Technologies* Volume 5:363-372.
27. **SALATA O.V. (2004)** – Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology*, 2:3.
28. **SAYED Z.M., TELANG S.D., RAMCHAND C.N. (2003)** - Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine, *BioMagnetic Research and Technology*: <http://www.biomagres.com/content/1/1/2>
29. **SILVA A., SILVA-FREITAS E. et al. (2012)**- Magnetic particles in biotechnology:from drug targeting to tissue engineering, *Advances in Applied Biotechnology*, Ed. InTech, p. 237-258.
30. **SPUGNINI E. P., VINCENZI B. (2009)** - Electrochemotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma in cats: A preliminary report, *The Veterinary Journal* 179:117–120.
31. **SRIVASTAVA V., NEGI A.S. (2005)** - Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13:5892–5908.
32. **ȘINCAI M., LUPESCU R.C. (2007)** – Efectul UV protector al unor compuși cu nanoparticule, *Lucrare de diplomă, FMV Timișoara*.
33. **ȘINCAI M, VULPE A.I. (2003)** – Observații asupra efectului protector al unor nanocompuși magnetici asupra pielii în condiții de expunere prelungită la UVR, *Lucrare de diplomă, FMV Timișoara*.
34. **UNDERWOOD C., VAN EPS A.W. (2012)** - Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality, *The Veterinary Journal* 193:12–23.
35. **VENUGANTI V.V.K., PERUMAL O.P. (2008)** - Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil, *International Journal of Pharmaceutics* 361:230–238.
36. **VILLALOBOS A., KAPLAN L. (2007)** - *Canine and Feline Geriatric Oncology*, Editura Blackwell Publishing, Iowa, USA.
37. **WITHROW S.J. (2007)** - Surgical Oncology in Eds. Withrow S.J., Vail D.M. - *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, ed. a IV-a, p.157-162, Saunders-Elsevier,

St. Louise, Missouri, USA.

38. **ZHAO Q.H., ZHANG Y., LIU Y. et al. (2010)**
- Anticancer effect of realgar nanoparticles on mouse melanoma skin cancer in vivo via transdermal drug delivery, *Medical Oncology*, 27(2):203-212

Web sites

39. http://en.wikipedia.org/wiki/Boswellia#media_viewer/File:Boswellia_sacra_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-022.jpg
40. <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanofluidics>
41. <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanomedicine>
42. http://english.cas.cn/Ne/CASE/201101/t20110121_64693.shtml
43. http://img.timeinc.net/time/daily/2007/0706/antibiotics_0618.jpg
44. <http://luirig.altervista.org/photos-search/index.php?title=Catharanthus+roseus>
45. <http://rehabilitacionymedicinafisica.files.wordpress.com/2009/02/sonolysis2.jpg>
46. http://s3.amazonaws.com/readers/healthmad/2007/07/22/43701_0.jpg
47. <http://urbanherbology.org/wp-content/uploads/2011/05/camellia-sinensis-tea-plant.jpg>
48. <http://wisplants.uwsp.edu/scripts/detail.asp?SpCode=sancan1>
49. <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3034>
50. <http://www.bellenews.com/2011/09/20/science-tech/zybrexat-could-help-thyroid-cancer-patients-to-live-longer/>
51. http://www.bhfroe.com/ZC/index.php?main_page=product_info&products_id=925
52. <http://www.biolib.cz/cz/image/id128053/>
53. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/cancer-questions/electrochemotherapy-for-cancers-affecting-the-skin>
54. <http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/microelectronics-and-nanotechnology/tomalia.aspx>
55. <http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/microelectronics-and-nanotechnology/tomalia.aspx>
56. <http://www.csuanimalcancercenter.org/varian-radiation-machine>
57. <http://www.dog-health-handbook.com/dog-eye-cataracts.html>
58. <http://www.fda.gov/consumer/updates/nanotech072507.html>
59. <http://www.futurity.org/health-medicine/nano-painting-lights-up-brain-tumors/>
60. <http://www.itmonline.org/arts/turmeri3.htm#figure3>
61. <http://www.jhunewsletter.com/wp-content/uploads/2012/09/b7nanoparticles.jpg>
62. <http://www.lsbu.ac.uk/water/buckmin.html>
63. <http://www.merckmanuals.com/vet/multimedia/v4733690.html?Ref=n&ItemId=v4733690&RefId=x&Speed=256&Plugin=WMP&Error=?qt=&sc=&alt=>
64. <http://www.nano-reviews.net/index.php/nano/rt/printerFriendly/5167/5775>
65. <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=26485.php>
66. <http://www.nist.gov/mml/bmd/her2-021908.cfm>
67. <http://www.nordicdiagnostica.com/magnetic-beads/2284>
68. <http://www.radiologyinfo.org/en/photocat/gallery3.cfm?pid=1&image=cryo-ir-probes.jpg&pg=cryo>
69. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208005115>
70. <http://www.veterinarycancer.com/mastcelltumors2.html>
71. http://www.veterinarycancer.com/nasal_tumors.html
72. <http://www.vetoncology.org/2011/06/22/radiation-therapy-skin-side-effects/>
73. <http://www.woundsource.com/product/acticoat-7>
74. <https://www.airocide.com/how-it-works>

Primul vaccin inactivat românesc, care protejază păsările,
 contra infecțiilor cu *S. enteritidis* și *S. Typhimurium*

SALMOVACOL

Vaccinul potrivit, la timpul potrivit!

S.e + S.tm



Vaccinul Salmovacol S.e + S.tm
 în controlul infecțiilor salmonelice

Compoziția vaccinului Salmovacol S.e + S.tm

1. Tulpini vaccinale (indigene) izolate și tipizate de IDSA:

- *S. enteritidis* / 248 / 2009
- *S. typhimurium* / 152 / 2012

2. Adjuvant uleios:

MONTANIDE - ISA 70 VG

Utilizarea vaccinului Salmovacol S.e + S.tm

- la păsări de reproducție (RRU/RRG)
- la găini ouă consum

- Reduce colonizarea (infecția) organelor de reproducție (ovar, oviduct) - transmitere transversală.
- Reduce colonizarea (infecția) în intestin, previne eliminarea salmonelelor, (reducându-se sursele de infecție).
- Anticorpii maternali previn infecția cu *S. enteritidis* și *S. typhimurium* în primele 2 săptămâni de viață.
- Asigură protecție încrucișată contra *Salmonella* sp. din tipuri fagice de S.E. - heteroloage și protecție parțial încrucișată, între serogrupuri.

Calea de administrare	Categoría de vârstă	Vaccinarea					
		I		II		Rapel de întreținere	
		Vârsta	Doza	Vârsta	Doza	Vârsta	Doza
Subcutanată în treimea mijlocie a gâtului, pe partea dorsală, cu acul îndreptat spre coada păsării	Pui de găină (tineret)	12 săpt	0,3 ml	16 săpt	0,3 ml	1 an de la a doua administrare a vaccinului	0,3 ml

Se pot vaccina puii de o zi (doză 0,1 - 0,2 ml) cu rapel la vârsta de 4 săptămâni și revaccinare la 12 - 16 săptămâni.

Producător
Romvac
TRADITIE SI INOVATIE IN SANATATEA ANIMALOR
 șos. Centurii, nr. 7, Voluntari, jud. Ilfov
 Tel.: 021 350 31 09
 romvac@romvac.ro; www.romvac.ro

Terapia adjuvantă cu imunomodulatori în oncologie

Adjuvant therapy with immunomodulators in oncology

Ioana Chițescu^{1,2}, Diana Mihaela Alexandru¹, Răzvan Ionuț Dobre¹, Maria Crivineanu^{1,*}

¹ Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București, Facultatea de Medicină Veterinară; ² ROMVAC Company

[*maria.crivineanu@yahoo.com](mailto:maria.crivineanu@yahoo.com)

Cuvinte cheie: cancer, imunomodulatori, oncologie veterinară, terapie adjuvantă

Key words: cancer, immunomodulators, veterinary oncology, adjuvant therapy

Rezumat

În domeniul imunoterapiei oncologice, în ultimii ani s-au făcut descoperiri remarcabile. Scopul acestei lucrări este să prezinte descoperirile recente în imunoterapia tumorală, inclusiv utilizarea celulelor T inhibitoare, celulelor T modificate, vaccinurilor anticanceroase și anticorpilor anti B și T. Imunoterapia în oncologie veterinară este din ce în ce mai utilizată datorită rezultatelor impresionate. Terapia cu celule T modificate a demonstrat un control tumoral remarcabil și regresie la subiecții umani, iar vaccinurile anticanceroase au demonstrat recent perioade lungi lipsite de boală și timp de supraviețuire crescut la câinii cu limfom. Astfel, datorită efectelor clinice obținute, imunomodulatorii sunt utilizați cu succes în terapia oncologică veterinară.

Abstract

In the field of oncology immunotherapy, remarkable discoveries have been made in recent years. The aim of this paper is to cover recent findings in oncology immunotherapy, including the use of inhibitory T cells, modified T cells, anti-cancer vaccines and anti-B and T antibodies. In veterinary oncology, immunotherapy is increasingly used due to impressive results. Modified T-cell therapy has demonstrated remarkable tumour control and regression in human subjects, and anticancer vaccines have recently demonstrated long disease-free periods and increased survival time in dogs with lymphoma. Thus, due to the clinical effects obtained, immunomodulators are successfully used in veterinary oncology therapy.

Introducere

Atât în medicina veterinară cât și în cea umană imunitatea joacă un rol important în tratarea și salvarea organismului afectat.

Există un număr variat de boli ce țin de imunitate, cea mai cruntă fiind neoplasmul malign, mai generic cancerul, un fenomen patologic complex care afectează întreg

organismul având manifestări clinice variate și diferite de la individ la individ chiar și în cadrul aceluiși tip histologic tumoral.

Tumora malignă ca și manifestare clinică este cunoscută pentru capacitatea de a disemina loco-regional, metastaza, recidiva post operator, ducând în final la exitus.

Cancerul este de fapt un complex de sindroame având drept caracteristică comună

proliferarea celulară necontrolată de tip malign.

Dezideratul major urmărit în terapia acestei cumplite entități patologice este prelungirea duratei și calității vieții.

Vindecarea pacientului care dezvoltă această maladie este posibilă doar în stadiile incipiente, dar având în vedere lipsa simptomelor clinice, sunt rar întâlnite cazurile depistate din timp.

Datorită faptului că boala cancerosă este de natură sistemică, afectând întregul organism, reiese obligativitatea efectuării unui diagnostic de certitudine cât mai din timp, astfel încât să se permită instituirea terapiei în fazele inițiale.

Strategiile terapeutice fiind obligatoriu bazate pe asocierea simultană a cât mai multor tehnici terapeutice, polichimioterapia citostatică atât ante cât și post operator, protocoale de chirurgie oncologică, imuno și hormonoterapia, terapii adjuvante (4, 6).

Terapia adjuvantă, cea cu imunostimulatoare reprezintă un principiu terapeutic modern, oprirea totală a răspunsului imun patologic în numeroase boli autoimune sau în chirurgia grefelor și transplantelor, este un deziderat dorit dar destul de greu de realizat în condițiile neselectivității efectului agenților medicamentoși (5).

Terapia cu modificatori ai răspunsului biologic (MRB)

Imunoterapia este o modalitate biotehnologică modernă, neconvențională care reprezintă și o posibilitate terapeutică care s-a adăugat trialului clasic în oncologie (chirurgie, chimioterapie citostatică și radioterapie) (1).

Scopul este stimularea activității mecanismelor imune ale organismului atât în

caz de oncopatii cât și în afecțiuni sistemice nemaligne pentru a sista, respinge sau a obține regresia pe cale imunologica a respectivului proces patogen.

În anul 1908, Paul Ehrlich a arătat că imunitatea naturală reprezintă cheia privind cancerul, că imunitatea nu depinde de substanțele antimicrobiene, ci de activități pur celulare.

După previziunile lui, în viața fetală și post-fetală, celulele anormale devin extraordinar de comune, însă datorită mecanismelor de apărare ale organismului ele rămân latente timp de 20, 30 sau chiar 40 de ani mai înainte de a genera o tumoare și numai când are loc o diminuare a activității celulare vitale poate să urmeze dezvoltarea rapidă "parazitară" a acestor celule (1, 9).

S-a descoperit că, datorită activității unor populații de celule cu funcții supresoare (Perry), de mai multe ori reacțiile imune nu inhibă, ci stimulează procesul neoplazic.

Toate aceste constatări justifică studiile întreprinse în vederea folosirii rezistenței imune a organismului în limitarea proliferării tumorale și constituirea ca ramură distinctă a imunoterapiei.

Un lucru poate fi destul de evident, respectiv faptul că dincolo de multitudinea de verigi, unele cât se poate de prompte, ale apărării antitumorale, lanțul în ansamblul lui poate fi depășit de proliferarea de tip invadant a celulelor maligne, instalându-se o stare de imunodeficiență secundară profundă.

Imunoterapia reprezintă o opțiune terapeutică ce are ca scop stimularea sistemului celular al imunității (SCI), care funcționează ca un mecanism de

supraveghere continuă, depistând celulele canceroase și împiedicând, în stadiile tardive ale bolii, extinderea procesului, deoarece aceste celule pot scăpa supravegherii imune.

Astfel, subiecții cu stare generală bună și care prezintă un sistem imunitar funcțional normal tind să prezinte un prognostic favorabil (9, 18).

În condiții normale, orice celulă cu tendință de malignizare este recunoscută și eliminată de către limfocite sau alte celule efectoare ale imunității.

În consecință, activitatea mecanismelor umorale și celulare ale sistemului imun ar putea inhiba dezvoltarea tumorii și eliminarea celulelor neoplazice.

Imunoterapia, în multiplele ei forme practicate astăzi în oncologia clinică veterinară, urmărește prevenirea instituirii malignizării, dar și oprirea evoluției și regresia procesului neoplazic, prin citoreducția selectivă (2).

Imunoterapia reprezintă o abordare terapeutică mai apropiată și mai puțin dăunătoare pentru organismul canceros comparativ cu radioterapia și chimioterapia, permițând reactivarea sistemului celular al imunității supresat de agresiunea neoplazică prin:

- stimularea imună specifică sau nespecifică sau limitrea prin mijloace specifice a progresiunii neoplazice și sindroamelor paraneoplazice, astfel încât să prevaleze mecanismele imunoreactive asupra celor imuno-facilitatoare.
- refacerea în parametri normali a funcției organelor hematopoetice și imunocompetente.

- să reducă pe cât posibil starea de imunodeficiență secundară determinată de evoluția clinică a tumorii prin antagonizarea efectelor limfocitelor t supresoare.
- creșterea rezistenței naturale imune a organismului cu inhibarea proliferării tumorale.
- determinarea regresiei maligne, reducerea în volum a masei tumorale prin realizarea la nivel celular a citoreducției (11).

Se utilizează ca imunomodulatori diverse produse biologice:

- naturale, celule eucariote întregi dar modificate prin factori fizici sau chimici (temperatură, diverse substanțe potențializatoare ale imunogenității), fragmente celulare eucariote sau procariote imunogenice (membrană, perete celular, ribozomi, citoschelet, etc) dar mai ales moleculele constitutive naturale;
- sintetizate prin recombinarea genetică sau alte căi artificiale. Acestea induc atât răspunsul imun dar pot acționa și ca adjuvante în stimularea sintezei anticorpilor specifici (9).

Actualitatea imunoterapiei cancerului este determinată de faptul că cele trei modalități clasice de tratament, chirurgie, radioterapie și chimioterapie au ajuns la o limită la care cel puțin în momentul de față nu se întrevăd progrese majore în privința eficienței și rezultatelor vis-a-vis de durata supraviețuirii sau a măririi intervalului liber de boală.

Pentru ca imunoterapia să fie eficientă, este necesar ca numărul celulelor tumorale din tumora primara să nu depășească valoarea de 10^6 corespunzând la stadiul T_0 (tumora primară in situ), nedepistabilă clinic (5, 17).

Imunoterapia preventivă oncologică

Pentru evitarea declanșării bolii neoplazice este obligatoriu a fi respectate o serie de reguli generale și specifice.

Din acest punct de vedere, efectele imunoterapeutice maxime se obțin în cazul leziunilor premaligne de tip epitelio-displazii, nefiind recomandată hiperstimularea antigenică, în special cea specifică dar și nespecifică, mai ales în mielo sau limfo-displazii.

Măsurile de profilaxie specifică și nespecifică vizează:

- evitarea contactului organismului sănătos cu agenții etiotropi cancerigeni;
- îndepărtarea surselor sau factorilor susceptibili de a determina oncopatii (fizici, chimici, biologici);
- creșterea reactivității imunologice nespecifice a animalelor susceptibile să dezvolte cancer (antecedente ereditare), expuse unor factori de risc onco-inductori, purtătoare ale unor leziuni precanceroase sau tumori benigne cu potențial mare de malignizare (14).

Profilaxia în oncologie urmărește prevenirea instalării malignizării, conform principiului “este mai ușor să previi decât să tratezi” și este împărțită în specifică și nespecifică (11).

Profilaxia nespecifică are ca scop creșterea reactivității antitumorale a organismului (stimularea ridicată a celulelor NK), întrucât ele sunt elemente nespecifice ce se opun creșterii elementelor tumorale și urmărește trei deziderate:

- ecologizarea arealului;
- eliminarea pe cât posibil a factorilor cauzali

determinanți și favorizanți;

- stimularea Sistemului Celular al Imunității (SCI); aceasta se realizează printr-o imunoterapie profilactică, în populațiile sau la indivizii purtători ai unor afecțiuni premaligne încadrabile în grupa celor cu risc crescut de apariție a cancerului.

Profilaxia specifică se poate face prin vaccinare pentru agentul etiologic bine precizat ce poate determina cancerul la animale.

Vaccinul anti Marek este primul vaccin antitumoral, a doua reușită a fost vaccinul împotriva leucemiei pisicii (primul vaccin contra unui retrooncovirus) cu un procent de protecție foarte ridicat asupra acestei boli (3, 8).

Imunoterapia curativă oncologică

Vizează citoreducția selectivă a celulelor neoplazice fără afectarea celor normale, prin inducerea simultană a câtorva efecte.

O primă posibilitate o reprezintă reducerea imunodepresiei organismului canceros, indusă malign sau consecutiv terapiei citostatice, un alt efect putând fi citoliza imunologică specifică, respectiv numai a celulelor neoplazice (13).

Etiologia plurifactorială, screening-ul complex, prin mijloace de supraveghere imunologice și paraclinice, este indicat să fie efectuat periodic pentru a se evita instituirea stării de malignitate celulară.

Malignizarea este un proces etapizat, de lungă durată, care presupune numeroase modificări citogenetice exprimate morfo-funcțional, inclusiv prin “ascunderea” antigenității sau a stării de self alterat, conceptul de NON SELF nefiind în totalitate

corect, celula neoplazică provenind dintr-o celulă normală a organismului.

Eficacitatea imunoterapiei este condiționată de prezența unor molecule marker specifice pe suprafața celulelor maligne.

Există antigeni tumorali unici, care se găsesc numai pe celulele tumorale ale unui individ anume și antigene tumorale comune întâlnite la toți indivizii cu același tip de tumoră, dar lipsesc pe suprafața celulelor normale.

Antigenele tumorale de tip M sunt comune celulelor tumorale și celulelor normale (11, 20).

Imunoterapia activă

Urmarește activarea sistemului celular al imunității al organismului canceros, dar pentru aceasta, trebuie să fie îndeplinite două condiții: tumora malignă să aibă caractere antigenice distincte și organismul gazdă să fie imunocompetent.

Este important să nu se confunde cu situația în care tumora prezintă un suport microbial (suprainfectare); în această situație există antigenitate nespecifică bacteriană, deci stimularea S.C.I. este realizată predominant umoral.

Imunoterapia specifică poate fi specifică sau nespecifică, iar cea nespecifică poate fi la rândul ei de zonă sau de sistem (sistemică).

Stimularea S.C.I. se realizează cu ajutorul unor imunomodulatori care pot fi biotici (microbieni), celule tumorale inactivate prin mijloace fizice sau chimice precum adjuvanți.

Acești imunomodulatori nu interacționează cu tumora sau cu agenții tumorali, ei având doar acțiune generală:

- nespecifică: constă în administrarea de imunomodulatori care se poate realiza: in

situ, prin grataj, administrare intradermică sau intratumorală; sau de zonă (loco-regională).

- specifică – situație în care se folosesc celule tumorale sau extracte de antigene tumorale (6, 15, 16).

Imunoterapia pasivă (seroterapia)

Reprezintă operațiunea prin care se preiau anticorpi sau factori umorali de la donator și se inoculează la acceptor; se transferă partea lichida. În acest mod se efectuează:

- administrarea de anticorpi monoclonali;
- îndepărtarea factorilor blocați și a complexelor imune circulante;
- imunochimioterapia țintită
- administrarea de interleukine

În esență, seroterapia constă în transferarea (transfuzia) de anticorpi antitumorali specifici de la un organism donator imunizat specific contra aceluiși tip tumoral malign, la un organism acceptor.

Aceasta presupune terapia cu ser sau anticorpi izolați din ser, dar rezultatele sunt inconstante, deci discutabile.

Biotehnologiile și utilizarea proteinelor de tip imunoglobuline (Ac) modificate genetic, precum și doar a fragmentelor structurale caracterizate printr-o mare specificitate și afinitate, responsabile de efecte antitumorale, reprezintă un domeniu de avangardă al imunoterapiei specifice (10, 12).

Imunoterapia adoptivă

Tehnica e la fel ca imunoterapia pasivă, dar se transferă celule imune (limfocite, monocite) sau produși ai acestor celule

(mesageri sau molecule informaționale reprezentate de IL-2, interferon, citokine).

Prin transferul lor la organismul primitor, are loc și transferarea informației antigenice.

Constă în transferarea către organismele bolnave a celulelor imunocompetente alogene prelevate de un organism.

Celulele grefate se imunizează împotriva tumorii, dar această metodă riscă să provoace o reacție imunitară a grefonului împotriva tumorii (19).

Imunoterapia restaurativă

Urmărește restabilirea funcțiilor imunogene, restabilirea populațiilor celulare imune deficitare (celule STEM, limfocite T) - pentru aceasta se intervine prin inhibarea sau scoaterea din competiție a celulelor imunosupresoare.

Revigorează SCI, inhibă celulele supresoare (limfocite, monocite, macrofage) și elimină factorii solubili de supresie. Se realizează prin factori timici, chiar hormoni sau prin folosirea unor factori sintetici (levamisolul).

Cele mai bune rezultate au fost obținute prin asocierea hormonilor timici cu interleukine-IL-2.

Polipeptidele imunomodulatoare sunt activatoare ale macrofagelor, celulelor NK, având o mare rezistență la proteaze, specificitate înaltă față de receptorii liganzi, și biodisponibilitate (21, 22).

Acemanan este un complex mucopolizaharidic, care a fost izolat și purificat în anul 1983 din planta Aloe vera. Efectele imunomodulatoare sunt complexe, interacțiune cu sistemul imun realizându-se prin următoarele mecanisme:

- interacționează cu sistemul imun, în sensul stimulării macrofagelor și a limfocitelor T și NK. Favorizează eliberarea locală de TNF (tumor necrosis factor), secretat de macrofage, cu rol de distrugere a celulelor tumorale;
- scade producerea de oxid nitric sintetizat de macrofage cu rol inflamator și acțiune foarte toxică celulară;
- stimulează sinteza și eliberarea de interleukine (IL-1 și IL-6) amplificând răspunsul imun mediat celular (sporește eficacitatea limfocitelor T și NK);
- efect antiviral prin diminuarea sintezei ARN-ului, la virusuri anvelopate: lentivirusuri (HIV, FIV, PIV), ortomyxovirusuri (influența), paramyxovirusuri (New Castle), Herpes virus;
- diminuează proliferarea fibroblastelor. Eliberarea complexului de citokine asociat cu efectul antiviral și cel de inhibare a proliferării fibroblastelor recomandă acest medicament în terapia fibrosarcoamelor cu etiologie virală la câine (inclusiv epulis) și feline.

Leucomax este un stimulator și inductor al creșterii numărului de celule dendritice și NK.

Ethyol este un modulator al genei supresoare WT-p53, având și acțiune antimitogenă și reversoare.

Bonephos are efect inhibitor al enzimelor metaloproteinazice, de tip matrix, având efect inductor al apoptozei (10).

Concluzii

Imunoterapia constituie o metodă complementară destinată atât prevenirii

aparitiei cancerului cât și eliminării (citoreducției) celulelor maligne care persistă în organism după aplicarea metodelor terapeutice clasice: chirurgie, radioterapie, chimioterapie, aplicate după scheme terapeutice consacrate.

Astfel se urmărește îmbunătățirea prognosticului, fiind considerată de optimiști “piatra unghiulară” în creșterea eficacității terapiei convenționale.

Imunoterapia oncologică este utilizată în tratamentul cancerului, obținându-se rezultate remarcabile atât în medicina umană, cât și în medicina veterinară.

Bibliografie

- ADDISSIE S., KLINGEMANN H. (2018).** Cellular immunotherapy of canine cancer. *Veterinary sciences*, 5(4):100.
- ALMELA R.M., ANSÓN A. (2019).** A Review of Immunotherapeutic Strategies in Canine Malignant Melanoma. *Veterinary sciences*, 6(1):15.
- BERGMAN P.J. (2007).** Anticancer vaccines. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(6):1111-1119.
- BERGMAN P.J. (2009).** Cancer immunotherapy. *Topics in companion animal medicine*, 24(3):130-136.
- BERGMAN P.J. (2018).** Veterinary oncology immunotherapies. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(2):257-277.
- BRODY J., KOHRT H., MARABELLE A., LEVY R. (2011).** Active and passive immunotherapy for lymphoma: proving principles and improving results. *Journal of Clinical Oncology*, 29(14):1864-1875.
- CRÎNGANU D, CRIVINEANU M. (2009).** Terapie oncologică veterinară. Ed. Printech, București.
- CROSSLEY R.A., MATZ A., DEW T., KALINAUSKAS A., FAUCETTE N., POFF B., SUCKOW M.A. (2019).** Safety Evaluation of Autologous Tissue Vaccine Cancer Immunotherapy in a Canine Model. *Anticancer Research*, 39(4):1699-1703.
- DAY M.J., SCHULTZ R.D. (2014).** Veterinary Immunology-Principles and Practice, CRC Press.
- DUFFY M.J., SYNNOTT N.C., MCGOWAN P.M., CROWN J., O'CONNOR D., GALLAGHER W.M. (2014).** p53 as a target for the treatment of cancer. *Cancer treatment reviews*, 40(10):1153-1160.
- GATTINONI L., POWELL J.R., ROSENBERG S.A., RESTIFO N.P. (2006).** Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nature Reviews Immunology*, 6(5): 383.
- GU Z., WANG C., YE Y. (2019).** U.S. Patent Application No. 16/081,188.
- ICHIM T., KOOS D. (2019).** U.S. Patent Application No. 16 / 044,347.
- KENSLER T.W., SPIRA A., GARBER J.E., SZABO E., LEE J.J., DONG Z., FOTI M. (2016).** Transforming cancer prevention through precision medicine and immunoncology. *Cancer Prevention Research*, 9(1):2-10.
- MITCHELL M.S., HAREL W., GROSHEN S. (1992).** Association of HLA phenotype with response to active specific immunotherapy of melanoma. *Journal of clinical oncology*, 10(7):1158-1164.
- PAI C.C., KUO T.F., MAO S.J., CHUANG T.F., LIN C.S., CHU R.M. (2011).** Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Veterinary*

- immunology and immunopathology*, 139(2-4):187-199.
17. PEYMAN G.A. (2019). *U.S. Patent Application No. 16 / 200,195.*
18. REGAN D., GUTH A., COY J., DOW S. (2016). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: current options and new developments. *The Veterinary Journal*, 207:20-28.
19. ROSENBERG S.A., RESTIFO N.P., YANG J.C., MORGAN R.A., DUDLEY M.E. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(4):299.
20. SONNTAG A., WEINSCHENK T., MAHR, A., SCHOOR O., FRITSCHKE J., SINGH H. (2019). *U.S. Patent Application No. 16/165,121.*
21. TREON S.P., MITSIADES C., MITSIADES N., YOUNG G., DOSS D., SCHLOSSMAN R., ANDERSON K.C. (2001). Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies. *Journal of immunotherapy*, 24(3):263-271.
22. TREON S.P., SHIMA Y., GROSSBARD M.L., PREFFER F.I., BELCH A.R., PILARSKI L.M., ANDERSON K.C. (2000). Treatment of multiple myeloma by antibody mediated immunotherapy and induction of myeloma selective antigens. *Annals of oncology*, 11 (suppl 1):107-111.

Antibioticul **Nr.1** pentru porumbei!

FOSFOTILROM

conține fosfomicină și tilosin tartrat

Asociere superioară
celorlalte clase de antibiotice

Combate salmoneloza, micoplasmoza,
colibaciloza, holera, stafilococia,
streptococia, pseudomonoză

De administrat
din prima zi de viață a puilor,
până în preziua zborului
(la porumbeii voiajori)

Pulbere hidrosolubilă

Romvac
FOSFOTILROM
-pentru porumbeii voiajori-

Compoziție: Fosfomicina de calciu 20 g
Dextroza 20 g; Fostat motorizată 20 g
Clorura de sodiu ad 20 g

MOD DE ADMINISTRARE: În apa de băut în doză de 80 mg/100 ml
în apă de 3-7 zile. 1 g produs la 1 litru de apă (2 linguri de apă).
Căsuța împănă cu apă se va inclina corect gradului de apă.
Căsuța împănă cu apă se va inclina corect gradului de apă.
Căsuța împănă cu apă se va inclina corect gradului de apă.

CONTRINDICAȚII: Nu se administrează la păsările cu infecții
respiratorii acute și la păsările cu infecții respiratorii acute.
Nu se administrează la păsările cu infecții respiratorii acute.

Prezervarea: Se păstrează la temperatură ambiantă (15-25°C) în ambalaj original.
Nu se păstrează la temperatură ambiantă (15-25°C) în ambalaj original.

04-2013 Conținut: 50 g
MAI PENTRU UZ VETERINAR

Romvac
TRADIȚIE ȘI INOVAȚIE ÎN SAHATATEA ANIMALELOR

▼ *Lucrări originale / Original papers*

ALGORITM DE CALCUL AL CONCENTRAȚIEI PREDICTIBILE FĂRĂ EFECT (PNEC) PENTRU EVALUAREA RISCULUI DE MEDIU AL PRODUSELOR MEDICINALE VETERINARE

ALGORITHM FOR THE CALCULUS OF NON EFFECTIVE PREDICTABLE CONCENTRATION (PNEC) FOR EVALUATION OF THE ENVIRONMENTAL RISK OF THE VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS

Viviana Ciuca¹, V. V. Safta², Romeo T. Cristina³

¹ NS Pasteur Institute SA, ² Polytechnic University of Bucharest,

³ Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

viviana_c20@yahoo.com

Cuvinte cheie: mediu, PNEC, algoritm
Key words: environment, PNEC, algorithm

Rezumat

Analiza riscului de mediu pentru produsele medicinale veterinare este o evaluare a posibilei lor evoluții, a modului de acțiune, a efectelor produse și este structurată în două faze, în conformitate cu ghidurile VICH GL6 (faza I) și GL38 (faza II). Evaluarea riscurilor de mediu, parte integrantă a autorizațiilor pentru produsele medicinale veterinare, interpretată conform ghidurilor VICH, asigură predictibilitatea și transparența rezultatelor obținute. Calea de distribuție și evoluția în mediu a substanței active din produsul medicinal veterinar sunt factori importanți pentru evaluarea efectului expunerii finale. Concentrația predictibilă fără efect (PNEC) este concentrația unei substanțe în orice mediu sub care efectele adverse nu se vor produce, cel mai probabil pe durata expunerii pe termen lung sau pe termen scurt. În evaluarea riscului pentru mediu, valorile PNEC vor fi comparate cu concentrația predictibilă de mediu (PEC) pentru a determina dacă riscul unei substanțe este acceptabil sau nu. Dacă $PEC / PNEC < 1$, riscul este acceptabil. PNEC-urile sunt de obicei calculate prin raportarea descriptorilor de doză toxicologică la un factor de evaluare. Punctele finale utilizate cel mai frecvent pentru determinarea PNEC-urilor sunt mortalitatea (concentrația medie letală, LC50), creșterea / dezvoltarea somatică (concentrația efectivă, ECx sau concentrația fără efecte observate, NOEC) și reproducerea (concentrația efectivă, ECx sau concentrația fără efecte observate, NOEC). Se determină PNEC-urile pentru factorii de mediu: apă, sediment și sol. În lucrare se prezintă un algoritm de calcul al concentrațiilor predictibile fără efect (PNEC) pentru factorii de mediu: sol, apă, sediment. Aceste calcule sunt necesare pentru evaluarea riscului de mediu pentru produsele medicinale veterinare. Pe baza acestui algoritm de calcul, a fost elaborat un software original, interactiv specializat, care să permită determinarea rapidă și convenabilă a concentrațiilor predictibile fără efect, PNEC, pentru factorii de mediu: sol, apă, sedimente pentru produsele medicinale veterinare. Softul este un instrument foarte util pentru specialiștii în evaluarea riscurilor de mediu.

Abstract

The environmental risk analysis for veterinary medicinal products is an assessment of their possible evolution, exposures and effects and is structured according to the VICH GL6 (Phase I) and GL38 (Phase II) guides. The environmental risk assessment, an integral part of the veterinary medicinal product authorizations, interpreted and harmonized under the VICH guidelines, ensures the predictability and transparency of the results obtained. The route of distribution and the evolution in the environment are important factors for the concentration of the final exposure. Predicted No-Effect Concentration (PNEC) is the concentration of a substance in any environment below which adverse effects will most likely not occur during long term or short term exposure. In environmental risk assessment, PNECs will be compared to predicted environmental concentration (PEC) to determine if the risk of a substance is

acceptable or not. If $PEC/PNECs < 1$, the risk is acceptable. The PNECs are usually calculated by dividing toxicological dose descriptors by an assessment factor. The endpoints most frequently used for deriving PNECs are mortality (LC50), growth (ECx or NOEC) and reproduction (ECx or NOEC). PNECs need to be derived for various environmental compartments (water, sediment, soil, air, etc.). The paper presents an algorithm for calculating predictable no-effect concentrations (PNEC) for environmental factors: soil, water, sediment required for environmental risk assessment of veterinary medicinal products. Based on this calculation algorithm, specialized interactive software has been developed to allow rapid and convenient determination of predictable no-effect concentrations, PNEC, for environmental factors: soil, water, sediment for veterinary medicinal products. It is a very useful tool for environmental risk assessment specialists.

Introducere

Evaluarea riscului este o evaluare a posibilei evoluții, a modului de acțiune și a efectelor produsului medicinal veterinar.

În ansamblu, evaluarea riscului este structurată în jurul abordării coeficientului de risc, așa cum este descris în ghidurile VICH GL6 (faza I) și GL38 (faza II).

Coeficientul de risc (RQ) este definit ca raportul dintre concentrația predictibilă din mediu a substanței active din produsul medicinal veterinar (PEC) și concentrația predictibilă fără efect a substanței active din produsul medicinal veterinar (PNEC).

Coeficientul de risc calculat indică probabilitatea apariției efectelor negative asupra mediului.

Evaluarea de fază II începe la nivelul A, pe baza unui set de date referitoare la caracteristicile substanței active, comportamentul și efectele acesteia, care permit caracterizarea riscului de mediu.

PNEC-urile sunt de obicei calculate prin raportarea descriptorilor de doză toxicologică la un factor de evaluare.

Punctele finale utilizate cel mai frecvent pentru determinarea PNEC-urilor sunt mortalitatea (concentrația medie letală, LC50), creșterea / dezvoltarea somatică (concentrația efectivă, ECx sau concentrația fără efecte observate, NOEC) și reproducerea

(concentrația efectivă, ECx sau concentrația fără efecte observate, NOEC).

Factorii de evaluare (AF) sunt utilizați în determinarea PNEC-urilor și exprimă diferențele interspecifice și intraspecifice dintre datele obținute în laborator și în mediul natural.



Factorii de evaluare aplicați pentru testele pe termen lung sunt mai mici, deoarece incertitudinea extrapolării datelor obținute în laborator la mediul natural este redusă.

Mai multe date privind mai multe specii din același factor de mediu pot de asemenea, reduce incertitudinile, micșorând astfel în

continuare valoarea factorilor de evaluare.

De obicei, PNEC-urile sunt derivate numai pentru 4 compartimente (Tabelul 1):

- apă dulce,
- sol,
- microorganisme și
- sedimente.

În absența oricăror date ecotoxicologice pentru organismele solului sau pentru organismele care traiesc în sedimente, PNEC-

sol și PNEC_{sediment} pot fi calculate din PNEC-apă utilizând metoda echilibrului partițiilor (EPM).

Acesta metoda, EPM nu este, de obicei, recomandată pentru substanțele care pot prezenta un potențial pericol pentru organismele din sol. De exemplu: logKow / Koc > 5 și LC50 / EC50 la <1 mg / L (pentru speciile acvatic) [2, 3, 4].

Tabelul 1

PNEC-urile / Factorii de evaluare folosiți pentru calculul PNEC (extras din orientările ECHA privind evaluarea riscurilor) [2].

Tip PNEC	Date disponibile	AFs
PNEC apa sau PNECsol	Cel puțin un L(E) C50 pe termen scurt de la fiecare dintre cele trei nivele trofice	1000
	Un EC10 sau NOEC pe termen lung de la un nivel trofic	100
	Două rezultate pe termen lung (EC10 sau NOEC) provenite de la specii reprezentând două nivele trofice	50
	Rezultate pe termen lung (EC10 sau NOEC) provenite de la cel puțin trei specii care reprezintă trei nivele trofice	10
	Metoda distribuției sensibilității la specie (SSD)	1-5
	Date din teren sau ecosisteme - model	dupa caz
PNEC Microorganisme	EC50 pe termen scurt de la inhibarea nămolului activ	100
	NOEC pe termen lung de la inhibarea nămolului activ sau teste de biodegradabilitate	10
	NOEC pe termen lung de la inhibarea bacteriilor de nitrificare	1
PNEC Sediment	Un test pe termen lung (NOEC sau EC10) pentru un organism viu din sediment	100
	Două teste pe termen lung (NOEC sau EC10) pentru două specii de organisme vii din sediment	50
	Trei teste pe termen lung (NOEC sau EC10) pentru trei specii de organisme vii din sediment	10

2. Algoritmul de calcul pentru concentrația predictibilă fără efect asupra mediului (PNEC)

În lucrare se prezintă un algoritm pentru calculul concentrațiilor predictibile fără efect (PNEC) pentru factorii de mediu: sol, apă, sedimente, necesar pentru evaluarea riscului de mediu al produselor medicinale veterinare.

Pe baza acestui algoritm de calcul, a fost elaborat un software original, interactiv, specializat, care să permită determinarea rapidă și convenabilă a concentrațiilor

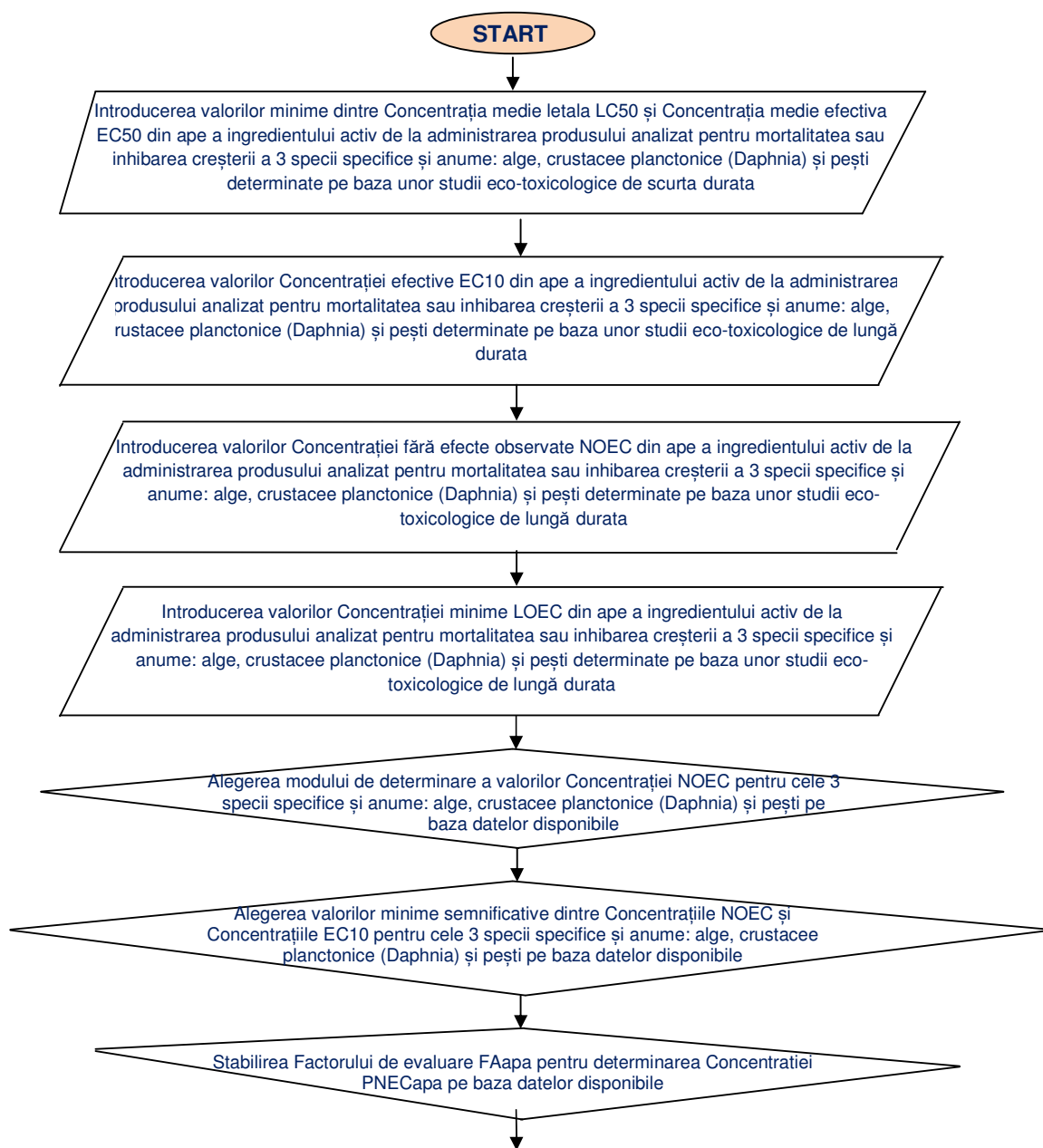
predictibile fără efect, PNEC, pentru factorii de mediu: sol, apă, sedimente, necesar în evaluarea efectului asupra mediului a produselor medicinale veterinare.

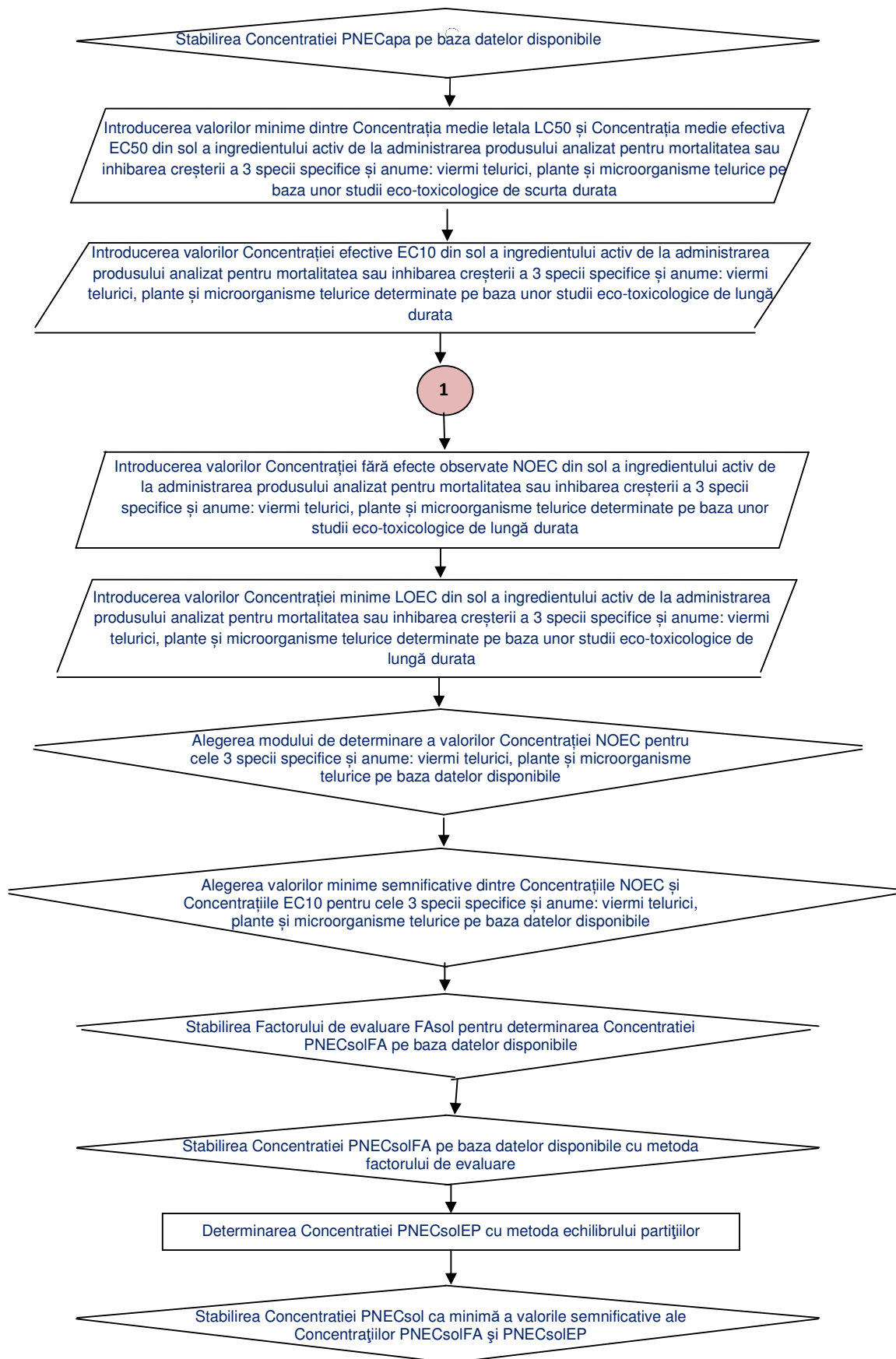
Este un instrument foarte util pentru specialiștii în evaluarea riscurilor de mediu pentru toate produsele medicinale veterinare, conform ghidurilor VICH GL6 (Faza I) și GL38 (Faza II).



Evaluarea riscului pentru mediu este obligatorie pentru toate produsele noi în vederea obținerii autorizației de comercializare și vizează protecția mediului.

Evaluarea riscului pentru mediu, parte integrantă a autorizațiilor pentru produsele medicinale veterinare, interpretată conform ghidurilor VICH, prin intermediul softului creat, asigură predictibilitatea și transparența rezultatelor obținute.





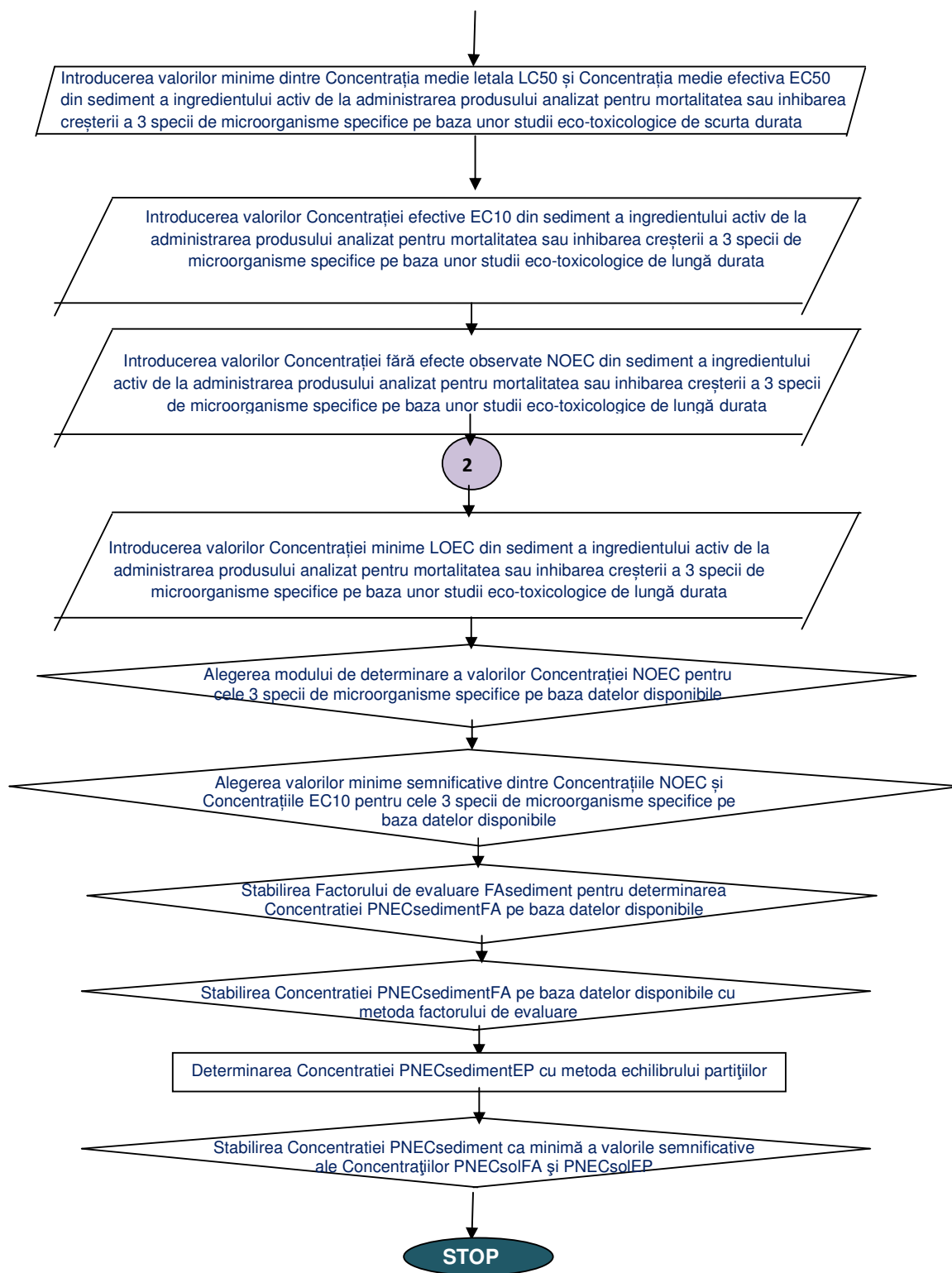


Figura 1. Aspect din soft-ul pentru $PNEC_{apa}$ [mg/dmc], concentrația predictibilă fără efect în apa a ingredientului activ la administrarea produsului analizat

$$\begin{aligned}
 \text{PNEC}_{\text{apa}} := & \frac{\min(\text{LEC50}_{\text{alge}}, \text{LEC50}_{\text{crustacee}}, \text{LEC50}_{\text{pesti}})}{\text{FA}_{\text{apa}}} \text{ if } (\text{LEC50}_{\text{alge}} \neq 0 \wedge \text{LEC50}_{\text{crustacee}} \neq 0 \wedge \text{LEC50}_{\text{pesti}} \neq 0) \wedge (\text{NOEC}_{\text{al}} = 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{cr}} = 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{pe}} = 0) \\
 & \frac{\text{NOEC}_{\text{al}}}{\text{FA}_{\text{apa}}} \text{ if } \text{NOEC}_{\text{al}} \neq 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{cr}} = 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{pe}} = 0 \\
 & \frac{\text{NOEC}_{\text{cr}}}{\text{FA}_{\text{apa}}} \text{ if } \text{NOEC}_{\text{al}} = 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{cr}} \neq 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{pe}} = 0 \\
 & \frac{\text{NOEC}_{\text{pe}}}{\text{FA}_{\text{apa}}} \text{ if } \text{NOEC}_{\text{al}} = 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{cr}} = 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{pe}} \neq 0 \\
 & \frac{\min(\text{NOEC}_{\text{al}}, \text{NOEC}_{\text{cr}})}{\text{FA}_{\text{apa}}} \text{ if } \text{NOEC}_{\text{al}} \neq 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{cr}} \neq 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{pe}} = 0 \\
 & \frac{\min(\text{NOEC}_{\text{al}}, \text{NOEC}_{\text{pe}})}{\text{FA}_{\text{apa}}} \text{ if } \text{NOEC}_{\text{al}} \neq 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{cr}} = 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{pe}} \neq 0 \\
 & \frac{\min(\text{NOEC}_{\text{cr}}, \text{NOEC}_{\text{pe}})}{\text{FA}_{\text{apa}}} \text{ if } \text{NOEC}_{\text{al}} = 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{cr}} \neq 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{pe}} \neq 0 \\
 & \frac{\min(\text{NOEC}_{\text{al}}, \text{NOEC}_{\text{cr}}, \text{NOEC}_{\text{pe}})}{\text{FA}_{\text{apa}}} \text{ if } \text{NOEC}_{\text{al}} \neq 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{cr}} \neq 0 \wedge \text{NOEC}_{\text{pe}} \neq 0 \\
 & 0 \text{ otherwise}
 \end{aligned}$$

PNEC_{apa} = 0.1

De reținut că:

- algoritmul permite luarea în considerare a tuturor speciilor și categoriilor de animale, crescute și exploatate în sistem intensiv sau pe pășuni care sunt tratate concomitent cu un anumit produs a.u.v.;
- algoritmul permite luarea în considerare a unui anumit produs medicinal veterinar și a caracteristicilor de tratament (dozele zilnice ale ingredientului activ, durata tratamentului);
- algoritmul necesită calcul matricial, deoarece un produs medicinal veterinar poate fi administrat concomitent la mai multe specii și categorii de animale, crescute și exploatate în sistem intensiv sau pe pășuni;
- pentru creșterea animalelor în mod intensiv și pe pășuni sunt luate în considerare speciile și categoriile de animale menționate în ghid.
- speciile și categoriile de animale sunt elementele matriciale (speciile de animale se găsesc pe rând și categoriile de animale

pe coloane) utilizate pentru a exprima calculul matricial în soft.

Concluzii

Softul este un instrument foarte util pentru specialiști, în evaluarea riscurilor de mediu. Pe baza acestui algoritm de calcul, a fost dezvoltat un software original, specializat, interactiv care permite determinarea rapidă și convenabilă a concentrațiilor predictibile fără efect, PNEC, pentru factorii de mediu: sol, apă, sedimente, necesar în evaluarea efectului asupra mediului al produselor a.u.v.

Bibliografie

1. **Guide EMEA /CVMP/ERA/418282/2005-Rev1.**
2. [https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/How_to_Calculate_Predicted_No-Effect_Concentration_\(PNEC\).html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/How_to_Calculate_Predicted_No-Effect_Concentration_(PNEC).html)
3. **ECHA** – Guidance on information requirements and chemical safety assessment - Chapter R10. Characterisation of dose [concentration] – response for environment.
4. **ECHA** – Guidance on information requirements and chemical safety assessment - Chapter R16. Environmental Exposure Estimation.

produs natural, pe bază de extract din plante

RomEnteroprotect



- pastă orală de uz veterinar
- adjuvant în eteropatiile tineretului
- pentru toate speciile de animale

Ajutor esențial în menținerea sănătății intestinale!



ROMENTEROPROTECT ÎMPOTRIVA STĂRILOR DIAREICE

RomEnteroprotect, pastă orală de uz veterinar **pe bază de extract de plante**, recomandat pentru a fi administrat **în cazul stărilor diareice** ale tineretului mamifer, fără a exista limitare de specie.

Podusul este **ușor de administrat**, acesta fiind ambalat în **seringi dozimetrice**, fapt ce permite introducerea pastei, direct **pe la comisura buzelor**.

Produsul este **bine tolerat de animale**, nu dă reacții secundare și nu trebuie administrat des sau multe zile.

EFECTELE BENEFICE ALE PLANTELOR DIN COMPOZIȚIE

Afinele intervin în procesul de **neutralizare a infecțiilor intestinale**. Sunt **bogate în vitamine** ușor asimilabile (A, E, F, PP, B1, B2). Contribuie la regenerarea vaselor de sânge.

Salvia are rol în **atenuarea proceselor fermentative** din intestin. Are acțiune **antispastică, astringentă, antiseptică și bacteriostatică**.

Ghimbirul este **puternic antiinflamator, antioxidant și eupeptic**.

Caolinul formează un **strat protector pentru mucoasă**. Este **bun absorbant al toxinelor**.

Drojdia de bere este un supliment proteic, bogat în complexul vitaminic B. Are **aport energetic și rol în creșterea imunității**.



șos. Centurii, nr. 7, Voluntari, jud. Ilfov
Tel.: 021 350 31 09; www.romvac.ro



STUDIUL DE CAZ: TERAPIA CU IMUNOGLOBULINE Y (IGY) POLISPECIFICE LA UN PACIENT DIAGNOSTICAT CU CARCINOM SCUAMOS PELVILINGUAL, INFECTAT CU *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO-REZISTENT (MRSA)

CASE STUDY: POLYSPECIFIC IMMUNOGLOBULINE Y (IGY) THERAPY IN A PELVILINGUAL CARCINOMA DIAGNOSED PATIENT INFECTED WITH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO-RESISTANT

Teodora Supeanu¹, Alef Ibram¹, Camelia Apostol¹, Mariana Oporanu¹, Lucica Sima¹,
Viorica Chiurciu¹, C. Chiurciu¹

¹Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

constantinchiurciu@gmail.com

Cuvinte cheie: *Imunoglobulina Y, Ou hiperimun, Staphylococcus aureus, MRSA*

Key-words: *Immunoglobulin Y, Hyperimmune egg, Staphylococcus aureus, MRSA*

Rezumat

Infecțiile cauzate de agenți microbieni multidrog-rezistenți complică deseori abordarea terapeutică a pacienților cu afecțiuni primare grave, precum neoplasme, insuficiențe de organ sau boli cronice. Stafilococul auriu metilino-rezistent (MRSA) reprezintă una dintre principalele bacterii nosocomiale cu răspândire globală pentru care în momentul de față se fac eforturi importante în elaborarea de noi opțiuni terapeutice. Imunoglobulina aviară (IgY) este utilizată în diverse domenii ale medicinei umane și veterinare, având acțiune dovedită împotriva unei game largi de infecții microbiene (bacteriene, micotice, respectiv virale). În studiul de față, IgY a fost administrată cu succes la un pacient cu neoplasm suprainfectat cu MRSA, fiind încorporată în produse terapeutice pentru administrare pe cale generală și pentru aplicații locale.

Abstract

Infections caused by multidrug-resistant microbial agents often complicate the treatment of patients with severe primary conditions such as neoplasms, organ failure or chronic diseases. The methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the main global-spread nosocomial bacteria for which significant efforts are currently being made to develop new therapeutic options. Avian immunoglobulin (IgY) is used in various fields of human and veterinary medicine, with proven action against a wide range of microbial infections (bacterial, fungal and viral). In this study, IgY was successfully administered to a patient with MRSA-overloaded neoplasm, being incorporated into therapeutic products for general administration and local applications.

Introducere

Imunoglobulinele Y (IgY) reprezintă o alternativă la imunoglobulinele mamifere; acestea sunt aplicate cu succes în scop științific, de diagnostic, profilactic și terapeutic. Întrucât tehnologia bazată pe anticorpi mamiferi prezintă o serie de dezavantaje (purificarea anticorpilor din serul mamifer este

scăzută, laborioasă și costisitoare, stres crescut pentru animalele implicate), aceasta a fost tot mai mult înlocuită cu tehnologia bazată pe IgY.

Un avantaj major al utilizării păsărilor este faptul că imunoglobulinele aviare se recoltează direct din gălbenușul de ou în loc de ser, evitând astfel recoltarea de sânge.

Astăzi, găinile sunt recunoscute ca sursă

convenabilă și ieftină de anticorpi. S-a raportat că dintr-un ou hiperimun se obține o cantitate de imunoglobulină similară cu cea care poate fi obținută din 300 ml de sânge de iepure (Michael și col., 2010).

Utilizată ca alternativă la terapia cu antibiotice, IgY nu induce rezistență antimicrobiană și nu prezintă remanență la nivelul organismului tratat (Chiurciu și col., 2017). Pe mapamond, carcinomul scuamos localizat la nivelul capului și gâtului reprezintă a 8-a cea mai frecventă malignitate, fiind raportate aproximativ 500.000 de cazuri noi în fiecare an. Aceste tumori prezintă aspecte clinice variate, managementul lor implicând intervenție chirurgicală, radioterapie sau chimioterapie, individuale sau în combinație (Li și col., 2003).

Staphylococcus aureus se localizează în mod frecvent la nivel cutanat și intranasal (Guimarães și col., 2009).

Oamenii și animalele reprezintă un rezervor natural pentru stafilococi, inclusiv *Staphylococcus aureus*.

Astfel, colonizarea asimptomatică este mult mai frecventă decât infecția. Transmiterea stafilococilor are loc prin contact direct cu purtătorul, iar colonizarea poate fi tranzitorie sau persistentă (Chambers, 2001).

Staphylococcus aureus cuprinde o paletă largă de tulpini cu patogenitate variabilă (Tobias și col., 2012).

Stafilococii sunt în mod firesc sensibili la majoritatea antibioticelor (Guimarães și col., 2009), însă, utilizarea excesivă a antimicrobienelelor a dus la dezvoltarea de tulpini multi-drog rezistente.

Atunci când se raportează infecții cu

Staphylococcus aureus metilino-rezistent (MRSA), o investigație aprofundată dezvăluie de cele mai multe ori o spitalizare recentă, contactul cu o persoană care a fost spitalizată sau o terapie recentă cu antimicrobiene (Chambers, 2001).

Astfel, MRSA s-a răspândit masiv în întreaga lume, devenind unul dintre principalii agenți patogeni cauzatori de infecții nosocomiale.

Întrucât creează probleme importante în domeniul medical, dar și în cadrul comunităților fără legătură aparentă cu spitalizarea, diagnosticul său cât mai rapid și aplicarea unei terapii eficiente au devenit obiective prioritare pentru combaterea sa (Yamada și col., 2013; Klevens și col., 2007).

Întrucât antibioticele au un spectru de acțiune tot mai redus, se studiază abordarea unor variante alternative.

Imunizarea pasivă a pacienților suferinzi de infecții cu MRSA utilizând imunoglobuline aviare (IgY) cu specificitate față de acest patogen pare a fi o opțiune tot mai abordabilă în viitorul apropiat.

În cadrul **Departamentului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A.** se obțin imunoglobuline aviare cu specificitate pentru numeroși agenți infecțioși, respectiv bacterieni, micotici și virali, cu patogenitate atât pentru om, cât și pentru diverse specii animale (Chiurciu și col., 2017; Topilescu și col., 2014).

În studiul de față, utilizând oul hiperimun și produse derivate din acesta, s-a elaborat un protocol pentru terapia complementară a unui pacient cu carcinom scuamos infectat cu MRSA.

1. Materiale și metode

Oul hiperimun și produsele derivate din acesta

Toate procedurile aplicate în cadrul Departamentului sunt conforme cu Directiva UE 2010/63 privind manipularea animalelor utilizate în scopuri științifice.

Toate studiile efectuate sunt aprobate în prealabil de către Comitetul de Etică al Companiei Romvac S.A.

În cadrul Departamentului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A., se obțin ouă hiperimune și produse derivate din acesta, utilizate la pacienți umani, cât și din spectrul medicinei veterinare.

Produsele adresate pacienților umani sunt atât pentru administrare pe cale generală (notificate ca suplimente alimentare), cât și pentru aplicații topice (notificate ca produse dermato-cosmetice).

Pentru obținerea oului hiperimun sunt utilizate găini oăutoare (*Gallus domesticus*), clinic sănătoase, din rasa Rhode Island, în vârstă de 18-19 săptămâni și greutate corporală de aproximativ 2,6 kg.

Păsările sunt cazate în sistem de creștere în baterii, în hale cu factori de microclimat controlați. Păsările sunt hrănite cu o dietă standardizată, ecologică, pe principiul *ad libitum*.

Antigenele utilizate

Pentru imunizarea găinilor ouătoare se utilizează un inocul preparat din 18 tulpini patogene, bacteriene și micotice: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus grup B*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile-corpi bacterieni*, *Clostridium difficile-anatoxina*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*.

Imunizarea găinilor și colectarea ouălor

După prepararea inoculului, acesta se administrează intramuscular găinilor ouătoare conform unei scheme de imunizare: trei inoculări cu câte 0.5 ml antigen în două puncte separate în musculatura pieptului.

Colectarea ouălor se efectuează începând cu a 14-a zi de la cea de-a treia imunizare, când titrul anticorpilor din gălbenuș atinge un nivel maxim, iar concentrația acestora se încadrează între 100-250 mg IgY / ou.

Ouăle colectate se păstrează la 2-8 °C.

Elaborarea de produse pe bază de imunoglobuline Y polispecifice

Din ouăle hiperimune se prepară o gamă largă de produse de uz uman, care cuprinde soluții buvabile poli- și monovalente, pulberi liofilizate, spray-uri, soluții pentru aerosoli, comprimate, geluri, creme, suspensii, șampoane. Alte categorii de produse sunt în curs de cercetare.

Testarea calitativă și cantitativă a imunoglobulinelor Y din ouă și produsele derivate

Ouăle hiperimune recoltate se testează pentru specificitatea imunoglobulinelor conținute față de antigenele inoculate, prin testul ELISA *in house*, metodă indirectă.

Pentru produsele derivate, se testează concentrația totală de imunoglobuline Y prin testul ELISA *in house*, metodă directă.

Controlul microbiologic urmărește sterilitatea pentru soluția buvabilă cu IgY, respectiv contaminarea microbiologică pentru pulberea liofilizată, spray și cremă, conform normelor Farmacopeei Române, ediția a X-a.

Pacientul inclus în studiu

Pacientul M.B., în vârstă de 39 ani, sex masculin, suferă de carcinom scuamos pelvilingual drept, primele semne clinice fiind observate în ianuarie 2018.

Anterior consultului în cadrul Cabinetului de Medicină Complementară Imunoinstant, acesta a fost internat de două ori.

În cadrul primei internări, survenită la scurt timp după observarea neoplasmului de către pacient, acesta a suferit o intervenție chirurgicală la nivelul respectiv, radioterapie și chimioterapie.

În mai 2018, pacientul a fost reinternat acuzând disfație la solide, apariția unei formațiuni tumorale retroauriculare drepte ulcerate, supurate și a unei formațiuni tumorale cervicale anterioare, ambele vechi de aproximativ 1 lună și cu agravare progresivă.

Consultul clinic a relevat cicatrici latero-cervicale bilaterale postoperatorii, o formațiune tumorală retroauriculară dreaptă supurată, ulcerată, extinsă latero-cervical și parotidian drept (Figura 1), o formațiune tumorală cervicală anterioară cu zone de supurație, de consistență semidură, fixată la planurile profunde, dureroasă spontan și la palpare, cu fenomene inflamatorii supraadăugate, status post pelviglosectomie dreaptă, vestibul nazal liber, fose nazale libere, cavum liber, coroană

laringiană de aspect normal, corzi vocale mobile și spațiu glotic suficient.



Fig. 1. Formațiune tumorală retroauriculară dreaptă supurată, ulcerată, extinsă latero-cervical și parotidian drept

Ce-a de-a doua internare s-a desfășurat pe parcursul a 5 luni.

În septembrie 2018, a fost efectuat un examen radiologic la nivel pulmonar, concluziile acestuia fiind: fără imagini nodulare sugestive pentru determinări secundare pulmonare vizibile radiografic, cord cu dimensiuni în limite normale.

Analizele de laborator efectuate în aceeași lună au relevat următoarele modificări patologice:

- HCT \downarrow (34.1%);
- HGB \downarrow (11.2 g/dl);
- RBC \downarrow ($3.97 \times 10^6/\mu\text{l}$);
- Neutrofile \uparrow ($8.31 \times 10^3/\mu\text{l}$);
- Limfocite \downarrow ($1.14 \times 10^3/\mu\text{l}$);
- PLT \uparrow ($446 \times 10^3/\mu\text{l}$);
- VSH \uparrow (111 mm/oră);
- Fibrinogen \uparrow (750 mg/dl);
- Sodiu \uparrow (146.4 mmol/l).

În septembrie 2018, pacientul a suferit următoarele proceduri medicale:

- Incizie și drenaj formațiune tumorală

- cervicală anterioară;
- Traheotomie;
- Ancorare trahee la piele;
- Montare canulă cu balonaș.

S-a efectuat un examen bacteriologic din tumora ulcerată, în urma căruia s-a identificat infecția cu *Staphylococcus aureus*.

Evoluția postoperatorie este favorabilă sub tratament și se decide externarea pacientului în luna septembrie 2018, cu următoarele recomandări:

- Regim igienico-dietetic, respectiv schimbarea canulei o dată/zi, schimbarea și spălarea mandrenului de 5x/zi;
- Continuarea tratamentului oncologic.

Terapia cu imunoglobuline aviare

În octombrie 2018, pacientul este consultat în cadrul Cabinetului de Medicină Complementară Imunoinstant.

La momentul respectiv, tumora retroauriculară dreaptă ulcerată supura și nu prezenta tendință de vindecare, în ciuda terapiei cu antibiotice prescrisă la data externării.

Se recoltează probe din secreția purulentă, în vederea identificării agenților patogeni care împiedică vindecarea leziunii.

Este identificat *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent (MRSA).

În continuare, se efectuează testări ELISA în vederea stabilirii specificității imunoglobulinelor conținute de produsele derivate din oul hiperimun față de tulpina bacteriană identificată (Figura 2).

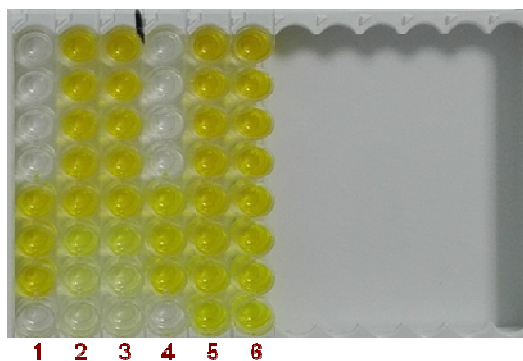


Fig. 2. Testarea specificității imunoglobulinei Y conținute de către pulberea liofilizată (stripurile 1-3) și soluția buvabilă sterilă (stripurile 4-6) administrate la pacient, față de stafilococul identificat în plagă

Medicul terapeut stabilește următorul protocol terapeutic:

Pentru administrare orală:

- Pulbere liofilizată obținută din ou hiperimun integral, cu un conținut de 100 mg IgY / doză, 2 doze / zi, administrate dimineața, după micul-dejun, timp de 4 luni. După ingerarea produsului, pacientul nu mai consumă nimic timp de 2 ore.
- IgY purificat, extract apos, 80 mL soluție sterilă cu un conținut total de 150 mg IgY, un flacon administrat seara, înainte de culcare, timp de 4 luni. După ingerarea soluției buvabile, pacientul nu consumă nimic până dimineața.
- Local: spray cu IgY purificat, extract apos, steril; pulverizări de 3 ori/zi, timp de 4 luni. Se aplică după toaleta locală. Zona nu se șterge (se așteaptă uscarea).
- După aplicarea spray-ului, se aplică o cremă pe bază de membrană cochilieră obținută din ou hiperimun, cu rol cicatrizant.

2. Rezultate și discuții

Pacientul a respectat întocmai protocolul terapeutic stabilit de către medic.

Acesta nu a semnalat efecte adverse în urma administrării produselor pe bază de imunoglobuline aviare.

Terapia cu IgY a fost complementară tratamentului oncologic, nu a interferat cu acesta, ci, dimpotrivă, a constituit un suport imunitar. Pacientul a resimțit ameliorarea efectelor secundare tratamentului oncologic.

În februarie 2019, plaga este complet vindecată (Figura 3).



Fig. 3. Pacientul vindecat clinic după 4 luni de terapie complementară cu imunoglobulină aviară (ianuarie 2019)

Pacientul efectuează o examinare computer-tomografică (CT), în urma căreia sunt identificate următoarele aspecte: regresie dimensională certă a maselor tumorale cervicale, cu menținerea unor leziuni nodulare supratrahostomă dreaptă, respectiv cu aspect infiltrativ supraclavicular drept; mici adenopatii cervicale bilaterale și mediastinale cu aspect global stabil dimensional și numeric comparativ cu examinările precedente; fără determinări secundare nodulare pulmonare bilaterale certe decelabile CT; în rest, examinarea CT nu a prezentat particularități notabile.

Pacientul repetă analizele microbiologice.

Se recoltează cruste din aria cutanată unde anterior a fost localizată tumora ulcerată. Rezultatul este negativ pentru floră microbiană patogenă.

3. Concluzii

Terapia cu imunoglobuline aviare (IgY) reprezintă o alternativă eficientă și sigură a tratamentului clasic cu substanțe antimicrobiene de sinteză, mai ales în cazul tulpinilor rezistente la moleculele deja consacrate, precum și în cazul pacienților cu diverse afecțiuni (neoplasm, leziuni extinse post-traumatice, insuficiență de organ, alte boli cronice) complicate de infecții bacteriene și/sau micotice.

Terapia cu IgY nu prezintă efecte adverse, însă are o singură contraindicație, aceea că nu se administrează pacienților cu alergii cunoscute la ou.

În cazul de față, imunoglobulinele aviare au constituit suport imunitar, ameliorând efectele adverse cauzate de tratamentul oncologic.

În plus, infecția cu MRSA a fost vindecată, fapt confirmat de analizele microbiologice efectuate după încheierea terapiei.

Bibliografie

1. **CHAMBERS, H.F. (2001).** The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 178-182.
2. **CHIURCIU, C., TABLICĂ M., SIMA L., SUPEANU T., OPORANU M. (2017).** Time Evolution of Immunoglobulin Y (IgY) Titer in the Egg Yolk Harvested from Hens after Three Inoculations with Multiple Antigens.

- Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine*, **LXIII** (2), 38-44.
3. **CHIURCIU, C., CHIURCIU, V., OPORANU, M., PĂTRAȘCU, I.V., MIHAI, I., TABLIĂ, M., CRISTINA, R.T. (2017).** PC2 Ovotransferrin: Characterization and Alternative Immunotherapeutic Activity. *Ev-Based Complement Alternat Med*. Volume 2017, Article ID 8671271, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/8671271>
 4. **TOPILESCU, G., CHIURCIU, V., PATRASCU, I.V. CHIURCIU, C., CRISTINA, R.T. (2014).** Growth Inhibition of antibiotic resistant bacteria by neutralizing IgY antibodies, *J. Biotechnol.*, vol. 185, Suppl., pp. S91–S92.
 5. **GUIMARÃES, M.C.C., GOMES AMARAL, LÍVIA, BATISTA AZEVEDO L., RANGEL, SILVA, I.V., GOMES, MATTA, C., DE REZENDE, F., MATTA, M.F. (2009).** Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **57**, 377–382.
 6. **MONINA KLEVENS R., MORRISON M. A., NADLE, J, PETIT, S., GERSHMAN, K., RAY, S., HARRISON, L.H., LYNFIELD, R., DUMYATI, G., TOWNES, J.M., CRAIG, A.S., ZELL, E.R., FOSHEIM, G.E., MCDUGAL, L.K., CAREY, R.B. FRIDKIN, S.K. (2007).** Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *The Journal of the American Medical Association*, **298** (15), 1763-1771.
 7. **LI, W, THOMPSON, C.H., O'BRIEN, C.J., MCNEIL E.B., SCOLYER, R.A., COSSART, Y.E., VENESS, M.J., WALKER, D.M., MORGAN G.J., ROSE. B.R. (2003).** Human Papillomavirus Positivity Predicts Favourable Outcome for Squamous Carcinoma of the Tonsil. *International Journal of Cancer*, **106**, 553–558.
 8. **MEENATCHISUNDARAM, M.A., PARAMESWARI, S., SUBBRAJ, G., SELVAKUMARAN, T., RAMALINGAM, R. (2010).** Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies, *Indian Journal of Science and Technology*, **3**(4), 468-474.
 9. **TOBIAS, F.L., NUNES GARCIA, L.N., KANASHIRO, M.M., MEDINA-ACOSTA, E., BROM-DE-LUNA, J.G., COSTA DE ALMEIDA, C.M., AZEVEDO JUNIOR, R.R., LEMOS, M., VIEIRA-DA-MOTTA, O. (2012).** Growth Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by Neutralizing IgY Antibodies from Ostrich Egg Yolk. *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**, 544-551.
 10. **YAMADA, K., WANCHUN, J., OHKURA, T., MURAI, A., HAYAKAWA, R., KINOSHITA, K., MIZUTANI, M., OKAMOTO, A., NAMIKAWA, T., OHTA, M. (2013).** Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using a Specific Anti-PBP2a Chicken IgY Antibody. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **66**, 103-108.



PROBIOTIC PENTRU STABILIZAREA FLOREI INTESTINALE

BIOENTEROM

DE NĂDEJDE ÎNCĂ DIN PRIMELE ZILE DE VIAȚĂ!

NOU



Se administrează
din primele zile de viață ale speciilor țintă:
păsări (găini, curci, rațe, găște, porumbei), viței, miei, iezi, porci, câini și pisici.

Conține **germeni de *Enterococcus faecium*** tulpina NCIMB 11181, cultivați în zer deproteinizat cu un conținut minim de 1 x 10⁸ UFC/ml.

Sporește numărul de microorganisme benefice din intestinul animalelor, fiind
indicat pentru tineretul animal care nu prezintă o floră intestinală foarte bine
dezvoltată în primele zile de viață.

Stimulează creșterea unei microflore benefice pentru animale, încă din primele
zile de viață ale acestora care nu sunt capabile să se apere singure **împotriva unor
specii de bacterii patogene ca *E.coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas* și
Clostridium.**

Romvac
TRADUCERE ȘI INOVATIE ÎN SĂNĂTATEA ANIMALOȘOR

www.romvac.ro
romvac@romvac.ro
+4 031.824.30.51

OBȚINEREA, PURIFICAREA ANTICORPILOR (IgY) DIN GĂLBENUȘ DE OU HIPERIMUN CU ACTIVITATE ÎMPOTRIVA UNOR AGENȚI VIRALI PATOGENI LA OM ȘI FORMULAREA UNOR PRODUSE TERAPEUTICE

OBTAINING, PURIFICATION OF ANTIBODIES (IGY) FROM HYPERIMMUNE EGG YOLK WITH ACTIVITY AGAINST VIRAL PATHOGENS AND FORMULATION OF SOME THERAPEUTIC PRODUCTS

Teodora Supeanu¹, Mariana Oporanu¹, Lucica Sima¹, Viorica Chiurciu¹, C. Chiurciu¹

¹ Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

constantinchiurciu@gmail.com

Cuvinte cheie: *Imunoglobulina Y, Ou hiperimun, Virusul Herpes simplex tip I, Papilomavirus uman (HPV), Virusul varicelo-zosterian, Rotavirus*

Key-words: *Immunoglobulin Y, Hyperimmune egg, Herpes simplex type I virus, Human papillomavirus (HPV), Varicella zoster virus, Rotavirus*

Rezumat

În ultimele decenii, tehnologia pe bază de anticorpi aviari a câștigat tot mai mult teren în domeniul medical, înlocuind cu succes imunoglobulinele obținute de la mamifere. Anticorpul Y (IgY) se extrage din gălbenușul ouălor hiperimune recoltate de la găini (*Gallus domesticus*) imunizate cu diferite antigene și au aplicabilitate deja dovedită în diferite arii medicale precum fabricarea de kituri de diagnostic și elaborarea protocoalelor de terapie pasivă a diferitelor afecțiuni de natură infecțioasă. Este binecunoscut faptul că terapia pe bază de imunoglobuline aviare este eficientă în prevenția și tratamentul unor afecțiuni bacteriene la om și animale, în special cu localizare gastro-intestinală. În studiul de față s-au urmărit obținerea de imunoglobuline aviare cu activitate antivirală, extracția și purificarea acestora, precum și formularea unor produse terapeutice în vederea administrării la pacienți umani cu infecții clinic simptomatice date de Rotavirus, Virusul Herpes Simplex tip 1, Papilomavirusul uman sau Virusul varicelo-zosterian. Acestea sunt virusuri înalt patogene, responsabile de numeroase cazuri de morbiditate și mortalitate, pentru care, în momentul de față, opțiunile terapeutice sunt destul de limitate.

Abstract

In recent decades, avian antibody technology has become more popular in the medical field, successfully replacing the immunoglobulins obtained from mammals. Y antibodies (IgY) are extracted from the yolk of hyperimmune eggs harvested from hens (*Gallus domesticus*) immunized with different antigens and have an already proven applicability in various medical fields such as the manufacture of diagnostic kits and the development of passive antibody therapy protocols for various infectious diseases. It is well known that avian immunoglobulin therapy is effective in the prevention and treatment of bacterial diseases in humans and animals, especially with gastrointestinal localization. In the present study, the production of avian immunoglobulins with antiviral activity, their extraction and purification, as well as the formulation of therapeutic products for administration to human patients exhibiting clinically symptomatic infections with rotavirus, Herpes simplex virus type 1, human papillomavirus or Varicella zoster virus. These are highly pathogenic viruses, leading to significant human morbidity and mortality, for which the therapeutic options are currently quite limited.

Introducere

Imunoglobulina Y (IgY) reprezintă corespondentul funcțional al imunoglobulinei G

de la mamifere (Guevarra și col., 2012). IgY este principalul anticorp (Munhoz și col., 2014) sintetizat de către organismul reptilelor,

păsărilor, amfibienilor (Guevarra și col., 2012), precum și al unor specii de pești (Munhoz și col., 2014).

La păsări, aceasta se eliberează în circuitul sanguin (Munhoz și col., 2014), de unde se depozitează în gălbenușul de ou pentru a asigura embrionului imunitatea pasivă.

Este utilizată în diferite arii din domeniul medical, precum diagnosticul unor afecțiuni și inducerea imunității pasive.

Tehnologia IgY prezintă o serie de avantaje comparativ cu tehnicile de obținere și aplicare a IgG de la mamifere, precum costuri mult mai reduse de obținere, asigurarea bunăstării animalelor utilizate și lipsa reactivității față de factorul reumatoid (Guevarra și col., 2012).

Virusul Herpes simplex tip I (HSV-1) provoacă infecții cu localizare oro-facială la pacienții umani din întreaga lume.

Este un alpha-herpes virus cu neotropism și ciclu de replicare rapid. HSV-1 poate fi o cauză majoră de morbiditate și mortalitate; răspândirea virusului este întreținută de existența purtătorilor clinic sănătoși în întreaga lume. Deși principala manifestare clinică este infecția orofacială, HSV-1 poate provoca infecții genitale, cutanate, oculare și o serie de boli rare precum encefalită herpetică sau hepatită herpetică.

Deși în ultimele decenii au fost descoperite și eliberate pe piață mai multe substanțe antivirale cu activitate antiherpetică, există totuși riscul dezvoltării tulpinilor rezistente la medicamente, iar un vaccin eficient împotriva acestui virus nu a fost încă descoperit (Arduino și col., 2008).

Papilomavirusurile umane (HPV) sunt întrunite într-o familie ce cuprinde mai bine de 130 tulpini cu patogenitate la nivel cutanat și mucos. Cele cu localizare la nivelul mucoaselor pot provoca neoplazii cervicale la femei precum și veruci anogenitale la copii și adulți de ambele sexe (Mammas și col., 2009).

Infecția cu papilomavirus uman reprezintă cea mai comună infecție virală cu transmitere sexuală la nivel mondial.

Papilomavirusul uman este unul dintre cei mai puternici carcinogeni, fiind implicat în cancer cu diverse localizări. Acesta infectează exclusiv celulele epiteliale.

Deși există un vaccin eficient împotriva principalelor tulpini patogene ce declanșează cancerul de col uterin, succesul unei ample campanii de vaccinare ar fi evident de-abia peste câteva zeci de ani (Crosbie și col., 2013).

Virusul varicelo-zosterian, cunoscut și ca virusul herpes uman de tip 3, infectează în mod natural doar oamenii, având ca țintă limfocitele T, celulele epiteliale și cele gliale. Infecția primară provoacă varicelă (Gershon și col., 2015), cu replicarea virală în diverse organe, majoritar la nivel cutanat unde au loc și manifestările clinice majore (Baird și col., 2013). În timpul evoluției varicelei virusul se cantonează la nivelul ganglionilor neuronalii, unde rămâne într-o stare latentă.

Pe măsură ce imunitatea scade odată cu vârsta sau în cazul pacienților imunosupresați, virusul se reactivează și declanșează zona zoster (Gershon și col., 2015).

Aceasta se manifestă prin erupție cutanată și durere locală, care deseori se poate croniciza (Baird și col., 2013).

Rotavirusul uman este un organism ubicvitar, responsabil de gastroenterită severă manifestată prin diaree, vomă și deshidratare în formă gravă la copii mai mici de 5 ani (Tagbo și col., 2014; Ramig, 2004), fiind unul dintre principalii agenți cauzatori de mortalitate la pacienții din această categorie de vârstă, în special în țările în curs de dezvoltare (Diez-Valcarce și col., 2019).

Se răspândește de la persoană la persoană, în special pe cale fecalo-orală (Anderson și Weber, 2004).

Rotavirusul infectează în mod preferențial enterocitele mature de la nivelul intestinului subțire superior, însă mecanismul patogenetic nu este cunoscut cu exactitate (Vega și col., 2011).

În cadrul **Departamentului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A.** se obțin imunoglobuline aviare cu specificitate pentru o largă paletă de agenți infecțioși, bacterieni, micotici și virali, cu patogenitate atât pentru om, cât și pe segmentul medicinei veterinare (Chiurciu și col., 2017; Topilescu și col., 2014).

În studiul de față, utilizând tulpini virale standard, s-au obținut imunoglobuline aviare de tip Y cu specificitate față de 4 virusuri patogene la om. Imunoglobulinele obținute au fost utilizate pentru elaborarea de produse terapeutice în vederea administrării pe cale orală, respectiv pentru aplicații cutanate.

1. Material și metodă

Animalele incluse în studiu

Studiul a fost realizat în cadrul Laboratorului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A.

Toate procedurile au fost conforme cu Directiva UE 2010/63 privind manipularea animalelor utilizate în scopuri științifice. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Companiei Romvac S.A.

Au fost incluse în studiu 4 loturi a câte 10 găini oăutoare (*Gallus domesticus*), clinic sănătoase, din rasa Rhode Island, în vârstă de 18 săptămâni și greutate corporală de 2,5 kg.

Păsările au fost cazate în sistemul de creștere în baterii, în spații cu temperatură, umiditate, zgomot și lumină controlate. Păsările au fost hrănite cu o dietă standardizată, ecologică, pe principiul *ad libitum*.

Antigenele utilizate

S-au achiziționat tulpini virale standard, respectiv Virusul Herpes Simplex tip 1 (HSV 1), tulpina Oka vie, atenuată a Virusului varicelo-zosterian, Rotavirus și Papilomavirus uman (HPV) 9-valent - tipurile 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 și 58. În cadrul laboratorului de microbiologie, aceste tulpini au fost utilizate pentru prepararea a patru antigene separate.

Imunizarea găinilor și colectarea ouălor

Fiecărui lot i s-a administrat câte unul dintre cele 4 imunogene preparate. S-au efectuat trei inoculări pe cale intramusculară cu câte 0.5 ml antigen în două puncte separate în musculatura pieptului. Colectarea ouălor s-a realizat începând cu a 14-a zi de la cea de-a treia imunizare, când titrul anticorpilor din gălbenuș atinge un nivel maxim. În plus, se consideră momentul optim de colectare al ouălor atunci când din gălbenuș se pot extrage 100-250 mg IgY/ou.

Ouăle colectate sunt păstrate la 2-8°C.

Elaborarea de produse pe bază de imunoglobuline Y cu specificitate antivirală

Ouăle hiperimune recoltate de la cele 4 loturi de găini au fost depozitate în condiții de refrigerare, în funcție de cele 4 antigene folosite la inoculare.

Din cele 4 categorii de ouă hiperimune s-au preparat produse cu valoare terapeutică, astfel:

- Ouăle cu IgY anti-HSV-1 au fost utilizate pentru prepararea a două categorii de produse. O parte dintre ele a fost utilizată pentru extragerea de imunoglobuline prin metode fizice, obținându-se IgY înalt purificat în soluție apoasă, sterilă. Soluția respectivă a fost repartizată în flacoane cu o compoziție de 80 mL pentru o singură utilizare zilnică. Pentru obținerea de unguent pentru aplicații locale s-au utilizat ouă integrale (gălbenuș+albuș), din care s-a obținut o pulbere liofilizată. Conform unei rețete standardizate Romvac, pulberea a fost utilizată pentru prepararea unui unguent cu aplicare pe leziunile specifice de la nivel oro-facial.
- Ouăle cu IgY anti-HPV au fost utilizate pentru prepararea unei soluții apoase, sterile cu IgY, similar celei de la punctul anterior.
- Ouăle cu IgY anti-Virusul varicelo-zosterian, au fost utilizate în mod similar cu cele cu IgY anti-HSV-1.
- Ouăle cu IgY anti-Rotavirus au fost utilizate pentru prepararea unei soluții apoase, sterile cu IgY, similar celor de la punctele anterioare. Însă, ținând cont de categoria de pacienți-țintă pentru care a fost

concepută, respectiv copii mai mici de 5 ani, soluția a fost concentrată și repartizată în flacoane de 2 ml pentru o unică utilizare.

Evaluarea calitativă și cantitativă a anticorpilor IgY din ouăle recoltate și produsele preparate

În cadrul Departamentului de Cercetare-Dezvoltare ouăle hiperimune recoltate se testează privind specificitatea imunoglobulinelor conținute față de antigenele utilizate pentru imunizare prin testul ELISA indirect, test conceput *in house*.

În plus, se determină și concentrația de IgY totală prin testul ELISA direct, test conceput de asemenea *in house*.

Pentru produsele obținute din ouăle hiperimune, se testează concentrația de imunoglobuline Y totale prin aceeași tehnică, respectiv concentrația de proteină totală prin tehnica Kjeldahl.

Controlul microbiologic urmărește sterilitatea pentru soluțiile înalt purificate cu IgY, respectiv contaminarea pentru unguente, conform normelor Farmacopeei Române, ediția a X-a.

2. Rezultate și discuții

Ouăle hiperimune recoltate la 2 săptămâni de la ultima inoculare se testează prin testul ELISA indirect privind specificitatea față de tulpinile utilizate la prepararea imunogenelor (Figura 1).

La citirea spectrofotometrică la DO_{450nm} se obțin valori numerice mari, descrescătoare pe măsura creșterii diluțiilor probei cu IgY testată pe placă ELISA (Figurile 2, 3, 4, 5).

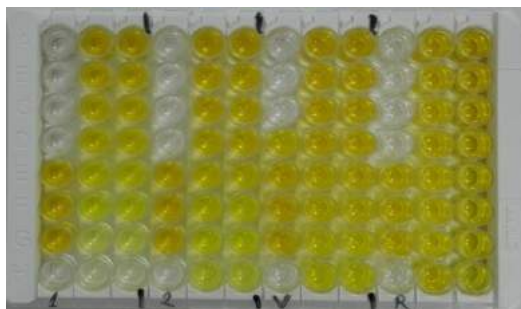


Fig. 1. Testarea specificității probelor cu IgY extras din ouă hiperimune recoltate de la găini imunizate cu virus Herpes simplex tip 1 (1), papilomavirus uman (HPV) 9-valent (2), virus varicelo-zosterian (V) și rotavirus uman (R)

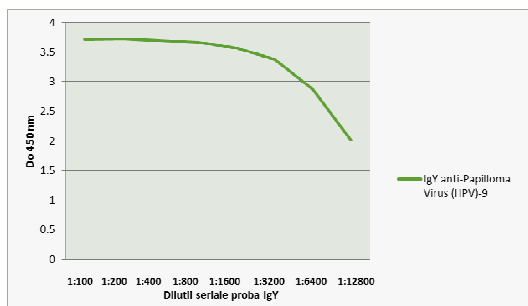


Fig. 2. Evoluția valorilor numerice la DO_{450nm} în funcție de diluțiile probei cu IgY anti-Papilomavirus, testată calitativ prin metoda ELISA direct

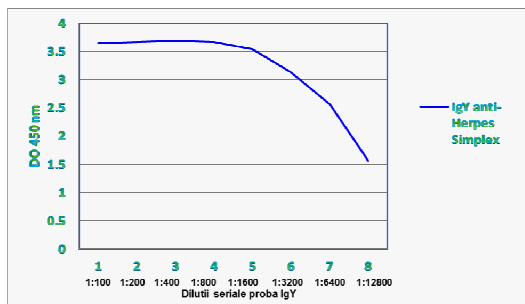


Fig. 3. Evoluția valorilor numerice la DO_{450nm} în funcție de diluțiile probei cu IgY anti-Herpes Virus tip 1 testată calitativ prin metoda ELISA direct

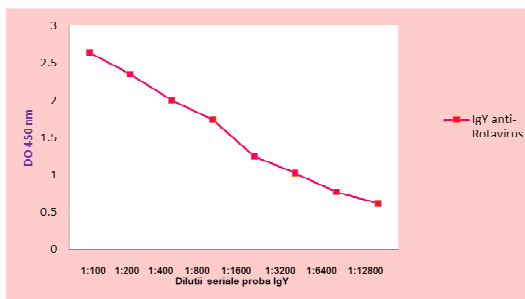


Fig. 4. Evoluția valorilor numerice la DO_{450nm} în funcție de diluțiile probei cu IgY anti-Rotavirus testată calitativ prin metoda ELISA direct



Fig. 5. Evoluția valorilor numerice la DO_{450nm} în funcție de diluțiile probei cu IgY anti-Virusul varicelo-zosterian testată calitativ prin metoda ELISA direct

S-au preparat produse terapeutice, conținând imunoglobulină Y purificată sub formă de soluții apoase, sterile, în vederea administrării pe cale orală, respectiv unguente pe bază de ou integral (gălbenuș+albuș) liofilizat în vederea aplicării locale, în jurul leziunilor.

Produsele sub formă de soluție sterilă s-au testat prin testul ELISA direct pentru determinarea concentrației în IgY, respectiv prin tehnica Kjeldahl pentru determinarea concentrației în proteină totală.

Valorile obținute pentru IgY sunt cuprinse între 57,12mg/100 mL – 540,20 mg/100mL și se încadrează în intervalul de referință de 50 - 250 mg IgY/100 ml (Figura 6).

Valorile proteinei totale a fost cuprinse între 222,27 – 466,84 mg/100 ml, cu încadrare în intervalul de referință 200 - 500 mg/mL, conform normelor interne (Figura 7).

Produsele sub formă de unguente s-au testat prin testul ELISA direct pentru determinarea concentrației în IgY.

Valorile obținute pentru IgY sunt cuprinse între 122,23 mg/100 g – 235,79 mg/100g și se încadrează în intervalul de referință de 50 - 250 mg IgY/100 g.

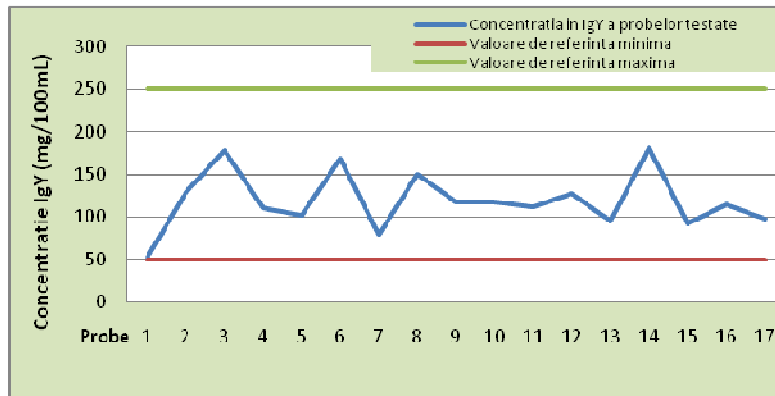


Fig. 6. Variația concentrației de IgY totală din produsele obținute

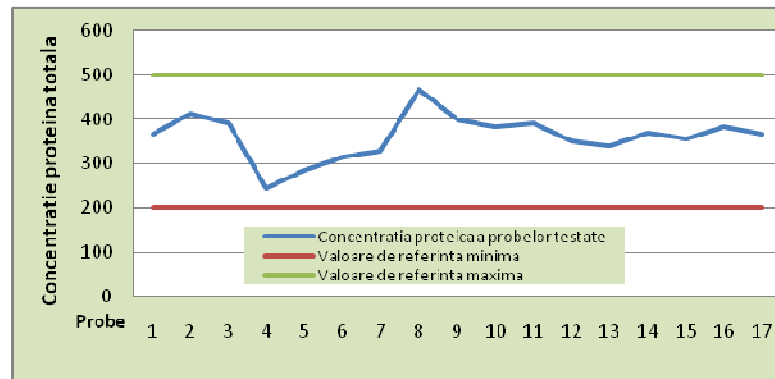


Fig. 7. Variația concentrației de proteină totală din produsele pe bază de IgY

3. Concluzii

S-au preparat antigene monovalente utilizând tulpini virale standard, cu care s-au imunizat 4 loturi de găini ouătoare.

Din ouăle hiperimune recoltate, s-au izolat și purificat proteine imunologic active din gălbenuș (imunoglobulina Y), pe baza cărora s-au preparat produse sub formă de soluții apoase, sterile pentru administrare pe cale orală. În plus, din ouăle cu IgY specific, anti-Herpes Simplex tip I, respectiv anti-Virusul Varicelo-Zosterian, s-au preparat unguente pentru aplicații locale.

Produsele terapeutice s-au administrat pe loturi de pacienți umani. Evoluția clinică a acestora a fost una favorabilă.

Urmează a fi elaborate studii pentru a identifica impactul imunoglobulinelor specifice

anti-virale asupra organismului pacientului luat în studiu, respectiv evoluția histo-patologică a leziunilor și modificările la nivel celular și umoral din intimitatea sistemului imunitar.

Bibliografie

1. **ANDERSON, E.J., WEBER, S.G. (2004).** Rotavirus infection in adults, *The Lancet Infectious Diseases*, **4**, 91-99.
2. **ARDUINO, P.G., PORTER, S.R. (2008).** Herpes Simplex Virus Type 1 Infection: Overview on Relevant Clinico-pathological Features. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **37**, 107-121.
3. **BAIRD, N.L., YU, X., COHRS, R.J., GILDEN, D. (2013).** Varicella Zoster Virus (VZV)-Human Neuron Interaction, *Viruses*, **5**, 2106-2115.
4. **CROSBIE E.J., EINSTEIN, M.H., FRANCESCHI, S., KITCHENER, H.C. (2013).** Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, **382**, 889-99.

5. DIEZ-VALCARCE, M., LOPEZ, M.R. LOPEZ, B., MORALES, O., SAGASTUME, M., CADENA, L., KAYDOS-DANIELS, S., JARQUIN, C., MCCRACKEN, J.P., BRYAN, J.P., VINJÉ, J. (2019). Prevalence and genetic diversity of viral gastroenteritis viruses in children younger than 5 years of age in Guatemala, 2014–2015. *Journal of Clinical Virology*, **114**, 6-11.
6. GUEVARRA, L.A., LEAÑO, M.B. DALMACIO, L.M., FE YU, B.G., DESTURA, R.V., LIBRANDA-RAMIREZ, B., ESTACIO, R.C. (2012). Production of Immunoglobulin Y (IgY) against Synthetic Peptide Analogs of the Immunogenic Epitopes of the Hepatitis B Surface Antigen. *Acta medica Philippina*, **46** (1), 14-21.
7. GERSHON, A.A., BREUER, J., J.I. COHEN, COHRS, R.J., GERSHON, M.D., GILDEN, D., GROSE, C., HAMBLETON, SOPHIE., KENNEDY, P.G.E., OXMAN, M.N., SEWARD, J. F., YAMANISHI, K., (2015). Varicella zoster virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, **1**:15016, doi: 10.1038/nrdp.2015.16
8. MAMMAS, I.N., SOURVINOS, G., SPANDIDOS, D.A., (2009). Human papilloma virus (HPV) infection in children and adolescents. *European Journal of Pediatrics*, **168**, 267–273.
9. SILVEIRA MUNHOZ, L., D'ÁVILA VARGAS, G., FISCHER, G., DE LIMA, M., ESTEVES, P.A., DE OLIVEIRA HÜBNERI, S. (2014). Avian IgY Antibodies: Characteristics and Applications in Immunodiagnostic. *Ciência Rural*, **44**(1), 153-160.
10. RAMIG, R.F. (2004). Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *Journal of Virology*, **78** (19), 10213–10220.
11. TAGBO, B.N., MWENDA, J.M., ARMAH, G., BIDIKE, E.O., OKAFOR, U.H., OGUONU, T., OZUMBA, U.C., EKE, C.B., CHUKWUBUIKE, C., EDELU, B.O., EZEONWU, B.U., AMADI, O., OKEKE, I.B., NNANI, O.R., ANI, O.S., UGWUEZEONU, I., BENJAMIN-PUJAH, C., UMEZINNE, N., UDE, N., NWODO, C., EZEONYEBUCHI, M.C., UMESIE, E., OKAFOR, V., OGUDE, N., OSAROGBORUM, V.O., EZEBILO, S.K., GOITOM, W.G., ABANIDA, E.A., ELEMUWA, C., NWAGBO, D.F. (2014). Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children Younger than 5 Years in Enugu, South East, Nigeria. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **33** (1), Suppl. 1, 19-22.
12. VEGA, C., BOK, M., CHACANA, P., SAIF, L., FERNANDEZ, F., PARREÑO, V (2011). Egg Yolk IgY: Protection against Rotavirus induced Diarrhea and Modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **142** (3-4), 156–169.
13. CHIURCIU, C., CHIURCIU, V., OPORANU, M., PĂTRAȘCU, I.V., MIHAI, I., TABLICĂ, M., CRISTINA, R.T. (2017). PC2 Ovotransferrin: Characterization and Alternative Immunotherapeutic Activity. *Ev-Based Complement Alternat Med*. Volume 2017, Article ID 8671271, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/8671271>
14. TOPILESCU, G., CHIURCIU, V., PATRASCU, I.V. CHIURCIU, C., CRISTINA, R.T. (2014). Growth Inhibition of antibiotic resistant bacteria by neutralizing IgY antibodies, *J. Biotechnol.*, vol. 185, Suppl., pp. S91–S92.

Herbal - MycoDerm este adjuvant:
- în dermatita atopică
- în combaterea inflamației și a pruritului
- în eczeme uscate
- în alergii de contact
- în micoze (*Mycosporum* și *Candida*)
- în arsuri de gradul unu și doi.



O soluție naturală!



Herbal - MycoDerm

antiinflamator și antimicotic



adjuvant în dermatite pruriginoase și arsuri,
pentru canide și ecvidee

Acțiunea benefică a produsului se bazează pe acțiunea cumulativă a compușilor chimici din fiecare extract de plante.

În compoziția produsului Herbal - MycoDerm, se regăsește un amestec de tinctură de propolis, aloe vera, uleiuri volatile (salvie, tămâie, lavandă), ulei de măsline și provitamina B5.

Creat inițial pentru canide și cabaline, speciile nu sunt restrictive, cu excepția felidelor, care nu suportă bine tratamentele fitoterapice.

Se administrează zilnic, 2 - 3 aplicări în strat subțire, până la dispariția semnelor clinice (cu excepția micozelor, unde tratamentul trebuie continuat cca. 7 - 10 zile).

Romvac
Company

Sos. Centurii, nr. 7, 077190, Voluntari, jud. Ilfov
Tel.: 031 / 824 30 50, 031 / 824 30 51
Fax: 031 350 31 10
e-mail: romvac@romvac.ro, www.romvac.ro

EVALUAREA RĂSPUNSULUI IMUN AL GĂNILOR IMUNIZATE CU UN COMPLEX DE ANTIGENE PRIN TESTAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A IMUNOGLOBULINELOR Y OBȚINUTE DIN OUĂ HIPERIMUNE PROVENITE DE LA ACESTEA

IMMUNE ANALYSIS ASSESMENT OF IMUNIZED HENS WITH A COMPLEX OF ANTIGENES BY QUALITATIVE AND QUANTITATIVE TESTING OF IMMUNOGLOBULINES OBTAINED FROM THEIR HIPERIMUNE EGGS

Mariana Oporanu¹, Mădălina Tablică¹, Teodora Supeanu¹, Lucica Sima¹,
Viorica Chiurciu¹, C. Chiurciu¹

¹Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

constantinchiurciu@gmail.com

Cuvinte cheie: Imunoglobulina Y, ou hiperimun, răspuns imun, titru, inoculare, antigen multiplu, test ELISA
Key words: Immunoglobulin Y, immune response, hyper immune eggs, titer, inoculation, multiple antigens, ELISA tests

Rezumat

Imunoglobulinele Y (IgY) reprezintă principalul anticorp sintetizat de către organismul păsărilor, reptilelor, amfibienilor și unor specii de pești. În ultimele decenii, IgY se bucură de o atenție tot mai mare din partea specialiștilor din domeniul medical. Acesta prezintă o serie de diferențe structurale față de IgG de la mamifere și multiple beneficii comparativ cu anticorpii mamiferi. IgY prezintă aplicabilitate în diagnosticul, prevenția și terapia unor afecțiuni de natură infecțioasă date de bacterii, fungi sau virusuri patogene. Studiul de față a avut ca scop evaluarea titrului de anticorpi specifici față de 18 antigene pe o perioadă de 13 luni. Pe întreaga perioadă a experimentului s-au efectuat testări de tip ELISA pentru determinarea concentrației imunoglobulinelor totale din ouăle hiperimune obținute și a specificității IgY-ului extras față de fiecare antigen în parte.

Abstract

Immunoglobulins Y (IgY) are the main antibody synthesized by the body of birds, reptiles, amphibians and some fish species. In the last decades, IgY has been receiving a growing attention from medical specialists. It presents a number of structural differences from mammalian IgG and multiple benefits compared to mammalian antibodies. IgY can be applicable in the diagnosis, prevention and therapy of infectious diseases of pathogenic bacteria, fungi or viruses. This study aimed to evaluate the specific antibody titre against 18 antigens for a period of 13 months. Throughout the experiment, ELISA assays were performed to determine the total immunoglobulin concentration in the obtained hyperimmune eggs and the specificity of the extracted IgG to each antigen.

Introducere

Imunoglobulina Y (IgY) este principalul anticorp sintetizat de către găina ouătoare (*Gallus domesticus*). Este sintetizată în mod continuu, secretată în sânge și transferată în gălbenușul de ou, unde se acumulează (Young, 2007).

IgY reprezintă strămoșul evolutiv al IgG sintetizat de către mamifere și reprezintă principalul mecanism de apărare împotriva infecțiilor sistemice (de Paula, 2011).

Spre deosebire de nou-născuții de la mamifere, care după naștere beneficiază de anticorpii materni din colostru, la găini, toate

imunoglobulinele materne care trebuie să protejeze puii nou-eclozați sunt încorporate în ou în timpul ovogenezei. Transferul IgY de la găină la pui se desfășoară în două etape; inițial se transferă IgY din sângele găinii în foliculul ovarian (gălbenușul de ou) și apoi către embrion (Hamal, 2006).

Producția de IgY este o alternativă non-invazivă a metodelor curente și prezintă următoarele avantaje: întreținerea găinilor este accesibilă, animalele sunt ușor de manevrat, obținerea anticorpilor nu necesită sângerări repetate și nu cauzează durere animalelor în cauză. În plus, titrul IgY din gălbenușul ouălor provenite de la găini imunizate rămâne ridicat o lungă perioadă de timp (Carlander D., 2000).

Într-un singur gălbenuș de ou se regăsește o cantitate mai mare de anticorpi comparativ cu media izolată din sângele iepurilor imunizați (Tini, 2002; Kovacs-Nolan, 2005).

Un avantaj suplimentar a utilizării IgY include obținerea unei reacții imunitare mai eficiente față de antigenele de mamifere datorită distanței filogenetice dintre găini și mamifere (Schade și col., 2005).

Pentru a obține anticorpi IgY cu specificitate față de un antigen de interes, găinile ouătoare sunt inoculate cu antigenul respectiv; apoi, anticorpii sunt purificați din ouăle recoltate. Această metodă non-invazivă de obținere de anticorpi reprezintă unul dintre avantajele utilizării IgY în imunodiagnostic (Kovacs-Nolan, 2012, Chiurciu și col., 2017; Topilescu și col., 2014).

Gălbenușul de ou conține 8–10 mg IgY/mL și dintr-un singur ou se pot extrage aproximativ 100-200 mg de IgY total, din care

2-10% este antigen-specific (Davison, 2008).

Anticorpi aviari cu specificitate au fost sintetizați cu succes împotriva unei largi varietăți de antigene, precum proteine, peptide, hormoni lipidici, virusuri, bacterii, fungi (Hamal, 2006; Spillner E., 2012; Chiurciu și col., 2017; Topilescu și col., 2014).

1. Material și metodă

Animalele incluse în studiu

Studiul a fost realizat în cadrul Departamentului de Cercetare-Dezvoltare Imunoinstant al Companiei Romvac S.A.

Toate procedurile au fost efectuate conform cu Directiva 63/2010 a UE referitoare la manipularea animalelor utilizate în scop științific. Studiul a fost aprobat de Comitetul etic al Romvac Company S.A.

Pentru obținerea de imunoglobuline Y specifice, au fost incluse în studiu găini ouătoare (*Gallus domesticus*), clinic sănătoase, în vârstă de 19 săptămâni, cu greutatea corporală de 2,5 kg.

Acestea au fost găzduite în sistem de creștere în baterii, în hale cu parametrii de temperatură, umiditate, luminozitate și zgomot controlați. Păsările au fost hrănite cu dietă standard, *ad libitum*.

Antigenele utilizate în prepararea inoculului

Tulpinile microbiene utilizate în studiu au fost achiziționate fie de la laboratoarele microbiologice ale spitalelor cu care Departamentul colaborează, fie izolate de la pacienții umani tratați în cadrul Cabinetului de Medicină Complementară Imunoinstant.

S-a preparat un inocul multiplu pe baza

următoarelor 18 tulpini bacteriene și micotice: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus Grup B*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile-corpi bacterieni*, *Clostridium difficile-anatoxina*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*.

Inocularea păsărilor

Găinile au fost inoculate de 3 ori, intramuscular, în 2 puncte diferite la nivelul musculaturii pieptului (0,5 ml în fiecare punct). Inoculările de rapel s-au efectuat la 14 zile, respectiv 28 de zile de la inocularea inițială.

Colectarea ouălor hiperimune a fost realizată zilnic, începând cu a 14-a zi de la ultima inoculare. Acestea s-au depozitat la 2-8 °C. Pentru testări comparative au fost utilizate găini SPF în vârstă de 20 de săptămâni, găzduite în izolatoare, în hale proprii.

Extracția IgY

Pentru extracția imunoglobulinei Y a fost aplicată o procedură fizico-chimică. S-a separat gălbenușul de albuș, s-a prelevat câte 1 ml gălbenuș care a fost apoi diluat cu apă MilliQ, în diluție de 1:8.

Amestecul a fost omogenizat, iar apoi a fost ajustat pH-ul la 4,5-5. Probele au fost incubate timp de 24 h la temperatura de -20 °C.

După decongelare, probele au fost centrifugate la 10500 rpm și 4 °C, timp de 20 de minute. Au fost extrase probe din supernatant care au fost filtrate prin filtre de 0,45 μm. Până la testare probele au fost păstrate la 2-8 °C.

Testarea calitativă și cantitativă a imunoglobulinelor Y

Au fost efectuate teste ELISA, metodele calitativă și cantitativă, pentru identificarea și cuantificarea imunoglobulinelor Y din ouăle hiperimune.

Testările s-au făcut la interval de 30 de zile, pe o perioadă de 13 luni, începând cu a 14-a zi de la ultima inoculare.

Determinarea calitativă a imunoglobulinelor Y conținute de către ouăle hiperimune față de antigenele inoculate a fost efectuată prin testul ELISA indirectă, metodă elaborate *in house*.

Determinarea cantitativă a conținutului global de imunoglobuline Y a fost realizată prin testul ELISA directă, metodă elaborate *in house*.

2. Rezultate și discuții

Testarea concentrației în IgY total prin metoda ELISA directă

Pentru probele cu IgY extrasă din ouăle hiperimune, au fost obținute valori ale densităților optice (DO_{450}), care au variat între 2.000 și 3.000.

Aceste valori au fost utilizate pentru calculul concentrației în imunoglobuline totale utilizând o ecuație a dreptei (Figura 1), obținută pe baza unui IgY standard.

S-au obținut concentrații variind între 250 și 400 mg IgY total/ou hiperimun.

În mod comparativ, au fost efectuate determinări ale concentrației în IgY și pentru ouă SPF pentru care s-au obținut valori de 100-150 mg IgY/ou.

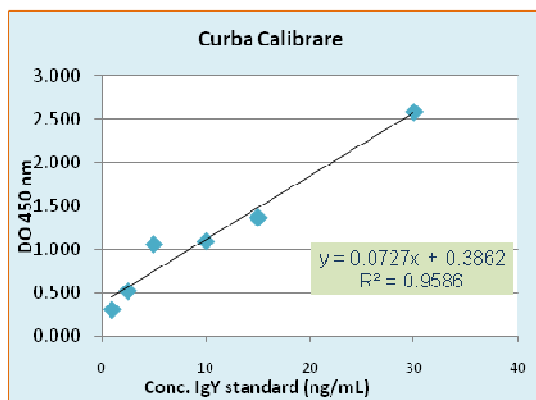


Fig. 1. Curbă de calibrare efectuată utilizând IgY standard pentru calculul concentrației de IgY din ouăle hiperimune

Testarea specificității imunoglobulinelor din ouăle hiperimune prin metoda ELISA indirectă

Rezultatele obținute prin testul ELISA au permis confirmarea prezenței imunoglobulinelor specific în ouăle hiperimune recoltate pe parcursul celor 13 luni de experiment. Ouăle hiperimune recoltate au prezentat un conținut în imunoglobuline cu specificitate față de toate cele 18 antigene utilizate în prepararea inoculului.

În **Figura 2** se evidențiază faptul că IgY prezintă specificitate pentru 4 dintre antigenele utilizate la imunizarea găinilor:

- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Escherichia coli*.

Titru anticorpilor specifici este ridicat pentru fiecare antigen în parte, evidențiind astfel faptul că sistemul imunitar al găinilor inoculate a răspuns față de toți stimuli antigenici inoculați.

Pentru confirmarea rezultatelor s-a folosit ca martor negativ de reactive IgY izolat din ouă provenind de la găini SPF.

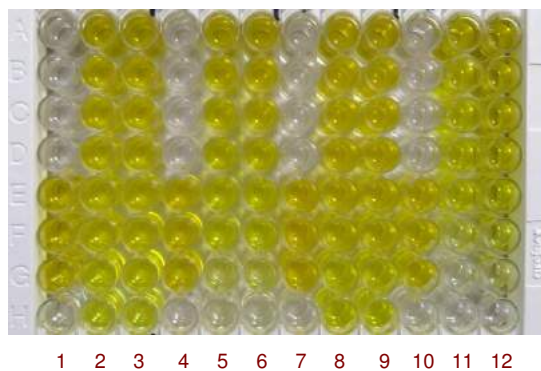


Fig. 2. Test ELISA calitativ pentru stabilirea specificității anticorpilor față de 4 antigene componente ale inoculului multiplu (*Pseudomonas aeruginosa* – stripurile 1-3, *Staphylococcus aureus* – stripurile 4-6, *Klebsiella pneumoniae* – stripurile 7-9, *Escherichia coli* – stripurile 10-12)

Pentru determinarea specificității anticorpilor IgY au fost efectuate diluții pornind de la 1:100 la 1:64000 care au fost repartizate în plăci ELISA căptușite cu antigene specifice (**Figura 2**).

Rezultatele obținute pe parcursul celor 13 luni de testare sunt evidențiate în **Figurie 3-6**. În primele 8 luni de testare se constată variații mari ale valorilor obținute pentru toate cele 4 antigene.

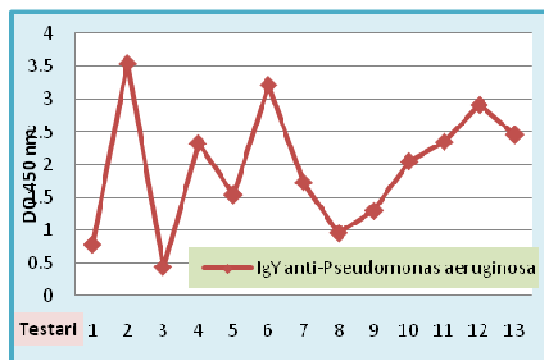


Fig. 3. Variația valorilor citite spectrofotometric la DO_{450nm} pentru titrul de 1:1000; valorile au fost obținute prin testarea ELISA indirectă a specificității IgY extrasă din ouăle hiperimune față de tulpina *Pseudomonas aeruginosa* introdusă în inoculul multiplu

În urma înregistrărilor DO_{450nm} obținute prin testarea specifică a anticorpilor IgY anti-

Pseudomonas aeruginosa se constată că valorile acestora cresc aproape constant în ultimele 5 luni de testare, cu o ușoară scădere în ultima lună. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 3.

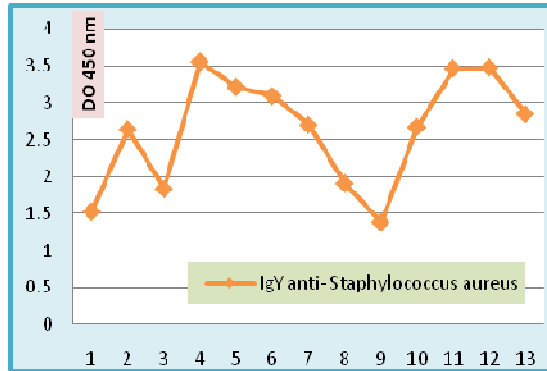


Fig. 4. Variația valorilor citite spectrofotometric la DO_{450nm} pentru titrul de 1:1000; valorile au fost obținute prin testarea ELISA indirectă a specificității IgY extrasă din ouăle hiperimune față de tulpina *Staphylococcus aureus* introdusă în inoculul multiplu

În Figura 4 sunt prezentate valorile obținute în urma testării specificității IgY extras din ouăle recoltate față de antigenul *Staphylococcus aureus*. În ultimele 4 luni de testare se remarcă o creștere a valorilor cu ușoară scădere în ce-a de-a 13-a lună.

Pe întreaga perioadă de testare valorile numerice înregistrate sunt mai mari de 1.000.

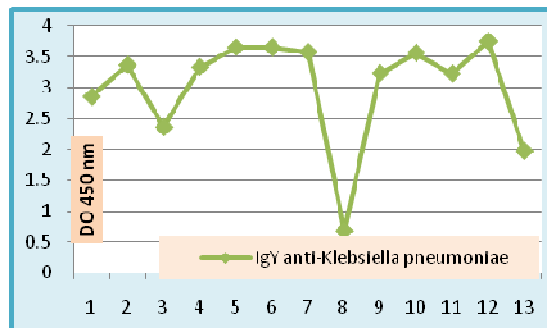


Fig. 5. Variația valorilor citite spectrofotometric la DO_{450nm} pentru titrul de 1:1000; valorile au fost obținute prin testarea ELISA indirectă a specificității IgY extrasă din ouăle hiperimune față de tulpina *Klebsiella pneumoniae* introdusă în inoculul multiplu

În Figura 5 sunt prezentate valorile obținute în urma testării specificității IgY extras din ouăle recoltate față de antigenul *Klebsiella pneumoniae*.

Evoluția acestora este asemănătoare cu cea în cazul testărilor față de antigenul *Staphylococcus aureus*.

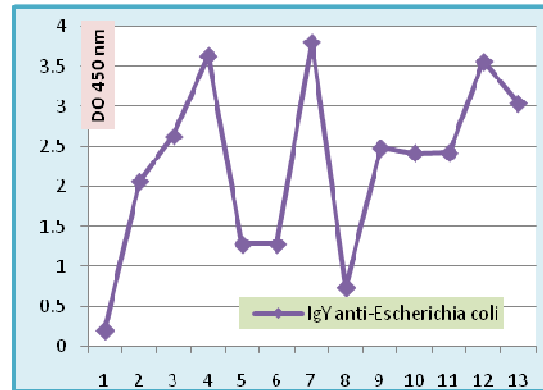


Fig. 6. Variația valorilor citite spectrofotometric la DO_{450nm} pentru titrul de 1:1000; valorile au fost obținute prin testarea ELISA indirectă a specificității IgY extrasă din ouăle hiperimune față de tulpina *Escherichia coli* introdusă în inoculul multiplu

În Figura 6 sunt prezentate valorile obținute în urma testării specificității IgY extras din ouăle recoltate față de antigenul *Escherichia coli*.

Pentru ultimele 5 luni de testare, evoluția este asemănătoare cu cea în cazul testărilor față de antigenul *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Concluzii

- Studiul a permis obținerea de anticorpi specifici (IgY) din gălbenuș de ou hiperimun față de toate cele 18 antigene bacteriene și fungice utilizate la imunizarea găinilor: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*,

Salmonella typhimurium, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus grup B*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile* – corpi bacterieni, *Clostridium difficile* - anatoxina, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*.

- Testările efectuate prin metoda ELISA au demonstrat specificitatea anticorpilor IgY față de antigenele utilizate la imunizarea găinilor.
- În urma determinărilor efectuate prin testul ELISA, se constată că titrul anticorpilor (IgY) se menține ridicat pe toată perioada experimentului.

Bibliografie

1. CARLANDER, D., KOLLBERG, H., WEJÅKER, P., LARSSON, A. (2000). Per oral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunology Research*, **21**, 1–6.
2. DAVISON, F., MAGOR E.K., KASPERS B. (2008). Structure and evolution of avian immunoglobulins. *Avian immunology. Amsterdam: Elsevier*, **6**, 107-127.
3. de PAULA, V.S., da SILVA, ADOS, S., de VASCONCELOS, G.A., IFF, E.T., SILVA, M.E., KAPPEL, L.A., CRUZ, P.B., PINTO, M.A., (2011). Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods*, **171**, 102-106.
4. HAMAL, K.R., BURGESS, S.C., PEVZNER, I.Y., ERF, G.F. (2006). Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poultry Science*, **85**, 1364-1372.
5. KOVACS-NOLAN JENNIFER, MINE, Y. (2012). Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, **3**, 163–182.
6. KOVACS-NOLAN, J., PHILLIPS, M., MINE, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 8421–31.
7. SCHADE, R., CALZADO, E.G., SARMIENTO, R., CHACANA, P.A., PORANKIEWICZ-ASPLUND, J., TERZOLO, H.R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals*, **33**, 129–154.
8. SPILLNER, E., BRAREN, I., GREUNKE, K., SEISMANN, H., BLANK, S., du PLESSIS, D. (2012). Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals*, **40**:5, 313-322.
9. CHIURCIU, C., CHIURCIU, V., OPORANU, M., PĂTRAȘCU, I.V., MIHAI, I., TABLICĂ, M., CRISTINA, R.T. (2017). PC2 Ovotransferrin: Characterization and Alternative Immunotherapeutic Activity. *Ev-Based Complement Alternat Med*. Volume 2017, Article ID 8671271, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/8671271>
10. TOPILESCU, G., CHIURCIU, V., PATRASCU, I.V. CHIURCIU, C., CRISTINA, R.T. (2014). Growth Inhibition of antibiotic resistant bacteria by neutralizing IgY antibodies, *J. Biotechnol.*, vol. 185, Suppl., pp. S91–S92.
11. TINI, M., JEWELL, U.R., CAMENISCH, G., CHILOV, D., GASSMANN, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, **131**, 569–74.
12. YOUNG, CATHERINE A., SILVERSIDES, F.G., JONES, S.R.M. (2007). Chicken-derived IgY recognizes developing and mature stages of *Loma salmonae* (*Microsporidia*) in Pacific salmon, *Oncorhynchus spp.*, *Aquaculture*, **273**, 398-404.

unguent

Otoguard

combate otitele bacteriene
și parazitare (râia auriculară)

neomicină sulfat
cipermethrină
permetrină
oxid de zinc
anestezină



șos. Centurii, nr. 7, Voluntari, jud. Ilfov, romvac@romvac.ro, www.romvac.ro

OUL HIPERIMUN: PREPARARE, CARACTERIZARE ȘI ACTIVITATE IMUNOTERAPEUTICĂ ALTERNATIVĂ

HIPERIMMUNE EGG: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND ALTERNATIVE IMUNOTERAPEUTIC ACTIVITY

Teodora Supeanu¹, Mădălina Tablică¹, Cristina Urducea¹, Ioana Alina Dimulescu¹, Lucica Sima¹,
Viorica Chiurciu¹, Mariana Oporanu¹, C. Chiurciu¹

¹Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

constantinchiurciu@gmail.com

Cuvinte cheie: ou hiperimun, imunoglobulină Y, proteine biologice active, sistem imunitar
Key words: hiperimmun egg, imunoglobulin Y, active biological proteins, immune system

Rezumat

Cercetările efectuate descriu un procedeu de preparare a ouălor hiperimune polivalente și monovalente (personalizate) obținute de la găini imunizate cu un complex de antigene bacteriene și fungice, patogene pentru om, rezistente sau sensibile la antibiotice. S-a preparat un antigen monovalent din tulpina de *Staphylococcus aureus* MRSA izolată de la un pacient cu infecție urinară. S-au format loturi de găini ouătoare, aflate la începutul perioadei de ouat, care s-au imunizat în zilele 0, 14 și 28. Din ouăle hiperimune obținute s-a extras și purificat imunoglobulina Y (IgY) specifică prin obținerea fracțiunii solubile în apă și precipitare cu polyethylene glycol 6000 (PEG). Analiza purității s-a efectuat prin electroforeză în gel de poli(acrilamidă) în sistem denaturant (SDS-PAGE), obținându-se o singură fracțiune cu evidențierea lanțurilor grele (masa moleculară = 75KDa și a lanțurilor ușoare (masa moleculară=25KDa). Prin testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA) s-a pus în evidență identitatea între IgY analizat și IgY standard (MyBiosource). Specificitatea anticorpilor IgY obținuți din gălbenușul de ou hiperimun s-a efectuat prin testul imunoenzimatic ELISA, obținându-se titruri ridicate pentru fiecare antigen prezent în inocul. Din ouăle hiperimune s-au preparat produse biologice active din gama Imunoinstant, utilizate în terapia unor afecțiuni determinate de germeni multirezistenți.

Abstract

The research carried out describes one preparation procedure of the monovalent and polyvalent hyper immune eggs, obtained from hens immunized with a bacterial and fungal antigen complex, pathogenic for humans, resistant or sensitive to antibiotics. It was prepared a monovalent antigen of *Staphylococcus aureus* MRSA strain, isolated from a patient with urinary infection. Lots of laying hens have been formed, at the beginning of the laying period, which were immunized on days, 0, 14 and 28. From the hyper immune eggs obtained the specific immunoglobulin Y (IgY) was extracted and purified by polyethylene glycol precipitation (PEG 6000). Purity analysis was performed by polyacrylamide gel electrophoresis in a denatured system (SDS-PAGE) obtaining a single fraction with highlighting of heavy chains (molecular weight=75KDa) and light chains (molecular weight=25KDa). By the agar gel immune-diffusion assay (IDGA), the identity between analyzed IgY and standard IgY (MyBiosurse) was highlighted. The specificity of IgY antibodies obtained from hyper immune egg yolk was proved by the ELISA immune enzymatic assay, obtaining high titers for each antigen present in the inoculum. The hyper immune eggs were used for preparation of biologically active products from the range IMUNOINSTANT, recommended in the therapy of diseases caused by multi resistant germs.

Introducere

Încă din 1893, F.Klempereer a arătat că o găină infectată cu un agent patogen are

capacitatea să producă o imunoglobulină specifică, Imunoglobulina Y (IgY), pe care o transferă din sânge în ou, pentru a proteja viitorul pui [1].

Pornind de la această descoperire, cercetătorii din întreaga lume, au discutat pentru prima data de oul hiperimun ca produs farmaceutic [8].

Imunoglobulinele din gălbenuș aparțin clasei IgY; IgA și IgM sunt deasemenea prezente, dar în cantitate mica. IgY-ul îndeplinește același rol pentru păsări, ca IgY-ul pentru mamifere [2, 3].

Oamenii de știință au descoperit un mod foarte interesant de a asigura un suport imunologic natural, utilizând proteinele biologice active din oul hiperimun [5].

Pe lângă imunoglobuline Y (anticorpi specifici) pentru anumiți germeni patogeni, oul hiperimun mai conține imunomodulatori, factori de transfer, lizozim, ovotransferină, ovomucină etc., de o importanță deosebită în refacerea și stimularea răspunsului imun al întregului organism [4].

Oul hiperimun se obține prin imunizarea găinilor cu un complex de tulpini bacteriene, virale sau fungice, rezistente la antibiotice, recoltate de la pacienți umani; prin conținutul său reprezintă o sursă valoroasă de anticorpi care contribuie la întărirea imunității organismului.

S-a demonstrat eficiența terapiei cu ouă hiperimune la pacienți cu diferite forme de artrită, boli cardiovasculare, scleroză, boli autoimune, cancer, inflamații, etc. [7, 8].

Studiile efectuate au avut ca scop obținerea ouălor hiperimune polivalente și monovalente (personalizate), ca produse în compoziția cărora sunt: imunoglobuline Y specifice față de anumiți germeni patogeni, respectiv față de o singură tulpină microbiană izolată de la un pacient anume.

1. Material și metodă

1.1. Animale

Studiile s-au efectuat pe loturi de găini ouătoare convenționale sau libere de germeni specifici (SPF) în vârstă de 20-23 săptămâni din rasa Rhode Island Red, clinic sănătoase.

Păsările au fost ținute câte 2, în baterii, la temperatura ambiantă ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) și hrănite cu dieta standard R 21,5. În timpul experimentului programul de lumină/întuneric a fost de 12 ore.

1.2. Antigene.

1.2.1. Prepararea antigenului polivalent.

Tulpinile bacteriene și fungice folosite în acest studiu au fost obținute de la pacienți din spitale, cu semne clinice de boală, acestea fiind rezistente la antibiotice: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* - corpi bacterieni, *Clostridium difficile* - exotoxine, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus grup B*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* și respectiv din colecția Laboratorului de Microbiologie al Companiei Romvac: *Streptococcus mutans* ATCC 55670, *Salmonella typhimurium* R005TL3/2014, *Salmonella enteritidis* TL 248 și *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Pentru prepararea antigenului polivalent utilizat la inocularea găinilor, tulpinile bacteriene și fungice s-au multiplicat pe medii de cultură selective, s-au spălat de trei ori cu PBS steril, $\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$ și s-au inactivat cu formaldehida 0.5% timp de 18 h.

Complexul antigenic obținut s-a ajustat la valoarea 0,05 (DO = 600), corespunzând unei densități celulare de aproximativ 1×10^{10} UFC/ml.

1.2.2. Prepararea antigenului monovalent personalizat.

S-a izolat și identificat tulpina de *Staphylococcus aureus MRSA*, de la un pacient cu infecție urinară.

Din cultura de bacterii de 24 ore obținută pe mediu BHI (Oxoid) s-a preparat antigenul conform tehnicii descrise la punctul 1.2.1

1.3. Imunizarea găinilor.

Găinile s-au inoculat la începutul perioadei de ouat pe cale intramusculară, de trei ori, cu antigenul polivalent, respectiv cu antigenul monovalent reprezentând 3-4 mg proteină/ ml din fiecare tulpină resuspendată în PBS steril pH=7,2±0,2.

Amestecul s-a emulsificat în adjuvant Vet-Sap (DesertKing) calculând 0,045 ml/doză de 1 ml. Inoculările s-au făcut în două puncte diferite în musculatura pieptului (0,5ml / punct).

Administrarea antigenului s-a repetat la 14 zile respectiv la 28 zile de la prima inoculare.

Ouăle hiperimune s-au colectat zilnic, după două săptămâni de la ultima inoculare și au fost ținute la 4°C până la prelucrare.

1.4. Extracția și purificarea imunoglobulinei Y (IgY)

S-a efectuat separarea gălbenușului de albuș utilizând aparatul automat de spart ouă (Ovo-Tech). Gălbenușul s-a diluat cu apă deionizată menținută la 4 °C în proporția de 1:8; suspensia s-a omogenizat cu ajutorul unui turmix și s-a ajustat la pH= 5,0 cu soluție de

HCl 0,5 M. În prima etapă amestecul s-a congelat la -30°C în containerul Arctisstore.

Pentru extragerea IgY suspensia s-a menținut la 20°C timp de 48 ore.

Fracțiunea solubilă în apă (IgY) s-a prelucrat prin prefiltrare și filtrare și s-a menținut la -4°C până la efectuarea determinărilor cantitative și calitative. În a doua etapă, fracțiunea compusă din lipide și lipoproteine s-a eliminat prin filtrare și centrifugare.

Pentru purificarea IgY fracțiunea solubilă în apă s-a precipitat cu polyethylene glycol 6000 PEG (Sigma-Aldrich).

Amestecul s-a menținut pe agitator (Stuart) timp de 10 minute, apoi s-a centrifugat la 10500 rpm timp de 20 minute.

Supernatantul s-a reprecipitat de două ori cu PEG 12% iar după centrifugare la 10500 rpm, depozitul s-a reluat în PBS pH= 7,2±0,2.

Puritatea IgY s-a testat prin SDS-PAGE.

1.5 Electroforeza în gel de poliacrilamidă în sistem denaturant (SDS-PAGE).

Electroforeza s-a realizat folosind un aparat Omni Page Electrobloter (Cleaver Scientific) după tehnica descrisă de Laemmli [6]. Probele de IgY s-au diluat la o concentrație finală de 2 mg/ml proteină folosind 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich) și albastru de bromphenol (Sigma Aldrich).

După incubarea probelor timp de 10 minute la 96 °C, 5μl din fiecare probă s-a adăugat în gelul de migrare 10% și de concentrare de 4%. Markerul molecular, (Protein Marker VI, Applichem) conținând un amestec de 12 proteine cu mase moleculare cuprinse între 10-254 KDa a fost folosit ca

martor. Electroforeza s-a realizat utilizând 90 V și 185 mA timp de 90 minute. Gelul s-a colorat cu Coomassie Brilliant Blue R 250(Sigma Aldrich).

1.6. Testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA)

S-a efectuat în Agar Noble 1% preparat în tampon borat pH= 8,6; 17 ml de agar cald la 45-60 °C s-a turnat în plăci Petri cu diametrul de 90 mm.

În gel s-au efectuat șapte godeuri (unul central și șase periferice) cu diametrul de 6 mm și distanța dintre ele de 3 mm.

Pentru stabilirea identității, în godeurile 3 și 5 s-a repartizat IgY standard (MyBiosource) iar în godeurile 2 și 6 IgY obținut din oul hiperimun; în godeurile 1,4 și central s-au repartizat câte 40 μl IgG iepure anti-IgY (Romvac).

S-au efectuat diluții binare (1/2- 1/2048) în scopul de a stabili diluția optimă de lucru pentru probele de IgY de testat.

Reacțiile de precipitare s-au citit la 24 ore.

1.7. Testul imunoenzimatic ELISA direct.

Cuantificarea IgY s-a efectuat utilizând un cititor de microplăci Spectra Max 190 și un Kit standardizat (MyBiosource).

Testul ELISA s-a pregătit *“in house”* pentru fiecare determinare în parte. Plăci cu 96 godeuri (Greiner Bio-One) s-au căptușit cu 150 μl IgG iepure anti-IgY având concentrația de 3,75μg/ml în tampon carbonat bicarbonat (0,05 M, pH = 9,6).

După incubare plăcile s-au spălat cu 300 μl PBS-Tween. Blocarea absorbției nespecifice s-a făcut cu soluție BSA 1% (Merck) timp de

45 minute. Câte 150 μl din probe diluate în PBS pH= 7,4 s-au repartizat în godeuri împreună cu martorul pozitiv (IgY standard-Sigma) și martorul negativ (IgY- SPF).

Plăcile s-au incubat 90 minute la 37°C.

După spălare cu PBS- Tween, s-a adugat în fiecare godeu 150μl conjugat IgG anti-IgY marcat cu peroxidază (MyBiosource) la diluția 1:5000.

După adăugarea substratului cromogenic TMB, reacția a fost stopată cu HCl 1N și s-a citit la un spectrofotometru (Spectra Max 150) la lungimea de undă de 450 nm.

1.8. Determinarea conținutului specific de IgY prin testul ELISA indirect, *“in house”*

Pentru determinarea cantitativă a anticorpilor din gălbenușul de ou hiperimun s-a aplicat testul ELISA *“in house”*.

Plăcile cu 96 godeuri (Greiner Bio-One) s-a căptușit cu suspensia de bacterii la concentrația de 10 μg/ml proteină, în tampon carbonat-bicarbonat (0,05M, pH= 9,0). După menținerea plăcii la 4 °C timp de 12 h și spălarea cu PBS-Tween, reacția s-a blocat cu tampon de fixare, câte 300 μl/godeu și s-a incubat 30 minute la temperatura camerei.

După înlăturarea lichidului de spălare, s-a adăugat în fiecare godeu 100μl suspensie IgY 1:1000, în diluții binare.

După incubare 2 h la 37°C și spălare cu PBS-Tween s-a adăugat 100μl conjugat IgG anti-IgY în diluția 1:5000.

După incubarea și spălarea plăcii, s-a adăugat 100 μl TNB, apoi 100 μl soluție de stopare.

Placa s-a citit la spectrofotometru (Spectra Max 190) la lungimea de undă de 450 nm.

2. Rezultate și discuții

Procedeeul de izolare a IgY prin congelare - decongelare a cuprins două etape: în prima etapă s-a obținut fracțiunea solubilă în apă și un strat de lipide și de lipoproteine.

În etapa a doua fracțiunea solubilă în apă s-a precipitat de trei ori cu polietilen glicol 6000 3,5% respectiv 12%.

Puritatea IgY a fost evaluată prin SDS-PAGE, comparativ cu IgY standard

(MyBiosource). Rezultatele au evidențiat două benzi de precipitare reprezentând lanțurile grele (HC) și lanțurile ușoare (LC) (fig.1.coloanele 7 și 8).

Pe baza migrării markerului molecular s-au identificat lanțurile grele cu masa moleculară 75 KDa și lanțurile ușoare de 25 Kda. Se remarcă că IgY purificat obținut prin precipitare cu PEG prezintă aceleași două fracțiuni (HC și LC) ca IgY standard (MyBiosource).

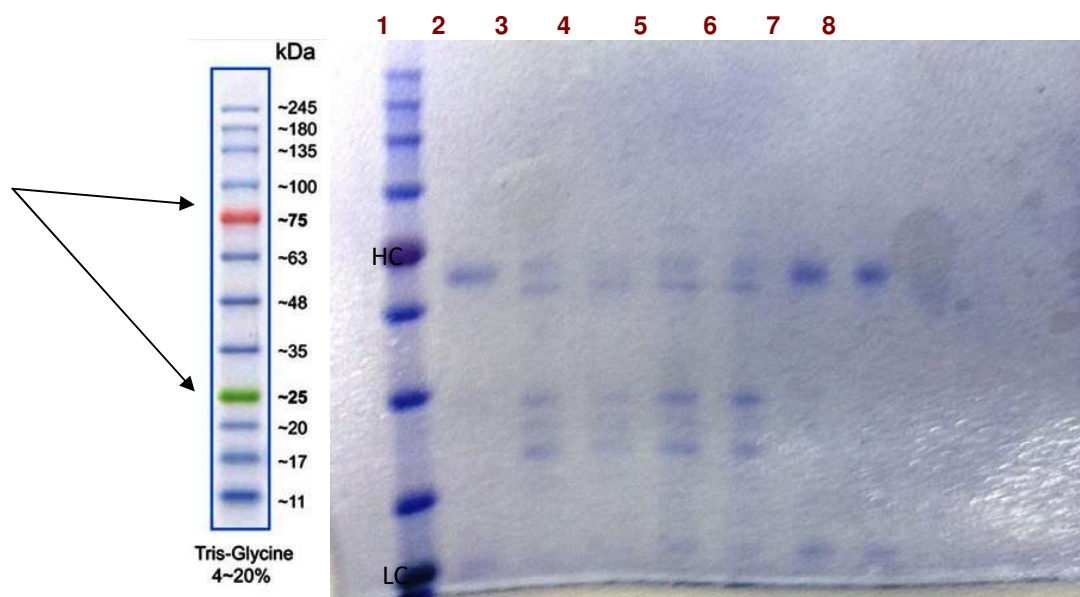
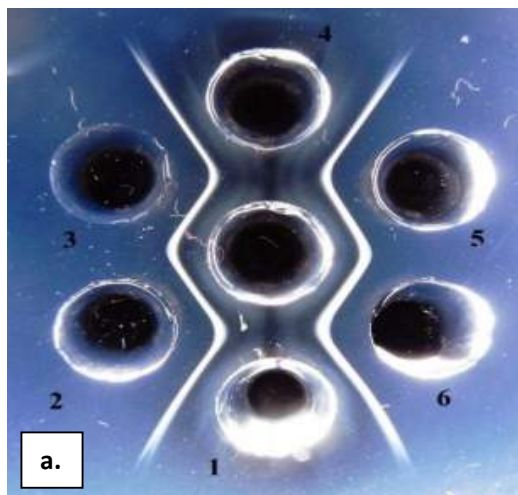


Fig. 1. Analiza purității prin SDS PAGE a imunoglobulinei Y: 1: Marker molecular; 2: IgY Standard (MyBiosource); 3, 4, 5, 6: Imunoinstant Multiplu ; 7 și 8: IgY purificat cu PEG și evidențierea lanțurilor HC; LC

IgY purificat obținut din ouă hiperimune a fost testat comparativ cu IgY standard (MyBiosource) prin testul IDGA.

Rezultatele obținute au demonstrat identitatea între IgY standard (godeurile 3 și 5) și IgY purificat (godeurile 2 și 6) față de IgG iepure anti IgY (fig.2 a).

Se evidențiază faptul că linia de precipitare dată de IgY purificat prezintă continuitate cu cea dată de IgY standard, fiind situate la jumătatea distanței dintre godeuri (fig. 2a).



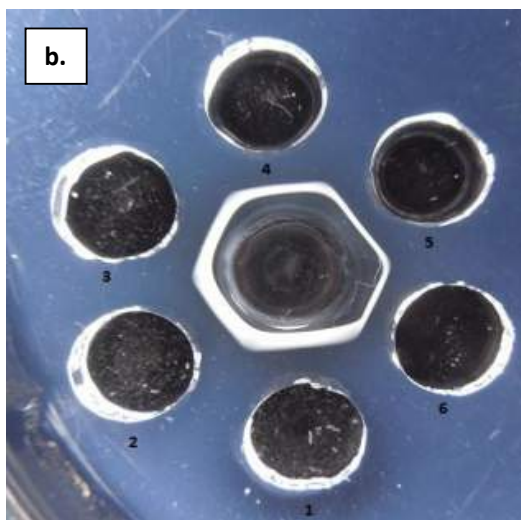


Fig. 2: Testul IDGA: a) Stabilirea identității între IgY standard (godeurile 3 și 5) și IgY purificat (godeurile 2 și 6); în godeurile 2, 4 și central: IgG iepure anti IgY; b) Testarea în diluții binare (1/2- 1/64) a IgY purificat (godeurile 1-6); în godeul central: IgG iepure anti IgY

IgY purificat a fost testat în diluții de la 1/2-1/2048, prin testul de IDGA față de IgG iepure anti IgY. S-a obținut linii de precipitare intense

la diluțiile 1/2, 1/4, 1/8. 1/16 stabilindu-se diluția optimă de lucru de 1/32 (fig.2b, godeul 5)

S-a determinat comparativ concentrația imunoglobulinei Y (mg / 100 ml) din ouă hiperimune polivalente și ouă convenționale prin testul ELISA direct.

Rezultatele sunt sintetizate în figura 3. Concentrația IgY din ouă hiperimune a fost cuprinsă între 630,47- 686,13 mg/100 ml, pe când în ouăle convenționale a fost de 297,45- 402,7 mg/100 ml.

Analiza statistică a acestor valori a indicat o diferență dinstint semnificativă (p<0,001) între cele două categorii de ouă.

Aceasta conferă oului hiperimun calități deosebite, prin conținutul său bogat în imunoglobuline specifice (anticorpi) față de anumiți germeni patogeni.

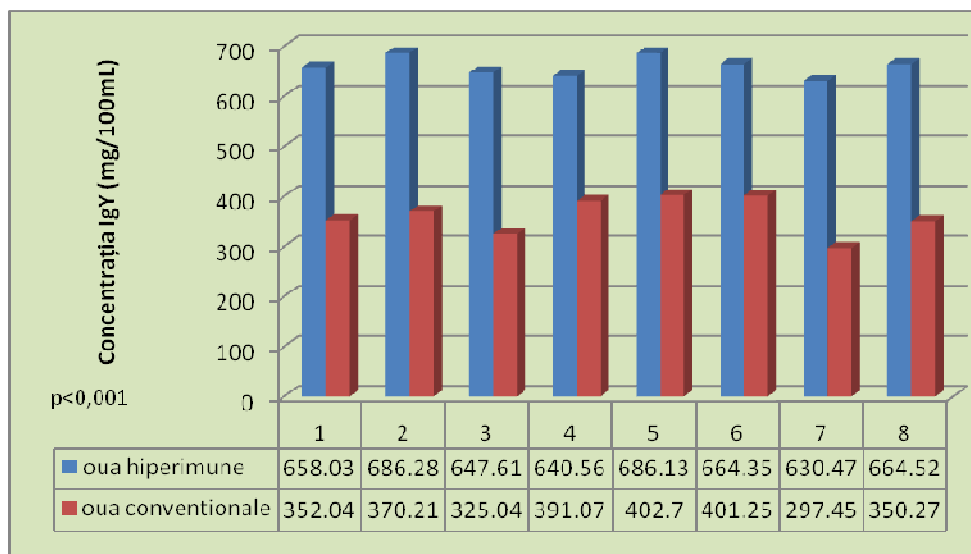


Fig. 3. Valorile medii ale concentrației IgY (mg/100mL) din ouă hiperimune și ouă convenționale

Imunoglobulina Y izolată din ouăle hiperimune polivalente s-a testat pentru specificitate prin tehnica ELISA calitativă (fig. 5), comparativ cu cea obținută din ouă convenționale (fig. 4).

Experimentul s-a efectuat față de unele tulpini bacteriene, rezistente la antibiotice conținute în inocul: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* și *Clostridium difficile*.

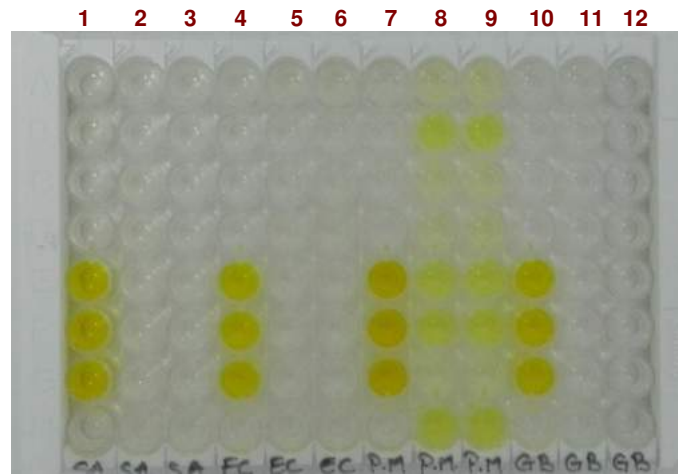


Fig. 4. Testarea specificității IgY extras din gălbenuș de ou convențional față de patru antigene (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*) prin testul ELISA calitativ

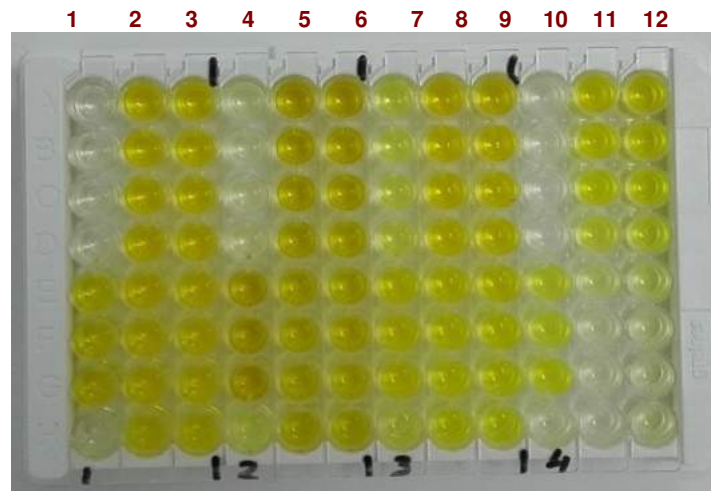


Fig. 5. Testarea specificității IgY extras din gălbenuș de ou hiperimun polivalent față de patru antigene (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*) prin testul ELISA calitativ

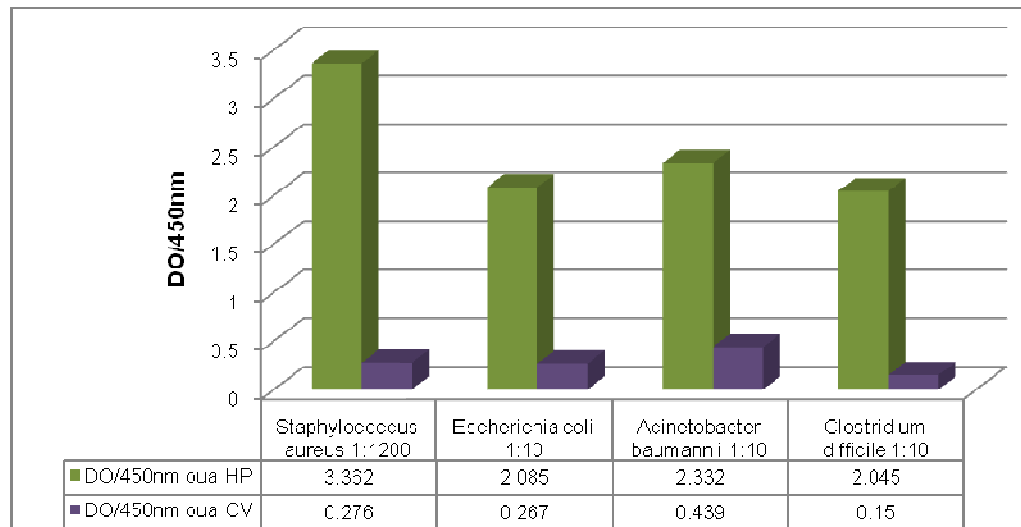


Fig. 6. Testul ELISA: Testarea specificității IgY obținut din ouă hiperimune polivalente și ouă convenționale față de patru antigene

Datele prezentate în figura 6 au relevat că anticorpii IgY izolați din oul hiperimun evidențiază o specificitate ridicată față de antigenele bacteriene testate.

Valorile densităților optice (DO 450 nm) sunt crescute, dar diferite pentru fiecare antigen în parte:

- DO=3,325 pt. *Staphylococcus aureus*;
- DO=2,085 pt. *Escherichia coli*,
- DO=2,322 pt. *Acinetobacter baumannii*
- DO= 1,500 pt. *Clostridium difficile*.

Aceasta demonstrează că sistemul imun al găinilor răspunde la fiecare stimul antigenic inoculat.

Rezultatele obținute demonstrează că în componența oului hiperimun polivalent se găsesc anticorpi (IgY) cu specificitate față de tulpinile bacteriene prezente în inocul.

Oul hiperimun conține titruri ridicate de anticorpi, comparativ cu oul de consum care conține imunoglobulină Y contra unor agenți patogeni cu care găina a venit în contact fie întâmplător, fie prin vaccinare.

Oul hiperimun mai conține imunomodulatori și factori de transfer de o importanță deosebită în stimularea răspunsului imun al întregului organism, precum și ovotransferinei specifice.

Întrucât produsele ce conțin IgY polivalentă cu specificitate față antigenele inoculate la găină, nu pot acoperi întreaga gama de infecții bacteriene, fungice sau virale cu care pacienții se confruntă, s-au obținut ouă hiperimune monovalente personalizate care conțin anticorpi față de o anumită tulpină microbiană care îl afectează pe un anumit pacient.

S-au obținut ouă hiperimune personalizate, utilizând tulpina de *Staphylococcus aureus* MRSA izolată de la un pacient cu infecție urinară. Acesta prezenta o infecție urinară veche, recurentă, rebelă la tratamentul clasic.

Pacientului i s-au administrat ouă hiperimune și soluție de imunoglobuline polivalentă, însă din punct de vedere clinic răspunsul terapeutic a fost redus; astfel s-a decis instituirea unei terapii personalizate, bazată pe imunoglobulina monovalentă anti *Staphylococcus aureus* MRSA. Terapia a constat în administrarea de ouă personalizate și soluție conținând imunoglobulină monovalentă personalizată. Anticorpii IgY anti *Staphylococcus aureus* MRSA s-au testat pentru specificitate față de tulpina utilizată la inocularea găinilor (Tabelul 1).

Tabelul 1.

Testul ELISA: Valorile DO ale anticorpilor IgY anti *Staphylococcus aureus* MRSA (tratament personalizat)

Godeu	Martori (DO)		IgY anti <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA		
			Diluții Dilutions	1 (DO)	2 (DO)
A	Blank	0.035	1:100	3.704	3.709
B	Martor IgY negativ	0.057	1:200	3.708	3.709
C	Martor IgY negativ	0.050	1:400	3.685	3.694
D	Martor IgY negativ	0.056	1:800	3.626	3.671
E	Martor IgY pozitiv	3.670	1:1600	3.496	3.519
F	Martor IgY pozitiv	3.896	1:3200	3.013	3.081
G	Martor IgY pozitiv	3.933	1:6400	2.304	2.379
H	Blank	0.057	1:12800	1.534	1.617

Din analiza rezultatelor prezentate în Tabelul 1 se remarcă valorile ridicate ale densităților optice (DO_{450}) ale anticorpilor anti *Staphylococcus aureus* MRSA la diluțiile

- 1:100 ($DO=3,704$);
- 1:200 ($DO=3,708$);
- 1:400 ($DO= 3,685$);
- 1:800 ($DO= 3,626$);
- 1:1600($DO=3,496$);
- 1:3200($DO= 3,013$).

Aplicarea terapiei personalizate a avut rezultat favorabil, examenul microbiologic al probelor de urină fiind negativ.

Avantajul ouălor hiperimune monovalente constă în faptul că acestea se pot personaliza în funcție de pacient și/sau infecție, astfel încât să acționeze strict asupra tulpinii microbiene care afectează un pacient anume.

Rezultatele noastre sunt în concordanță cu studiile efectuate de Lesli [2] și Peng Wei [3] care au demonstrat că oul hiperimun diferă de oul de consum, datorită conținutului ridicat de anticorpi specifici imunomodulatori, factori de transfer, ovotransferine [4] având activitate antimicrobiană, antiinflamatoare și imunomodulatoare contra unor agenți patogeni, care evoluează la om.

Oul hiperimun și produsele biologic active din gama Imunoinstant obținute de noi (soluții, pulberi, sprayuri, geluri, produse cosmetice, suspensii) au ca substanță activă Imunoglobulina Y și contribuie la menținerea stării de sănătate a organismului.

Imunoglobulina Y prezintă în aceste produse reprezintă un mijloc terapeutic extrem de eficient împotriva unor germeni patogeni, rezistenți la antibiotice.

Produsele sunt 100% naturale, fiind utilizate în terapia unor afecțiuni determinate de germeni multirezistenți (infecții gastrice, respiratorii, urinare, afecțiuni parodontale, dermatite de diferite forme, boli autoimune, etc.)

3. Concluzii

- Oul hiperimun polivalent și monovalent personalizat a demonstrat activitate imunologică, putând fi utilizat ca mijloc biologic alternativ în prevenirea și tratamentul infecțiilor produse de germeni sensibili și rezistenți la antibiotice.
- Rezultatele obținute au demonstrat specificitatea imunoglobulinei Y izolată din oul hiperimun, care reacționează cu epitopii antigenelor utilizate la imunizarea găinilor.
- Oul hiperimun reprezintă un depozit natural de proteine biologic active, de protecție, reprezentând un produs rapid și sigur ce poate fi utilizat în imunoterapie sub formă de soluții, pulberi, sprayuri, unguente, geluri, suspensii etc. Proteinele biologic active asigură imunizarea pasivă a organismului având efect de stimulare a funcțiilor sistemului imunitar.

Bibliografie

1. **KLEMPERER F. (1893).** Uber naturliche Immunitat und ihre Verwertung fur die Immunisierungstherapie. *Arch fur Exp Pathol und PharmaKologie.* 31: 356-382.
2. **LESLIE G.A., CLEAM, L.W. (1969).** Phylogeny of Immunoglobulin structure and Function. *J. Exp Med.*, 130,6, 1337-1352.
3. **WEI, P., SUN Y., LIU, D., ZHAO, S. (2013).** Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY). Purification Providing Electrophoretically Homogenous

- Preparation. *Int.J. Electrochem Sci.*, 8, 113-124.
4. **CHIURCIU, C., CHIURCIU, V., OPORANU, M., PĂTRAȘCU, I.V., MIHAI, I., TABLICĂ, M., CRISTINA, R.T. (2017).** PC2 Ovotransferrin: Characterization and Alternative Immunotherapeutic Activity. *Ev-Based Complement Alternat Med.* Volume 2017, Article ID 8671271, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/8671271>
 5. **CHIURCIU C., CHIURCIU, V., IONESCU, V., RADU, G., SIMA, L., OPORANU, M., PĂTRAȘCU, I.V. (2017).** Biological Products PC2. Part 2 - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection treatment in humans. *One Health International J.* 3 (1), 59-63.
 6. **LAEMMLI U.K, (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Heat of Bacteriophage T4-Nature 227, 680-685.
 7. **SIMA L., C. CHIURCIU, CHIURCIU, V., PĂTRAȘCU, I.V. (2017).** Biological products PC2. Part1. Oral and topical treatment of Psoriasis vulgaris in humans, *One Health Inter. J.*, 3(1), 53-58.
 8. **PATRAȘCU I.V., CHIURCIU, C., CHIURCIU, V., OPORANU, M., MIHAI, I., SIMA, L., RADU, G., TOPILESCU, G., CĂȘARU, C. (2016).** Biological Products PC2(3) – Active Immunity Via Passive Immunity- *One Health Eur.Inter.Conf*, 22-24 Sept., 29.

prevenirea **dirofilariozei** și a **babesiozei** se face cu:

Rombendazol super

- comprimate
- antihelmintic cu spectru larg
- substanțe active: albendazol 25 mg; avermectină B1 1 mg
- combate, inclusiv, nematodele și cestodele



Lunar, la câini și pisici, din aprilie până în octombrie, se recomandă:

Rombendazol super - 1 cpr / 2,5 kg greutate corporală, timp de 2 zile, asociat cu Parakill - soluție spot on, 1 - 2 picături / kg greutate corporală

Din noiembrie până în martie, se recomandă:

Total sau Paracan

Romvac
TRADITIE SI INOVATIE IN SANATATEA ANIMALULUI

Sos. Centurii, nr.7, Voluntari, jud. Ilfov
Tel.: 021 350 31 09, Fax: 021 350 10
romvac@romvac.ro, www.romvac.ro

▼ *In memoriam*

Despre cel care a fost: Prof. dr. Corneliu Radu, titularul disciplinei de Anatomie din cadrul FMV Timișoara

About the one who was: Prof. dr. Corneliu Radu, former titular of the Anatomy Department at FMV Timișoara

Călin Pop

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara



Radu Corneliu a văzut lumina zilei la 27 Iulie 1930, la Arad, într-o familie de intelectuali de esență pură. Mama, Eugenia Radu a fost profesoară, originară din Basarabia, iar tatăl, Cornel Radu medic primar pediatru, provenea din Banatul de câmpie, zona Caransebeș, satul Jupa. Tatăl, doctorul pediatru Radu Cornel, a fost o lungă perioadă de timp director al spitalului de copii din Arad, dar a ocupat în două rânduri și funcția de Primar al Aradului.

Doctorul Radu Corneliu a urmat școala primară, gimnaziul și liceu în Arad, după care s-a înscris la Facultatea de Medicină Veterinară din Arad, absolvind-o în anul 1954. Câțiva ani mai târziu a absolvit și Facultatea de Medicină din Timișoara. A practicat succesiv meseria de medic veterinar și cea de medic uman, în circumscripții din jud. Timiș, perioade despre care povestea întotdeauna cu mare plăcere celor apropiați. În anul 1962, odată cu înființarea Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara, a îmbrățișat cariera universitară preluând disciplina de Anatomie. A slujit Alma

Mater cu credință și devotament până la pensionare în anul 1996. Dintre contribuțiile la dezvoltarea științei, respectiv la progresele anatomiei comparative, menționăm schemele originale ale angio-arhitectonicii pulmonare la mamiferele și păsările domestice, relațiile dintre configurația și raporturile rinichilor cu pelvisul și fosele renale la păsările domestice.

În cei 34 de ani de activitate universitară a reușit să îmbine cu succes activitatea didactică cu cea de cercetare, pentru cea din urmă obținând rezultate remarcate pe plan mondial.

A fost autor și coautor la peste 100 de lucrări științifice, precum și la 28 de cărți de anatomie veterinară.

Preocupat constant de modernizarea predării anatomiei, a elaborat o metodă eficientă de predare intitulată „*Corelarea iconografiei din sala de disecții cu ghidul de disecție și fazele disecției*” metodă care a fost brevetată în anul 1987.

A fost în tot acest timp un foarte bun pedagog, un coleg deosebit, jovial și politicos, un Om pe care îți făcea plăcere întotdeauna să-l întâlnești pentru că reușea să transmită și celorlalți optimismul și buna dispoziție care îl însoțeau în permanență, apreciat și stimat de colegi, studenți și cunoscuți deopotrivă.

Dumnezeu să-L Odihnească în pace!

Despre cea care a fost: Prof. univ. dr. Mariana Şincăi, titularul disciplinei de Histologie din cadrul FMV Timișoara

About what was: Prof. Dr. Mariana Sincai, former holder of Histology department at FVM Timișoara

Diana Brezovan

Facultatea de Medicina Veterinara Timisoara



La 8 Martie 2019 a încetat din viață, la vârsta de 75 ani, doamna **Prof. dr. Mariana Şincăi**, un foarte respectat membru al corpului profesoral din cadrul Facultății

de Medicină Veterinară din Timișoara.

D-na prof. dr. Mariana Şincăi s-a născut în orașul Arad, la data de 6 septembrie 1944.

A urmat cursurile școlii gimnaziale și liceale din orașul său natal, iar în anul 1962, la o concurență acerbă pentru admitere a reușit, prima pe listă, în anul I al Facultății de Biologie, din cadrul Universității Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca, **pe care a absolvit-o, tot prima pe listă, ca șef de promoție, în anul 1967, pe care bază a primit repartizare guvernamentală la Facultatea de Medicină Veterinară din Timișoara, Disciplina de Parazitologie.**

În perioada 1967-1973 a funcționat ca asistent la disciplinele de Parazitologie și de Biologia paraziților animali. În anul 1973 s-a transferat la disciplina de Histologie-Embriologie, în cadrul aceleiași facultăți, unde

a activat până la data pensionării sale, în anul 2008.

În anul 1974 a susținut teza de doctorat, sub conducerea D-lui Academician Eugen Pora, pe care bază i s-a conferit titlul și diploma de **Doctor în Științe Biologice.**

În anul 1986 devine șef de lucrări, în 1990 - conferențiar, iar în anul 1993 devine profesor universitar.

De notat că, ne fiind membru de partid, între anii 1974 și 1986 a fost singurul cadru didactic pe post de asistent, cu doctorat din Universitate, deși în acest timp avea și normă de predare.

Din anul 1989, prin pensionarea d-lui Conf.dr. Botărel Silviu a preluat conducerea disciplinei de Biologie celulară – Histologie – Embriologie, iar în intervalul 1990-2000 îndeplinește și funcția de șef de catedră.

În anul 1993, în cadrul **primului program TEMPUS pentru medicina veterinară din Romania**, a efectuat, în Marea Britanie, un stagiul de 45 de zile, cu tema "modernizarea învățământului veterinar din România".

În decursul activității a publicat mai multe manuale și cărți de specialitate ca singur autor, la editura Mirton: Biologie celulară și moleculară la animale (1993), Biologie celulară (1998), Histologie și Embriologie animală (1998), Tehnici de citohistologie normală și

patologică (2000), Citohistologie și tehnici de specialitate (2003).

Activitatea de cercetare s-a concretizat în 104 lucrări științifice ca prim autor și peste 100 de lucrări științifice în calitate de coautor.

Dintre domeniile activității de cercetare cu rezultate originale deosebite, recunoscute pe plan național și cu numeroase citări în literatura internațională, se pot aminti: studiile dezvoltării ontogenice a timusului la mamifere și păsări, evoluția și funcțiile epitelului germinativ al foliculilor ovarieni, biologia celulei tumorale în diferite tipuri de tumori la carnivore și aplicații biomedicale ale fluidelor cu nanoparticule magnetice.

În acest domeniu actual și prioritar, al nanoștiințelor, colectivul de cercetare condus de prof.dr. Mariana Șincai a obținut rezultate originale remarcabile în domeniul efectului antitumoral și UV-protector al compositelor cu nanoparticule magnetice, rezultate care sunt adevărate premii ale cercetării pe plan național și internațional.

Prof.dr. Mariana Elisabeta Șincai a fost membră a Societății Naționale de Biologie Celulară și a European Cell Biology Organisation. De asemenea, a fost membru fondator al Asociației Române pentru promovarea fluidelor magnetice, membru al ISIR, Internațional Society for Interdisciplinary Research.

A participat cu lucrări științifice la Congrese și Conferințe internaționale din Europa, Asia și America, o parte din lucrări fiind publicate în reviste cu largă recunoaștere internațională.

Prin încetarea din viață a doamnei **Prof.dr. Mariana Elisabeta Șincai**, Facultatea

de Medicină Veterinară din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului "Regele Mihai I al României", din Timișoara pierde un mare profesor, iar comunitatea științifică un reputat specialist în domeniile în care a activat și cărora le-a dedicat, fără nicio rezervă, întreaga sa capacitate, energie, inteligență, competență, și cărora le-a închinat, în fond, toată viața sa profesională.

Dumnezeu să o odihnească în pace!