

Big data, tehnologiile omice și culturi de organe pentru medicina secolului 21

Thomas Hartung este profesor de toxicologie, farmacologie, microbiologie moleculară și imunologie la Bloomberg School of Public Health din cadrul Universității Johns Hopkins din Baltimore și la Universitatea din Konstanz, precum și directorul Centrului pentru alternative la teste pe animale (CAAT) dezvoltat de cele două universități. În cadrul CAAT funcționează consorțiul pentru toxicologia bazată pe dovezi, colaborarea pentru bune practici privind culturile de celule, colaborarea pentru toxicologie ecologică, precum și un grup de lucru pentru rafinare industrială. Conduce proiectul toxomului uman, finanțat de National Institutes of Health. Înainte de Johns Hopkins, a condus centrul Comisiei Europene pentru validarea metodelor alternative la teste pe animale (ECVAM).

A publicat peste 450 de articole științifice și are peste 21.200 de citări; are un indice h de 73 și peste 300 de articole citate de cel puțin zece ori fiecare.

Thomas Hartung a fost prezent recent la Manchester, la EuroScience Open Forum 2016, unde a organizat o serie de sesiuni despre toxicologie și despre studiile preclinice. Cu acest prilej, a acordat un interviu în exclusivitate pentru „Viața medicală”.

– Marea întrebare din cercetarea clinică este: de ce sunt atât de multe studii clinice care nu dau rezultate?

– După cea mai recentă evaluare, 95% din medicamentele care ajung în studiile clinice nu confirmă. E destul de clar că investim bani în substanțele greșite. Și chiar și din medicamentele care reușesc să confirme în studiile clinice, 10% sunt retrase ulterior din cauza efectelor secundare sau a ineficienței, insuficient evaluate anterior. Un articol pe care l-am publicat în 2013 se intitula: „Privind înapoi cu mânie – ce ne spun studiile clinice despre cercetarea preclinică”. Și sunt mai multe motive pentru care modelele animale nu ne reprezintă corect. Să luăm ca exemplu testele de siguranță, bine standardizate și pentru care există proceduri de asigurare a calității. Aceste teste pe animale sunt reproductibile doar în proporție de 70–90%, speciile utilizate nu pot prezice rezultatele obținute la alte specii mai mult de 60% și nu există niciun motiv pentru care ar prezice mai bine rezultatele la om decât pe cele dintre specii diferite. Dar aceleași probleme de reproductibilitate sunt valabile și pentru celelalte metode preclinice. Culturile celulare sunt incredibil de predisuse la apariția de artefacte. Foarte multe cercetări sunt efectuate cu linii celulare care nu sunt ceea ce ar trebui să fie.

– Sunt mai bune?

– Da, sunt mult mai stabile genetic, precum celulele primare. Nu sunt perfecte și probabil că își vor arăta limitele în viitor, dar măcar nu sunt celule tumorale, în care informația genetică a scăpat de sub control.

Problema culturilor celulare

– Chiar există un scandal privind retragerea unor articole care prezentau rezultate obținute pe alte linii celulare decât cele studiate în realitate.

– Exact. Anul trecut, de pildă, s-a făcut evaluarea a patru sute de linii celulare din China și s-a dovedit că 25% din ele erau altceva decât se credea. Să nu arătăm cu degetul spre China, ei doar au avut ideea de a evalua problema. Acum 15 ani, o evaluare făcută de o bancă de celule din Germania a găsit că 28% din celule nu erau ce ar fi trebuit să fie, în unele cazuri până și specia era greșită.

– Cum se poate întâmpla asta? Cum ajungi să ai o linie celulară greșit catalogată?

– În cercetare, se lucrează cu mai multe linii celulare în același timp. Și, dacă nu ești suficient de atent, o singură celulă poate fi transferată dintr-o cultură în alta, folosind aceeași pipetă pentru mediu, de pildă, iar acea celulă unică, având un ritm de creștere mult mai rapid, poate să înlocuiască, în timp, celelalte celule.

– Și cercetătorii nu pot să-și dea seama că se întâmplă o astfel de substituție?

– Doar dacă au suficientă experiență. Dar mai sunt și alte probleme, de etichetare, de exemplu. Apoi, sunt și probleme mai greu de anticipat. Noi, la Johns Hopkins, ne-am confruntat cu o situație care ne-a costat un milion de dolari, bani din cercetare, și doi ani de muncă. Foloseam celule dintr-o linie cu originea în cancerul de sân, MCF-7, pe baza căreia au fost publicate nu mai puțin de 25.000 de articole științifice. Aveam un consorțiu de cercetare și două laboratoare utilizau aceeași celulă. Ele au comandat celule identice, din același lot, de la aceeași bancă de celule. Dar am văzut rapid că rezultatele obținute erau complet diferite. Până și culturile arătau diferit. Am făcut schimb de celule și am văzut că nu era vina laboratoarelor, ci a liniei celulare. Ca să înțelegem ce se întâmpla, am făcut hibridizarea genomică comparativă și am găsit diferențe în opt locusuri din genom, părți mari din genom.

Franken-celule

– Care era explicația?

– În cazul nostru, am putut merge mai departe cu analiza, pentru că ambele laboratoare comandaseră câte două fiole și astfel rămăsesse câte o fiolă nedesfăcută. Și acestea arătau aceleași diferențe. Asta înseamnă că nici măcar celulele înghețate din același lot, la aceeași bancă, nu sunt identice. Fiecare linie celulară devine, în timp, un amestec de diverse subpopulații celulare.

– Și cum se poate preveni o astfel de situație?

– În primul rând, ar trebui să folosim celulele tumorale doar pentru ceea ce sunt – modele de tumori. Prea des, ele sunt utilizate ca model de celule sănătoase. Sunt instabile genetic – toate celulele MCF-7 au o lipsă de 10%



din întregul genom, în 50% din cazuri erau mai puțin de două copii ale unei gene, dar în 30% din cazuri erau creșteri de până la 30 de copii ale unor gene. Sunt „Franken-celule”, nu celule normale. Primul pas deci este să renunțăm la ele.

– Dar în aceeași situație sunt și celulele HeLa, folosite deja de peste șase decade.

– Da, e exact aceeași situație. Doar că sunt cam 70.000 de articole cu celulele HeLa, iar analiza genomică a arătat exact aceleași probleme. Problema noastră este că nu dispunem de celule umane specializate. Din 2006 însă, dispunem și de celule stem pluripotente induse (iPS), deci putem reprograma celule din piele sau din sânge să devină celule embrionare, capabile să producă alte țesuturi.

– Sunt mai bune?

– Da, sunt mult mai stabile genetic, precum celulele primare. Nu sunt perfecte și probabil că își vor arăta limitele în viitor, dar măcar nu sunt celule tumorale, în care informația genetică a scăpat de sub control.

Good Cell Culture Practice

– Apropo de liniile celulare tumorale, unele au fost utilizate la producerea de vaccinuri. Poate fi astfel afectat produsul final?

– Nu m-aș aștepta la asta. Dar trebuie spus că nu mai ai controlul, sistemul nu e neapărat identic. Trebuie să fim mult mai atenți atunci când controlăm identitatea celulelor cu care lucrăm și nu doar să nu le amestecăm între ele, ci și pentru că se pot schimba cu timpul. Tehnologiile standard nu arată aceste diferențe. În esență, cred că ar trebui să trecem la utilizarea celulelor derivate din celule stem.

– Această mutare va crește costul cercetării?

– Da. Dar, dacă iei în calcul cât pierzi pentru că sistemele tale nu sunt reproductibile, cât „zgomet” publici, atunci perspectiva se schimbă. Iar noi am învățat asta în modul cel mai dureros cu puțință. Consorțiul nostru a pierdut peste un milion de dolari fonduri de cercetare și doi ani. Și am fost norocoși să ne dăm seama ce era greșit, pentru că aveam două laboratoare care făceau, în principiu, același lucru. În mod normal, un experiment e făcut de un singur laborator și nu ai cum să identifici o astfel de problemă.

– Dar asta înseamnă că trebuie să reevaluăm ceea ce s-a publicat până acum și ceea ce credem că știm?

– Cred că da, trebuie să fim foarte atenți cu ceea ce s-a publicat, pentru că, de cele mai multe ori, nu avem suficiente informații. Nu e îndeajuns să știi că ai lucrat cu celule MCF-7, trebuie să știi cât de aproape a fost și față de ce clonă și cum a fost controlată cultura. E clar însă că adesea ținem celulele prea mult și se produc mutații. Reguli de bună practică privind culturile celulare (Good Cell Culture Practice – GCCP) formulează o serie de recomandări privind controlul identității celulelor, al infecției cu Mycoplasma – și asta e o altă problemă, trebuie să presupunem că între 15 și 30% din culturile celulare utilizate în prezent sunt infectate cu micoplasme. Infecția schimbă somatic comportamentul celular. Și sunt prea puține laboratoarele care fac screening sistematic pentru această infecție.

– Dar acum este inclus în GCCP?

– GCCP îl cere, dar cine îl aplică? Revistele științifice nu cer acest screening. Dacă însă ar fi parte dintr-un checklist, dacă vreau să public un studiu pe o linie celulară, ar trebui să confirm că am testat pentru micoplasme.

Organe pe cip

– Nici revistele de prestigiu nu solicită aceste precizări?

– Ba chiar dimpotrivă, au descrieri foarte scurte ale metodologiei și această informație este omisă. Comparativ, studiile pe animale sunt

mai avansate, pentru că acolo există, de cinci-șase ani, ghiduri despre cum trebuie raportate rezultatele. Din acest motiv, am profitat de organizarea EuroScience Open Forum, la sfârșitul lunii iulie, la Manchester, și am anunțat crearea unei colaborări internaționale în domeniul GCCP, un efort transatlantic și transparent, de stabilire a standardelor și de extindere a lor la modele derivate din celule stem și la modele de organe „pe cip”. Ne-am propus să finalizăm, în 2017, o versiune nouă a GCCP, iar în paralel dezvoltăm și strategia de implementare. Sperăm ca instituțiile care finanțează cercetarea, precum NIH, să accepte noile ghiduri ca pe o precondiție a finanțării. Este o parte a inițiativei de a face știința mai reproductibilă. De asemenea, dezvoltăm standarde pentru raportarea rezultatelor obținute in vitro. Autorii vor trebui să furnizeze informații asupra sistemelor utilizate, astfel încât rezultatele să poată fi reproduse.

– Sunteți motorul din spatele acestei inițiative, dar aveți și sprijinul centrelor universitare importante din SUA și din Europa?

– Inițiativa nu este una academică, ci mai degrabă a agențiilor și organizațiilor de reglementare.

– Cu alte cuvinte, vreți ca regulile să devină obligatorii pentru oricine aplică pentru fonduri publice?

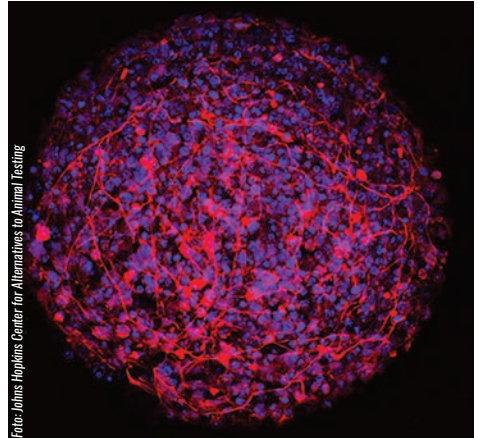
– Acesta ar fi obiectivul. Visăm la impunerea unor standarde care să condiționeze finanțarea și publicarea în revistele de top. Trebuie să promiți și apoi să demonstrezi că munca ta e una de calitate.

– Înțeleg că dezvoltăm sisteme fiziologice umane, care să reflecte nu atât celulele, cât organele și sistemele. Aceasta este marea tendință inovatoare a momentului. Cultura clasică de celule arată ca un ou ochi într-o tigaie. Celulele nu

Minicreierile de la Johns Hopkins

– Recapitulând, în cercetarea preclinică avem probleme cu studiile pe culturi de celule, dar și în studiile pe animale. Ce alternative există?

– Încercăm să dezvoltăm sisteme fiziologice umane, care să reflecte nu atât celulele, cât organele și sistemele. Aceasta este marea tendință inovatoare a momentului. Cultura clasică de celule arată ca un ou ochi într-o tigaie. Celulele nu



În acest minicreier, neuronii (roșu) formează o rețea și comunică între ei. Nucleii sunt colorați în albastru

prea au contact unele cu celelalte, de obicei e un singur tip celular și nu reproducem nimic fiziologic, nici arhitectura tisulară și nici funcția. În ultimii ani, prin combinarea culturilor de celule cu bioingineria, au fost create numeroase „minicreieri”. Acestea pot să reproducă unele funcții ale organului. Noi am reușit să dezvoltăm un model de „minicreier”, plecând de la fibroblaștii recoltați din pielea donatorilor, reprogramați în celule stem pluripotente. Minicreierul rezultat are toate tipurile celulare întâlnite în creier cu excepția microgliilor. Neuronii formează spontan circuite electrice și comunică între ei prin neurotransmițători și prin depolarizarea celulară, deci putem vorbi despre funcționalitatea minicreierului. Cu aceste modele, putem dezvolta studii ale diferitelor boli cu afectare cerebrală, în principiu cu rezultate superioare experimentelor pe animale. Nu este un model complet identic, dar este un echivalent uman.

– Dar vă lipsește și alte lucruri, precum microbiota, implicată în numeroase procese fiziologice, un posibil factor determinant în anumite condiții.

– E un punct important acesta, dar problema exista deja în studiile pe animale. Microbiomul șobolanului nu este similar cu cel uman. Și între doi oameni abia dacă avem o suprapunere de 50%. Dar există micromodele de intestin, care uneori includ microbiota.

Nu suntem șobolani de 70 de kilograme

– Microbiota nu este implicată doar în imunitate, ci și în expresia unor neurotransmițători.

– Ideea corectă este că „toate modelele sunt greșite, dar unele dintre ele sunt folositoare”, un citat celebru din George Box. Nu suntem șobolani de 70 de kilograme și prea des luăm experimentele pe animale ca răspunsuri valabile la om. La fel, nu ar trebui să credem că un experiment pe o cultură celulară, oricât de sofisticată, ne poate oferi toate răspunsurile. Trebuie să înțelegem limitele unui model, reproductibilitatea experimentelor și relevanța lor pentru întrebările la care căutăm răspuns. Cred însă că o combinație inteligentă a acestor metode ne poate ajuta să abordăm fiziologia umană, bolile și tratamentul acestora.

– Credeți că, în timp, aceste modele inteligente vor reduce costurile cercetării biomedicale, care acum se reflectă pe rafturile farmaciilor?

– Sunt foarte sigur de asta. O analiză publicată anul trecut arată că doar în SUA se cheltuiesc 28 de miliarde de dolari anual pentru cercetări biomedicale nereproductibile. Sunt prea mulți bani risipiți pe lucruri de care ne putem lipsi. Construind modele mai relevante și mai robuste, cum sunt minicreierul, avantajele sunt foarte mari. În ultimii 20 de ani, am văzut cum modelele de piele umană produse pe scară largă au dus la o înaltă standardizare a culturilor și au permis utilizarea de produse umane, mai sigure decât cele de origine animală.

– Credeți că industria va adopta aceste metode noi?

– Am văzut un interes crescut și poate nu atât din partea organismelor de reglementare, unde încă mai avem de dus multă muncă de convingere, cât dinspre cercetările de descoperire de noi medicamente. Noile metode promit rezultate mai relevante și interesul e pe măsură.

Zece minicreier pe aceeași platformă

– Dar cât de relevant poate fi modelul unui minicreier într-un vas Petri pentru cercetarea în domeniul creierului?

– Cred că relevanța va fi și mai mare atunci când vom pune minicreierul pe un cip și îl vom perfuza, pentru că vom putea reproduce homeostazia și eventuale modificări în dinamică. Odată ce vom reuși să perfecționăm aceste minicreier, vom trece la combinarea lor, pentru a studia interacțiunile dintre ele. Un program american, realizat la Harvard și MIT, vizează producerea unei platforme pentru zece minicreier, care să „convițuiască” timp de o lună. Minicreierul dezvoltat de noi a fost realizat cu fonduri de la NIH și va fi utilizat în aceste platforme.

– Cum credeți că va funcționa?

– Nu e chiar atât de SF pe cât ați putea crede. O companie din Berlin realizează deja combinații de până la patru organe și are comenzi de la Howard Hughes Institute. Vedem tot mai mult că asemenea coabitări de organe favorizează interacțiuni altfel imposibile de cercetat. Echivalentul ficatului metabolizează medicamentul, care apoi acționează asupra celorlalte minicreier...

Creier la gheață

– Dar unele modele sunt mai ușor de realizat decât altele. Creierul e probabil cel mai greu de realizat.

– Acesta e și motivul pentru care cred că nu orice laborator ar trebui să producă aceste modele de minicreier. Dacă aș vrea să mă pregătesc să produceti minicreieri în laboratorul dv., probabil că perioada de instruire ar fi de cel puțin un an. Trei luni durează numai cultura propriu-zisă. Și sunt ajustări și optimizări de realizat pe parcurs. Noi am reușit să punem la punct o tehnologie de înghețare a acestor minicreieri, ceea ce înseamnă că le putem trimite și către alte laboratoare, unde să fie utilizate după nevoie. Iar această tehnică de preservare e importantă și pentru realizarea platformei multiorgan. Nu vor fi multe centre capabile să producă zece organe și să le aibă pe toate la dispoziție la momentul potrivit. Și dacă rinichiul brusuc nu merge, ce se întâmplă? Tot experimentul eșuează.

– Această tehnică de înghețare ar putea fi utilizată și pentru transportul organelor prelevate pentru transplant?

– Mă îndoiesc. Tehnica noastră se bazează pe mărirea acestor minicreier, cu dimensiunea de trei-cinci micrometri. Tocmai mărirea lor ne permite să le congelăm într-o manieră sincronizată, fără formarea de cristale de gheață. Ar fi foarte dificil să controlăm congelarea unui organ în mărime naturală. Revenind la modelul nostru de minicreier, el este utilizat pentru cercetarea privind virusul Zika.

– Cum ajută acest model studiile cu Zika?

– Am realizat deja studii de infecție a modelului nostru cu virusul Zika și cu virusul JC și am observat că aceste virusuri cresc pe minicreiere. Sperăm ca astfel să poată fi cercetate strategii antivirale. În Brazilia, de pildă, se folosește modelul creat de noi pentru a studia succesul vaccinării împotriva virusului Zika. Mai exact, folosind serul animalelor și apoi al oamenilor vaccinați, putem prezice capacitatea de protecție împotriva infecției folosind minicreiere. Ar fi, practic, un instrument care să ne permită identificarea rapidă a celui mai bun vaccin.

Modele in silico

– Pe lângă aceste minicreier, nu ar putea fi utilizate și modele in silico mai complexe ale organelor, date fiind progresele tehnologiei de procesare a informației?

– Într-adevăr, aceasta este o altă tehnologie inovatoare, chiar dacă modelele propriu-zise nu sunt încă foarte avansate. În Germania, există un mare proiect pentru un model in silico de ficat, iar agenția americană de protecție a mediului lucrează la un model embrionar virtual. Nu e deloc simplu. Însă dispunem tot mai mult de mari seturi de date. În februarie, de exemplu, am anunțat că am reușit să creăm cea mai mare bază de date cu studii de toxicologie. Am putut accesa baza de date a agenției europene de chimie (ECHA) și am făcut-o „citibilă” pentru computer. Erau zece mii de substanțe chimice în baza de date și opt sute de mii de studii toxicologice. Problema era că datele erau disponibile ca text. Noi nu doar că am transformat-o într-o bază de date, ci am folosit procesarea limbajului natural cu inteligență artificială. Astfel, am putut arăta că algoritmi foarte simpli, bazați pe similaritatea structurii chimice, ating un nivel de predictibilitate similar testelor pe animale.

– Și aici trebuie spus că datele existente sunt obținute în teste realizate pe animale sau persoane sănătoase, iar anumite condiții precum simpla temperatură a mediului pot influența dramatic toxicitatea unor compuși și modul în care aceștia penetrează de pildă bariera hematoencefalică.

– Sunt multe date care încă necesită clarificare. Nu vom trăi niciodată într-o lume care să aibă toate răspunsurile. Dar putem începe prin rezolvarea problemelor mari și putem dezvolta strategii pentru rezolvarea celorlalte. Modelele computaționale au și ele problemele lor, nu pot fi mai bune decât datele pe care le introducem. Putem lua internetul ca exemplu. Sunt miliarde de pagini, din care multe nu sunt bune, dar multe altele sunt. Prin abordarea bazată pe inteligența artificială, cum este motorul utilizat de Google, obținem rezultate foarte bune între primele pagini, atunci când căutăm ceva. Dintr-o mulțime de date, putem astfel extrage informație cu sens.

– Dar aveți nevoie de algoritmi foarte buni.

– Utilizăm exact aceiași algoritmi, pentru a extrage informația care ne interesează, chiar dacă seturile de date nu sunt complete.

Proiectul toxomului uman

– Datele acestea vor fi utilizate și în Proiectul toxomului uman?

– Proiectul toxomului uman este un consorțiu care încearcă să folosească tehnologiile omice, o altă cale de a genera seturi foarte mari de date. Prin tehnologia de astăzi, poți măsura expresia genetică din fiecare țesut. Rezultatele sunt însă foarte puternic bruțate: măsoară 27.000 de gene și numărul de măsurători pe care le poți face e prea mic pentru a da un răspuns. Combinând însă transcriptomica și metabolomica, putem studia suprapunerile și astfel identifica perturbările la nivel de genă; dacă în același pas se schimbă și metaboliții, e clar că acolo se întâmplă ceva. Această combinație de tehnici omice poate identifica mecanismele și utilizăm aceiași algoritmi de procesare pentru a găsi sensul acestor volume uriașe de date. De altfel, așa am și reușit să găsim problemele din modelul MCF-7 și am realizat ce greșeală am făcut utilizând acea linie celulară. Dar, trăgând linie, de fapt vorbim de câteva tehnologii inovatoare – big data, tehnologiile omice, tehnologiile de culturi celulare care au devenit aproape culturi de organe, acestea sunt tehnologiile secolului 21.

– Și le vedeți având și un impact clinic?

– Da, producem date mai relevante, care vor îmbunătăți procesul de descoperire de noi medicamente. Dar asta rămâne să vedem. Dacă începem astăzi să dezvoltăm noi medicamente, ele vor ajunge pe piață abia peste doisprezece ani. Abia atunci vom putea spune că toate aceste tehnologii vor fi avut impact clinic. Să luăm exemplul minicreierului: 20% din studiile clinice vizează bolile creierului. Există deja analiza care arată că problema principală de până acum erau modelele animale. Un model bun ne va ajuta să progresăm mai repede în boli precum Alzheimer, Parkinson sau chiar în accidentele vasculare cerebrale. Medicina secolului 21 are nevoie de instrumentele secolului 21. Mai ales în culturile de celule, înregistrăm multe promisiuni neonorate. Și avem acum șansa să dezvoltăm un instrument foarte util, care să compenseze nu doar neajunsurile culturilor celulare, ci și pe cele ale studiilor pe animale, ajutându-ne să trecem mai repede la teste pe oameni. Dar este nevoie ca întreaga comunitate internațională, cercetători, organisme de reglementare și finanțatori să adopte aceste tehnologii noi.

Aurel F. MARIN