



Instrumente Structurale  
2014-2020

# Newsletter

## GammaPlus



GammaPlus

# 19

## Creșterea competitivității prin inovare și îmbunătățirea proceselor de fabricație cu iradieri gamma tehnologice

### Editori:

- **Valentin Moise**, Cercetător Științific gr. III la IFIN-HH IRASM
- **Mihalis Cutrubinis**, Cercetător Științific gr. III la IFIN-HH, Departamentul de Iradieri Tehnologice IRASM
- **Mihaela Ene**, Cercetător Științific gr. III la IFIN-HH, Departamentul de Iradieri Tehnologice IRASM
- **Diana Savu**, Cercetător Științific gr. III la IFIN-HH Departamentul de Fizica Vieții și a Mediului

30 Martie 2022

## Testul in vitro de iritație cutanată pentru dispozitive medicale: modele de epidermă umană reconstruită

Testarea iritației cutanate este o componentă importantă în evaluarea siguranței dispozitivelor medicale, având drept scop sănătatea oamenilor. În general, astfel de testări sunt efectuate pe extracte lichide obținute din dispozitivele medicale sterilizate sau din componente ale acestora. Pentru a simula condițiile in vivo, de contact cu sângele sau cu țesuturile, se folosesc solvenți polari sau nepolari. Extractele obținute din dispozitivul medical pot conține substanțe care ar putea să fie eliberate în corpul pacientului în timpul utilizării respectivului dispozitiv medical.

Iritația cutanată înseamnă producerea de leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat timp de patru ore. 1 Evaluarea iritației cutanate a implicat utilizarea animalelor de laborator, testarea extractelor din dispozitive medicale efectuându-se pe iepuri, fie prin aplicare topică, fie prin injecție intradermică. 2 Testul de iritare cutanată efectuat pe iepuri este subiectiv și predispus rezultatelor fals pozitive. Destul de multe rezultate pozitive s-au dovedit a fi false, în primul rând deoarece pielea iepurilor conține de 40-70 ori mai multe fire de par per centimetru pătrat decât pielea umană și deoarece stratul cornos și epiderma umană sunt de câteva ori mai groase decât la iepure. Diferențele anatomice pot fi motivele reale pentru care testul de iritație pe iepuri are o slabă acuratețe predictivă. Pielea subțire a iepurelui oferă o funcție de barieră mai slabă decât la om, iar densitatea mai mare a firelor de păr crește porozitatea pielii, oferind astfel căi suplimentare pentru substanțele chimice iritante să ajungă și să afecteze straturile mai profunde, active din punct de vedere metabolic, ale epidermei. Din aceste motive, au fost căutate, validate și acceptate metode alternative la acest test de iritare in vivo.

Ghidul OECD 439 descrie metode de testare a iritației cutanate folosind modele de epidermă umană reconstruită (RhE). 3 Metodele de testare pe RhE asigură proceduri in vitro care pot fi folosite pentru identificarea riscurilor pe care le prezintă substanțe și amestecuri chimice iritante. Modele produse cu celule umane reproduc morfologia și caracteristicile epidermei umane. Inițial, modelele RhE au fost folosite pentru a identifica potențialul iritant al chimicalelor folosite în scopuri industriale, pentru produse de consum sau cosmetice. De aici a pornit ideea folosirii modelelor RhE și în testarea iritabilității extractelor din dispozitivele medicale. În acest caz însă, extractele reprezintă diluții ale unor amestecuri complexe, și atunci, deși se urmărește același principiu al viabilității celulare, metoda de testare RhE ar putea suferi unele modificări.

Modelele RhE in vitro au multe avantaje față de cele in vivo, deoarece acestea pot fi realizate mai rapid, mai ușor și reproductibil, deci oferă un avantaj suplimentar în reducerea necesității studiilor pe animale. În plus, este mai ușor de realizat evaluarea histologică pe secțiuni RhE.

Cele mai utilizate modele in vitro RhE sunt EpiDerm® și SkinEthic®, ambele compuse exclusiv din cheratinocite epidermice umane netransformate care reconstruiesc în trei dimensiuni epiderma umană normală și care conțin toate straturile de celule viabile (stratul bazal, stratul spinos și stratul granulos) și neviabile (stratul cornos). Ambele modele au fost validate de către EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing) pentru determinarea iritației cutanate a chimicalelor și sunt incluse în OECD 439 și în EU Guideline B.46.4 Rezultatele unui am-

plu studiu în care au fost testate cele două modele RhE au arătat că acestea pot fi de asemenea folosite pentru determinarea prezenței chimicalelor iritante extrase din materiale polimerice (PVC și silicon), de obicei folosite în fabricarea dispozitivelor medicale.

Modelele sunt active din punct de vedere metabolic și mitotic, au un profil al lipidelor și ceramidelor similar celui al epidermei umane normale și exprima markeri ai diferențierii epidermice normale, cum ar fi cheratina. Modelele se cultivă în mediu fără ser și au un grad de reproductibilitate mare de la un lot la altul. Aceste modele permit ca atât extractele polare (e.g. salin) cât și cele nepolare (e.g. ulei de susan) să fie direct aplicate pe suprafața apicală a construcțiilor RhE. Materialele care nu pot fi supuse extracției (e.g. lichide, geluri, paste, particule) pot fi aplicate în acest sistem de testare, cu condiția să se asigure date de validare care să demonstreze abilitatea testului de a detecta activitatea iritantă a acestor forme de materiale, înainte de testare. Metoda nu este aplicabilă pentru gaze și aerosoli. De asemenea, nu este considerată aplicabilă pentru a evalua iritația prin contact direct cu un material solid.

Iritația cutanată indusă de chimicale, manifestată în principal prin eritem și edem, este rezultatul unei cascade de evenimente începând cu pătrunderea substanțelor chimice prin stratul cornos, unde acestea pot deteriora straturile de cheratinocite și de alte celule din piele. Celulele deteriorate fie pot elibera mediatori inflamatori, fie pot induce o cascadă inflamatorie care acționează și asupra celulelor din dermă, în special asupra celulelor stromale și endoteliale ale vaselor de sânge. Dilatarea și permeabilitatea crescută a celulelor endoteliale sunt cele care produc eritemul și edemul observat. 6 În cazul special al metodelor de testare bazate pe RhE, în absența vascularizării în sistemul de testare in vitro, se măsoară doar evenimentele inițiale în cascadă, de exemplu deteriorarea celulelor folosind viabilitatea celulară ca parametru de citire.

Cu toate acestea, metodele de testare in vitro bazate pe RhE s-au dovedit a fi la fel de sensibile în detectarea concentrațiilor scăzute ale unor compuși puternic iritanți, ca și testul cu platură (patch test) sau ca testul intracutanat pe iepuri. Prin urmare, noile regulamente și standarde subliniază că o abordare treptată pentru testarea iritanților poate începe cu modelul RhE in vitro.

### Bibliografie

1. Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului, JO L 353/1, 31.12.2008.
2. Directive 2010/63/EC of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals used for Scientific Purposes, L276 2010 Oct 20.
3. OECD (2021), Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
4. De Jong, W. H., Hoffmann, ... & Coleman, K. P. (2018). Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RhE) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. *Toxicology in Vitro*, 50, 439-449.

**Maria Adriana Acasandrei, specialist biocompatibilitate**  
e-mail: [macasan@nipne.ro](mailto:macasan@nipne.ro)  
<http://gammaplus.nipne.ro/>

## Stabilirea proprietăților antimicrobiene pentru produse sau extracte - metode, matrici, limitări

Scopul principal al testării susceptibilității antimicrobiene este să se determine dacă microorganismele izolate pot să exprime rezistența la anumiți agenți antimicrobieni care pot fi potențiali agenți terapeutici utilizați în tratarea infecțiilor. Rezistența intrinsecă a microorganismelor este de obicei cunoscută pentru cele mai multe dintre ele, astfel încât de obicei nu este necesară testarea ci doar identificarea microorganismelor.

Pentru a controla impactul factorilor de mediu, condițiile de testare au fost standardizate. Standardizarea are cel puțin următoarele trei scopuri:

- optimizarea condițiilor de creștere a microorganismelor astfel încât inhibarea creșterii să fie atribuită agentului antimicrobian și nu limitării date de nutrienți, temperatură sau atmosferă;
- optimizarea condițiilor pentru menținerea integrității și activității antimicrobiene astfel încât lipsa inhibiției de creștere să poată să fie atribuită mecanismelor de rezistență a microorganismelor și nu inactivării agentului antimicrobian;
- reproductibilitatea rezultatelor astfel încât același microorganism să producă același profil de rezistență indiferent de laboratorul care efectuează testul.

Următoarele aspecte pentru determinarea susceptibilității antimicrobiene sunt standardizate și controlate: concentrația inocului de microorganism, mediul de cultură (în funcție de microorganismul test), temperatura și atmosfera de incubare, durata de incubare, concentrația agentului antimicrobian.

Deși condițiile de testare in vitro sunt standardizate, există limitări. Cea mai notabilă este că prin condițiile de laborator nu pot fi atinse condițiile in vivo de la locul infecției. Concentrația de microorganisme, pH-ul, atmosfera de oxigen pot să difere în funcție de locul infecției. Cu toate acestea scopul testării susceptibilității in vitro furnizează date care sunt corelate cu alte informații despre diagnostic pentru optimizarea terapiei.

În general, toate metodele de testare a sensibilității necesită criterii de interpretare, astfel că după rezultatele testelor microorganismele pot fi interpretate ca sensibile sau rezistente.

### I. Metoda difuzimetrică (Antibiograma)

A fost dezvoltată în 1940 și este metoda oficială folosită în multe laboratoare de microbiologie clinică pentru testarea de rutină a activității antimicrobiene. Este o metodă simplă și rapidă care permite determinarea a spectrului de sensibilitate a microorganismului în vederea calculării dozelor terapeutice de antibiotice.

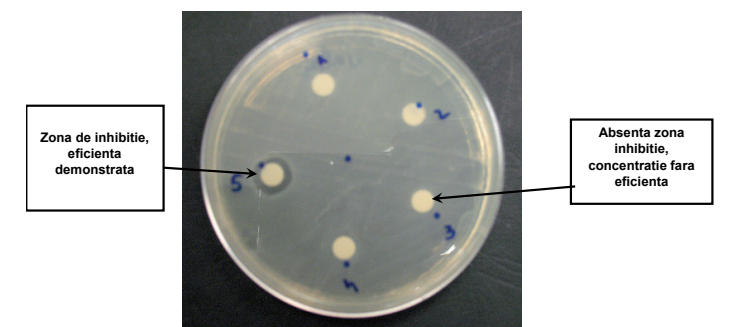
În această procedură, plăcile de agar sunt inoculate "în panză" cu un inocul standard de microorganism test. Ulterior, pe suprafața agarului sunt adăugate la distanțe egale discuri de hârtie de filtru cu diametrul de aproximativ 6 mm, impregnate cu substanță de interes cu concentrația cunoscută. Antibioticul impregnat difuzează în mediu, realizând un gradient de concentrație invers proporțional cu diametrul zonei de inhibiție (distanța față de disc). Dacă tulpina este sensibilă la un anumit antibiotic, creșterea microbiană este inhibată pe o anumită suprafață în jurul discului, suprafața denumită zonă de inhibiție a creșterii.

Plăcile Petri sunt incubate în condiții specifice. În general, agentul antimicrobian difuzează în agar și inhibă creșterea microorganismului. Sunt măsurate diametrele zonelor de inhibiție.

Testarea sensibilității microbiene cu discuri trebuie făcută cu organisme standard de control, Tulpini de Referință (ATCC).

Interpretarea rezultatelor se face în funcție de dimensiunea zonelor de inhibiție a creșterii, exprimând rezultatul cu termenii de tulpină sensibilă (S), intermediar sensibilă (I) sau rezistentă (R) corespunzătoare standardelor (CLSI, EUCAST). Se măsoară diametrul zonei de inhibiție inclusiv diametrul discului. Marginea este considerată zona fără creștere vizibilă care poate fi observată cu ochiul liber. Apariția coloniilor la marginea sau în interiorul zonei de inhibiție se poate datora următorilor factori: cultura mixtă, apariția de celule mutante rezistente.

Cel mai mare dezavantaj al metodei este lipsa criteriilor de interpretare pentru microorganismele care nu sunt incluse în standard și limitărilor privind nivelul de rezistență al microorganismelor care poate fi obținut doar prin metodele MIC.



**Fig.1.** Metoda difuzimetrică. Placa de Muller-Hinton agar în sămânțată cu *Escherichia coli* (ATCC 8739)

Metoda difuzimetrică oferă multe avantaje față de alte metode: simplitate, costuri mici, posibilitatea de a testa un număr mare de microorganisme și de substanțe cu proprietăți antimicrobiene, ușurință de interpretare a rezultatelor, studiile au arătat că există o bună corelație între rezultatele obținute in vitro și evaluția in vivo. Aceste avantaje fac această metodă să fie aplicată cu succes pentru screeningul activității antimicrobiene pentru următoarele categorii de substanțe: extracte din plante, uleiuri esențiale, substanțe farmaceutice.

În microbiologia clinică, metoda difuzimetrică standardizată este aplicată pentru determinarea sensibilității la substanțe antimicrobiene a celulelor bacteriene în stare planctonică (nu aderată în biofilm).

### II. Metoda diluțiilor

Pentru această metodă microorganismul test este pus în contact cu agentul antimicrobian, în mediu lichid. Fiecare agent antimicrobian este testat folosind un interval de concentrații exprimate ca  $\mu\text{g}$  de substanță per mililitru de mediu ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Concentrațiile testate diferă de la o substanță la alta. De obicei intervalul de concentrații testate reprezintă o serie de diluții binare (16, 8, 4, 1, 0.5, 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cea mai mică concentrație de substanță care inhibă complet creșterea vizibilă se numește concentrație minimă inhibitoare sau MIC.

Condițiile de cultivare a microorganismelor trebuie adaptate pentru a optimiza dezvoltarea microorganismelor, chiar și a



celor pretențioase, fără să interfere cu activitatea antimicrobială. Muller Hinton este mediul standard folosit pentru metoda diluțiilor dar se pot folosi medii suplimentate sau alte medii.

Metoda diluțiilor este de două feluri: microdiluții și macrodiluții. Principiul testului este același, singura diferență fiind volumul de mediu în care este dizolvat agentul antimicrobian.

Odată stabilită MIC, rezultatul este interpretat ca susceptibil, intermediar sau rezistent. Criteriile de interpretare sunt descrise în standarde. Determinarea MIC se utilizează pentru stabilirea dozei terapeutice și a căii de administrare în cazul infecțiilor severe. Metoda diluțiilor furnizează atât rezultate calitative cât și cantitative.

Este cunoscut faptul că volumul inoculului, tipul mediului de cultură, timpul de incubare pot influența valorile MIC. De aceea metoda diluțiilor a fost de asemenea standardizată de CLSI pentru creșterea bacteriilor aerobe, drojdiilor și fungilor filamentoși.

Determinarea MBC (concentrația minimă bactericidă/fungicidă) este cea mai comună evaluare a activității bactericide/fungicide. Este definită ca fiind cea mai mică concentrație de agent antimicrobian necesar pentru a omora 99.9% dintr-un inocul, după 24h de incubare, în condiții standard de incubare. Se determină prin subcultivarea probei din tuburile/godeurile de diluție, pe un agar neselectiv.

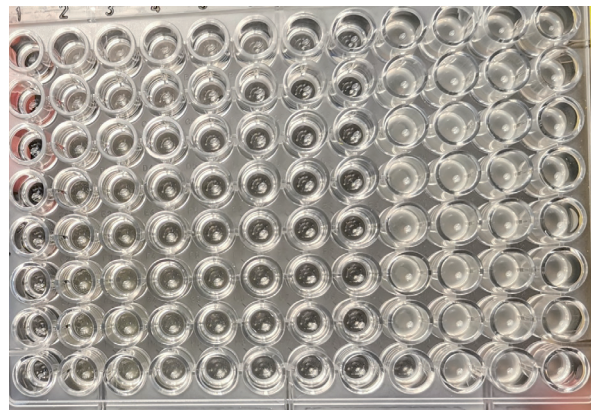


Fig.2. Metoda microdiluțiilor în placa cu 96 de godeuri

### III. Time kill test (time kill curve)

Testul time kill este cea mai adecvată metodă de determinare a efectului bactericid/fungicid. Prin această metodă se obțin informații dinamice interacțiilor dintre agentul antimicrobian și specia/tulpina microbiană. Metoda pune în evidență dependența de timp sau de concentrație a agentului antimicrobian. Testul este de asemenea standardizat. Primul și al doilea godeu conține extractul/agentul antimicrobian cu concentrațiile finale de 0.25 x MIC și 1 X MIC iar al treilea godeu este considerat controlul pozitiv. Incubarea se face în condiții specifice la mai multe intervale de timp. Procentul de celule moarte este calculat față de control determinând numărul de celule vii (CFU/ml) utilizând metoda culturii în mediu agar. Efectul bactericid este calculat pentru 90% celule moarte în 6h. care este echivalent cu 99,9% celule moarte în 24h.

### IV. Metoda substratului toxic (Poisoned food method)

Este cea mai folosită metodă pentru a evalua efectul antifungic. Agentul antifungic sau extractul este încorporat în mediul agar lichid care are concentrația finală dorită. Mediul este apoi turnat în plăci Petri. Se inoculează în centrul agarului un "disc" de miceliu care să aibă diametrul între 2-5 mm. După incubare în condiții specifice speciei testate, se măsoară diametrul culturii test și al

culturii control iar efectul antifungic se calculează aplicând o formulă specifică.

### V. Determinarea efectului bactericid/fungicid pentru produsele medicinale antiseptice

Pharmacopoeia Europeană descrie metode pentru stabilirea efectului bactericid/fungicid pentru produsele medicinale miscibile cu apă, cu administrare prin contact direct pe piele (dezinfecțanți). Metoda de testare depinde de activitatea antimicrobiană declarată a produsului. Testul stabilește dacă un produs are sau nu activitate antimicrobiană și se încadrează în limitele stabilite pentru acesta activitate.

Activitatea antimicrobiană se determină prin adăugarea unei suspensii de microorganisme (bacterii, fungi sau drojii) peste proba din produsul antiseptic. Amestecul se menține în contact la 33 oC timp de 5 min pentru activitatea bactericidă și timp de 15 min pentru activitatea fungicidă. Sunt permisi și alți timpi de contact în funcție de modul de utilizare a antisepticului respectiv. La sfârșitul timpului de contact activitatea antimicrobiană este blocată imediat prin metode validate. Sunt aplicabile două metode: neutralizarea și filtrarea. Testul se validează astfel încât să poate fi demonstrată reducerea numărului de microorganisme vii prin asocierea de controale adecvate.

### Concluzii

Dezvoltarea continuă de produse cu proprietăți antimicrobiene a dus la dezvoltarea de noi metode pentru stabilirea susceptibilității antimicrobiene. Unele metode au fost standardizate (ex: CLSI) ceea ce a însemnat un progres deosebit și a dus la posibilitatea comparării rezultatelor de la un laborator la altul. Deși în cazul anumitor substanțe sau extracte poate fi necesară modificarea anumitor condiții de testare, este esențial ca anumite condiții să rămână nemodificate (ex. concentrația mediului de cultură sau folosirea unui inocul de microorganisme mai concentrat)

### Bibliografie

- Bailey and Scott's - Diagnostic microbiology, eleventh edition
- European Pharmacopoeia, ed a 10 a
- M Balouiri, M Sadiki, SK Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, Journal of pharmaceutical analysis, 2016
- CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition, in CLSI document M07-A9. 2012: Wayne, PA, USA.

Laura Trandafir, biolog, analist microbiologie  
e-mail: [laura.trandafir@nipne.ro](mailto:laura.trandafir@nipne.ro)  
Florina Zorilă, biolog, analist microbiologie  
e-mail: [florina.zorila@nipne.ro](mailto:florina.zorila@nipne.ro)  
<http://gammaplus.nipne.ro>

## Rezistența bacteriană: scăderea incidenței apariției ei prin tratarea apelor reziduale menajere cu radiații ionizante

Odată cu descoperirea lor în 1923, antibioticele au revoluționat atât societatea în care trăim cât și economia, prin mărirea speranței de viață. Această descoperire reprezintă un mare pas evolutiv, deoarece boli, care înainte erau mortale, au devenit ușor de tratat cu minim efort.

Industria farmaceutică, atât partea de cercetare cât și partea de producție, reprezintă una dintre cele mai importante industrii de pe planetă, cu investiții de miliarde de dolari.

Totuși, orice poveste frumoasă își are partea ei urâtă, iar pentru producția de antibiotice aceasta este reprezentată de apariția și perpetuarea accelerată a bacteriilor rezistente la antibiotice. Rezistența antimicrobiană este abilitatea microorganismelor de a rezista tratamentului cu diferiți agenți antimicrobieni față de care acestea prezentau anterior sensibilitate și care este o consecință a selecției naturale și a mutațiilor genetice ce s-au perpetuat în populația bacteriană. Procesele de selecție naturală sunt amplificate și de factori umani cum ar fi: utilizarea antibioticelor (veterinare sau umane) fără prescripție medicală sau condiții sanitare precare [1].

De-a lungul timpului, apariția rezistenței face ca antibioticele să fie mai puțin eficiente și, în cele din urmă, inutile, astfel că, actual, rezistența antimicrobiană a ajuns o provocare serioasă la nivel global [1], care necesită cercetări suplimentare (fig. 1).

Prin definiție, antimicrobienele includ antibiotice, antivirale, antifungice și antiprotozoare. Acestea sunt substanțe active de origine naturală și sintetică, ceucid sau inhibă creșterea microorganismelor.

Stabilitatea chimică metabolică a unor antibiotice înseamnă că până la 90% din ingredientul activ este excretat în forma sa originală. Procesele de tratare a apelor uzate variază în capacitatea sa de a elimina reziduurile farmaceutice în funcție de substanță și de nivelul de epurare, dar nici cea mai scumpă epurare actuală nu este eficientă 100% [2].

Utilizarea de antimicrobiene în acvacultură reprezintă un pericol pentru sănătatea publică prin dezvoltarea și răspândirea bacteriilor rezistente, a genelor de rezistență și a apariției reziduurilor antimicrobiene în produsele de acvacultură.

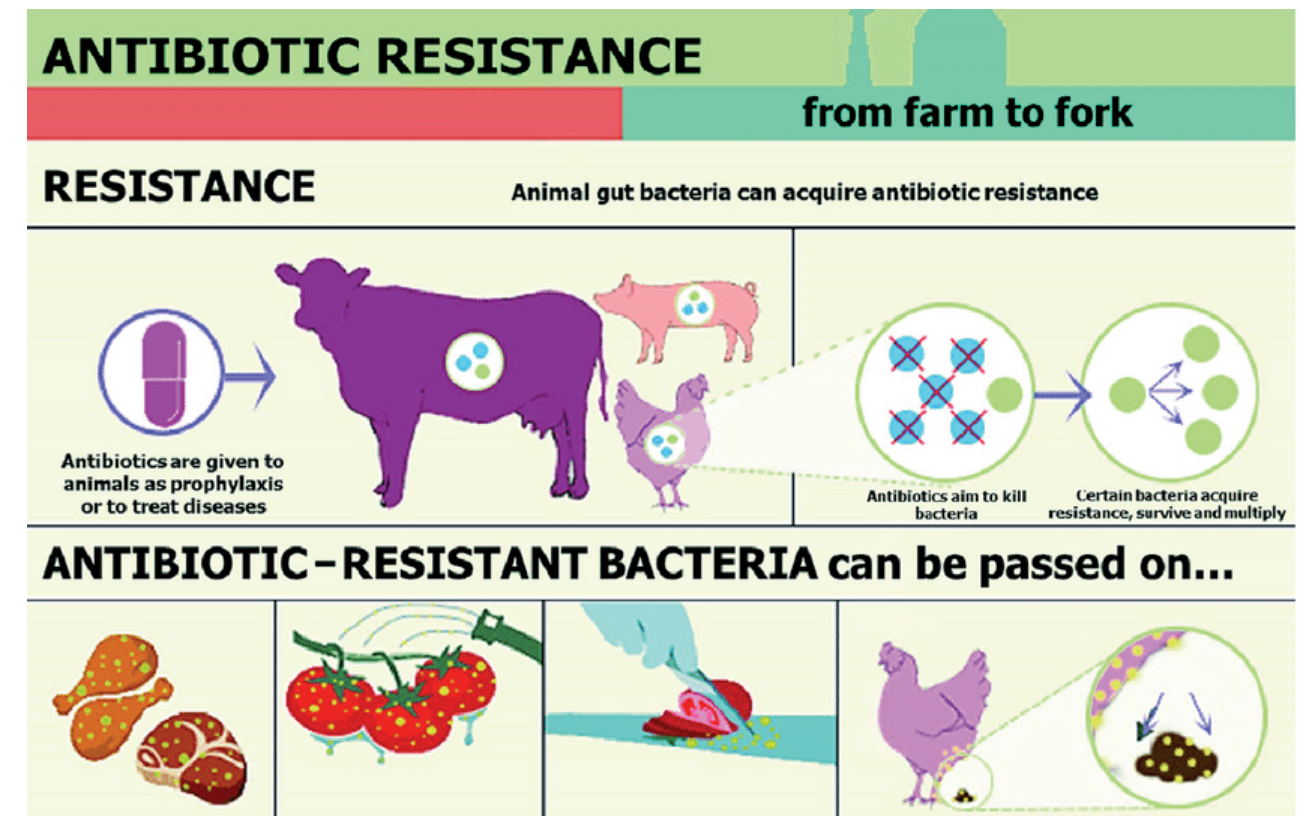


Fig.1. Transmiterea și propagarea bacteriilor rezistente la antibiotice [1].

Agenții antimicrobieni pot determina o creștere a prevalenței bacteriilor rezistente în mediile acvatice din care o astfel de genă poate fi diseminată prin transfer orizontal de gene către alte bacterii și în cele din urmă să ajungă la agenții patogeni umani [4].

Răspândirea directă a rezistenței antimicrobiene se poate produce prin consumul de produse alimentare de acvacultură,

prin apă potabilă sau, de asemenea, prin contact direct cu apa sau prin manipularea produselor alimentare de acvacultură.

Studiile au demonstrat că plasmidele care adăpostesc determinanții de rezistență sunt transferabili de la agenții patogeni de pești și bacteriile acvatice, la *E. coli*. S-a demonstrat că plasmidele cu rezistență multiplă sunt transferabile la *E. coli* din *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsi-*



*Ila tarda, Citrobacter freundii, Photobacterium damsela subsp. piscicida, Vibrio anguillarum și Vibrio salmonicida* [2].

Plasmidele cu gene de rezistență diferite au fost transferate, in vitro, de la diverși agenți patogeni de pești, la patogeni umani. Genele de rezistență la tetracicline au fost transferate de la tulpini marine de *Photobacterium, Vibrio, Altromonas* și *Pseudomonas*, la *E. coli*.

Antibioticele persistă în mediu și se pot răspândi prin apă și sol și, de asemenea, se pot acumula în plante și animale. De exemplu, peștii masculi expuși la concentrații scăzute ale unor pilule contraceptive pot deveni feminizați ca urmare a efectului său asupra sistemului endocrin care afectează capacitatea unei populații de a se reproduce [3].

Pentru a preveni persistența reziduurilor de antibiotice, au fost propuse unele procese de tratare care să le îndepărteze din mediile apoase, în principal din apele uzate. Între ele, **iradierea gamma**. Descompunerea antibioticelor folosind radiații gamma ionizante are unele limitări din cauza produselor secundare de descompunere, a toxicității acestora și, de asemenea, a capacității lor de a acționa ca presiune de selecție pentru gena de rezistență.

De asemenea, se apreciază că o doză mare de iradiere nu este fezabilă din punct de vedere economic, din cauza costului ridicat pentru funcționarea unei instalații de tratament gamma [6].

Au fost efectuate mai multe studii privind degradarea antibioticelor cu radiație gamma folosind un fascicul de electroni pe soluție apoasă și, de asemenea, iradierea gamma cu <sup>60</sup>Co a matricelor alimentare reale cu concentrație scăzută de antibiotice, iar rezultatele sunt promițătoare. Astfel de instalații obțin degradarea unor antibiotice (cloramfenicol, amoxicilină, ciprofloxacina și doxiciclină) cu o eficiență de îndepărtare de peste 90% la doze de iradiere cuprinse între 1 și 10 kGy [5].

Unul dintre cele mai importante obiective în iradierea apelor reziduale este neutralizarea efectului antimicrobian al antibioticelor.

După iradierea antibioticului, se obține inițial o „supă” complexă de produși secundari, o parte din ei reactivi chimic. Interacțiunea dintre acești produși secundari va crea alți compuși, dar, în această etapă, nu știm dacă activitatea antimicrobiană este încă acolo sau nu. Pentru a afla dacă procesul de iradie-

re realizează descompunerea eficientă a antibioticului trebuie efectuată o **antibiogramă**.

Contaminarea apelor reziduale și a mediilor acvatice cu antibiotice este o problemă ce evoluează rapid, deoarece acestea sunt persistente în mediu și determina apariția fenomenului de **rezistență bacteriană la antibiotice**.

Radiația ionizantă poate fi o soluție pentru a degrada aceste antibiotice, contribuind astfel la stoparea apariției de microorganisme rezistente la antibiotice.

S-a demonstrat faptul că procesul de degradare a antibioticelor folosind radiația ionizantă, combinat cu procese de complexare chimică a antibioticelor dar și cu procese biologice măresc gradul de degradare și determină apariția unor concentrații scăzute de compuși secundari de degradare [6].

#### Referințe

- 1 - Eleni Likotrafti et. all. Risk assessment of antimicrobial resistance along the food chain culture-independent methodologies, EFSA Journal, 2018.
- 2 - Sørnum, Henning. Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens. In: Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal origin, editor F. Aarestrup. ASM Press. Washington DC, USA. 2006.
- 3 - Antti Karkman et. all., Antibiotic-Resistance genes in waste water, trends in Microbiology, 2018, vol. 26, no.3
- 4 - Fernando Baquero et. all., Antibiotics and antibiotic resistance in water environments, Current Opinion in Biotechnology 2008, 19:260-265
- 5 - Omar A. Alsager et. all., Decomposition of antibiotics by gamma irradiation: kinetics, antimicrobial activity and real application in food matrices, Chemical Engineering Journal 338 (2018) 548-556
- 6 - Jianlong Wang et. all., The occurrence, distribution and degradation of antibiotics by ionizing radiation: An overview, Science of the Total Environment 646 (2019) 1385-1397.

**Dr. Mihai Constantin, Cercetător Științific IRASM,**  
e-mail: [mconstantin@nipne.ro](mailto:mconstantin@nipne.ro)  
<http://gammaplus.nipne.ro>

## Importanța determinării profilului de aminoacizi din collagen

Colagenul, una dintre proteinele care au atras recent atenția atât din punct de vedere al sănătății cât și frumuseții, este una dintre cele mai abundente proteine animale. Există cel puțin 27 de tipuri diferite de collagen, denumite tip I, II, ..., XXVII. De exemplu, tipul I este format din trei lanțuri polipeptidice și se găsește în țesuturile conjunctive, inclusiv în tendoane, oase și piele. Triplul helix al collagenului este compus din trei lanțuri de procolagen interconectate prin legături covalente formate din molecule de glicină dispuse concentric. Structura regulată a helixului este întreruptă de serină, treonina, prolina și hidroxiprolina. Primii doi aminoacizi acționează astfel datorită legăturilor de hidrogen suplimentare formate de grupările lor hidroxil. În cazul prolinei, atomul de azot este încorporat într-un inel heterociclic ceea ce elimină posibilitatea de rotație în jurul legăturii de azot carbon și previne formarea legăturilor de hidrogen intramoleculare. Din punct de vedere comercial, collagenul a fost izolat din pielea unor mamifere precum vaca sau porcul și a fost utilizat pe scară largă în industria alimentară, farmaceutică, cosmetică și biomedicală. Însă utilizarea acestuia a fost limitată de apariția unor boli extrem de infecțioase și contagioase precum encefalopatia spongiformă bovină, encefalopatia spongiformă transmisibilă sau boala alimentară și bucală la porci și bovine. Așadar, este deosebit de important să fie cunoscută atât originea collagenului cât și sterilizarea acestuia.

Indiferent de origine, collagenul este format din 19 aminoacizi, inclusiv hidroxiprolina care nu se găsește în alte proteine, aceasta având rol în stabilitatea proteinei collagenului. În ceea ce privește alți aminoacizi, alanina este precursorul limitator al carnozinei, responsabil de homeostazia acido-bazică în mușchii scheletici, având efect ergogen; arginina este importantă pentru vindecarea rănilor, pentru a construi masa corporală sau pentru sănătatea vasculară; glicina este antiinflamatoare, importantă pentru un sistem nervos sănătos și sănătatea celulară; acidul glutamic este important pentru sănătatea sistemului imunitar și digestiv, precum și în vederea producerii de energie. Pentru a analiza aminoacizii constituenți ai proteinelor sau peptidelor, precum collagenul, este necesară prepararea probei prin hidrolizare.

Hidrolizatele proteice sunt constituite în principal din aminoacizi și, eventual, peptide. Pe lângă aceștia, hidrolizatele conțin și alți compuși suplimentari, cum ar fi carbohidrații, acizii grași și/sau produsele secundare, care se formează în timpul procesului de hidrolizare. O metodă analitică adecvată pentru determinarea conținutului de aminoacizi liberi este Cromatografia de lichide de înaltă performanță cu detecție UV-VIS (HPLC-DAD). Cromatograful de lichide este un instrument analitic util pentru identificarea compușilor din formularea unui produs farmaceutic, dispozitiv medical, sau alt tip de matrice solidă sau lichidă, permițând cuantificarea acestora. Este o tehnică analitică utilizată pentru a separa un



Sursa: Agilrom Scientific

analit indiferent de stabilitatea sau volatilitatea acestuia, separarea având loc atunci când proba interacționează cu faza mobilă și

de staționară. Diferitele componente ale probei sunt separate în funcție de polaritățile lor și afinitatea pentru faza mobilă, rezultând prin migrarea lor în coloană la viteze diferite. Echipamentele HPLC sunt populare pentru facilitarea utilizării sistemului și potențialul de configurare. Această tehnică analitică poate fi astfel utilizată pentru a stabili compoziția de aminoacizi a collagenului în vederea realizării profilului sau specific, pentru determinarea tipului de collagen sau sursa animală. De exemplu, în collagenul osos, cantitatea de hidroxiprolina este de două ori mai mare decât cea din collagenul pielii.

Analiza aminoacizilor poate fi problematică datorită diversității polarităților și grupurilor funcționale, dar și prin faptul că probele de collagen conțin alte substanțe care pot interfera cu analiza cromatografică. Metodele de analiză ale aminoacizilor necesită de obicei o parte preparativă elaborată. În ultimii ani, spre deosebire de procedeele de derivatizare post-coloană, metodele de analiză ale aminoacizilor care utilizează derivatizarea pre-coloană au devenit tot populare, motivele principale fiind sensibilitatea mai mare, analiza mai rapidă, minimizarea consumului de reactiv ducând astfel la costuri reduse, precum și o mai bună rezoluție a analitelor hidrofobi derivatizați printr-o coloană cu faza inversă (RPLC). Sensibilitatea și buna separare a compușilor este influențată și de valoarea pH-ului, astfel, pregătirea consecventă a soluțiilor tampon este deosebit de importantă pentru a asigura separări reproductibile, alegerea pH-ului fiind realizată pentru ajustarea rezoluției precum și a ordinii și timpului de eluție.

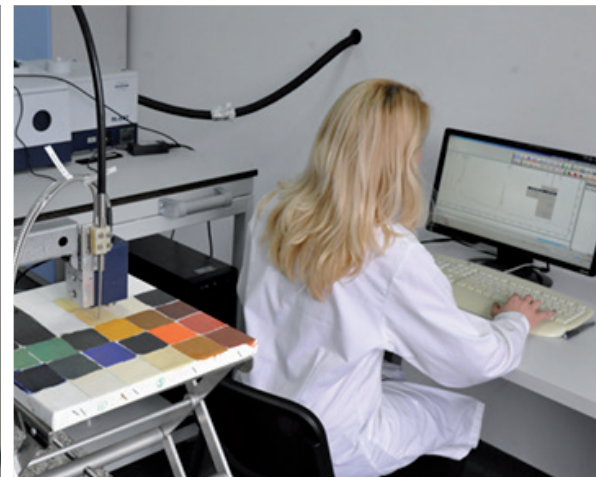
În concluzie, determinarea profilului de aminoacizi pentru diferite tipuri de collagen poate atinge stabilitate și convergență ale unor compoziții, sugerând astfel că un anumit tip de collagen ar putea avea un potențial substituent cât și determina tipul originii animale/umane, totodată fiind foarte util pentru calificarea la iradiere. Mai exact, cunoscând cantitatea și distribuția aminoacizilor liberi în collagen, se poate explica formarea aminelor biogene și distribuția acestora în cazul unei posibile decompoziții cauzate de iradierea gamma.

#### Bibliografie

- Shoulders D.M., Raines R.T. Collagen structure and stability, Annu. Rev. Biochem. 78
- (2009) 929–958
- Birk D.E., Bruckner P. Collagen suprastructures, Topi Curr Chem. (2005) 247:185–205
- Ogawa M., Portier R.J., Moody M.W., Bell J., Schexnayder M.A., Lasso J.N. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*), Food Chem. (2004) 88, 4, 495–501
- Jiravanichanun N., Nishino N., Okuyama K. Conformation of alloHyp in the Y position in the host-guest peptide with the Pro-Pro-Gly sequence: implication of the destabilization of (Pro-alloHyp-Gly), Biopolymers (2006) 81, 225–233
- <http://www.aminoacidsguide.com/>

**Drd. Silvana Vasilca, chim., e-mail: [silvana.vasilca@nipne.ro](mailto:silvana.vasilca@nipne.ro)**  
<http://gammaplus.nipne.ro>





*Titlul proiectului: Creșterea competitivității prin inovare și îmbunătățirea proceselor de fabricație cu iradiere gamma tehnologice*  
*Proiect cofinanțat din Fondul European pentru Dezvoltare Regională prin Programul Operațional Competitivitate 2014-2020*  
*Editorul materialului: Institutul Național de Fizică și Inginerie Nucleară Horia Hulubei (IFIN-HH)*  
*Data publicării: 30 Martie 2022*  
*Conținutul acestui material nu reprezintă în mod necesar poziția oficială a Uniunii Europene*