

TOSSICOLOGIA

COS'E' UN FARMACO?

- ogni sostanza capace di provocare in un organismo modificazioni funzionali mediante un'azione fisica o chimica.
- Per l'OMS → "è farmaco una sostanza o un prodotto utilizzato per modificare o esaminare funzioni fisiologiche o stati patologici a beneficio del paziente"

TOSSICO

Ogni sostanza capace di provocare in un organismo modificazioni funzionali DANNOSE mediante una azione fisica o chimica.

FARMACOCINETICA: la parte della farmacologia che studia quello che il corpo fa al farmaco

FARMACODINAMICA: la parte della farmacologia che studia quello che il farmaco fa al corpo

STUDIO DI UN FARMACO

L'effetto di un farmaco si può studiare:

IN VIVO → animale da esperimento o uomo – sani o ammalati: somministrazione del farmaco in vivo e osservazione del comportamento dell'organismo nel suo insieme.

(es. si somministra un antibiotico ad un topo con una infezione bronchiale e si vede la sopravvivenza; si somministra un antinfiammatorio e si vede che c'è minor risposta infiammatoria all'inoculazione con una sostanza irritante.)

EX VIVO → si somministra il farmaco in vivo e poi si prelevano organi o cellule che vengono successivamente studiati in vitro.

(es. si somministra un farmaco antinfiammatorio in vivo e si prelevano cellule dell'infiammazione – macrofagi, granulociti – e se ne testa la funzionalità in vitro.)

IN VITRO → si aggiunge il farmaco direttamente su un organo isolato o sulle cellule in coltura. Su membrane purificate, o enzimi purificati o orfanelli purificati.

TRATTAMENTI FARMACOLOGICI IN VITRO E IN VIVO:

IN VITRO:

- si valuta l'effetto diretto del farmaco sulla cellula
- indispensabili per valutare in dettaglio i recettori coinvolti, il meccanismo d'azione, i sistemi di traduzione attivati.

IN VIVO:

- il farmaco viene dato in vivo all'animale, poi si prelevano le cellule e se ne valuta la funzionalità in vitro
- quando si nota un effetto può essere dovuto ad un metabolita o al coinvolgimento di un altro sistema

CONCENTRAZIONE E DOSE

In vitro si utilizzano concentrazioni di farmaci anche elevate. Hanno un significato terapeutico? Vengono raggiunte in vivo?

COLTURE CELLULARI

PRIMARIE:

Cellule ottenute da tessuti normali e coltivate o come espianto o come cellule in sospensione singola dopo digestione enzimatica. Vivono in coltura per un tempo determinato, più o meno lungo a seconda dei fattori di crescita che si aggiungono.

I vantaggi sono:

- non sono cellule modificate
- aderenti alla situazione in vivo
- permettono di valutare l'effetto dei farmaci sia in vitro che in vivo

Gli svantaggi sono:

- procedura lenta e a volte difficoltosa per la preparazione
- purezza delle cellule non sempre ottimale
- fase differenziativi diversa
- breve sopravvivenza
- uso di animali da laboratorio
- necessità di tessuti ottenuti durante procedure chirurgiche, biopsie etc: sangue, pelle

CONTINUE:

In genere cellule derivate da tumori o trasformate in vitro (es. con oncogeni virali). Fatte crescere in modo corretto possono durare per sempre.

I vantaggi sono:

- grandi quantità di cellule relativamente omogenee
- purezza della popolazione

Gli svantaggi sono:

- possono avere subito delle modificazioni fenotipiche e/o genotipiche
- non rispecchiano più completamente la funzionalità che avevano in vivo
- trattamenti farmacologici solo in vitro

METODICHE

STERILITA': cappe a flusso laminare, con filtraggio dell'aria; materiale sterile

INCUBATORE: 37°C, umidità costante, CO₂ al 5%

Le cellule crescono in medium (terreno) di coltura:

Vari tipi di medium a seconda delle necessità delle cellule e generalmente contiene:

- aa, vitamine, glucosio
- tampone a pH 7.4
- aggiunta di rosso fenolo, colorante che diventa giallo a pH acido e viola a pH basico
- aggiunta di siero fetale bovino (FCS) contenente nutrienti e fattori di crescita indispensabili per la crescita delle cellule.

Le cellule possono crescere:

- in sospensione, come cellule singole o in piccoli agglomerati (cluster)
- in monostrato attaccato alla fiasca

La forma che una determinata linea cellulare prende dipende dal tessuto dal quale origina, per es. linee cellulari derivate dal sangue tendono a crescere in sospensione mentre cellule derivate da tessuti solidi tendono a crescere come monolayer.

Le cellule crescono fino a quando hanno consumato tutti i nutrienti presenti nel terreno o hanno ricoperto tutta la superficie disponibile (cellule aderenti). Devono essere contate, divise, si deve controllare la vitalità e si devono preparare nuove fiasche; passare le cellule, dividere le cellule.

Cellule in sospensione

Cellule adese devono essere staccate: si usa una proteasi, la tripsina che stacca le cellule dal substrato senza ucciderle.

VALUTAZIONE VITALITÀ CELLULARE CON IL TEST DEL TRYPAN BLUE

È un metodo usato per determinare il numero di cellule vive presente in una sospensione cellulare. Si basa sul principio che le cellule vive posseggono membrane intatte che escludono certi coloranti come il trypan, mentre le cellule morte non lo fanno. La sospensione cellulare si miscela con una soluzione di Trypan e si osserva al microscopio: le cellule vive avranno un citoplasma chiaro, mentre quelle morte si colorano di blu.

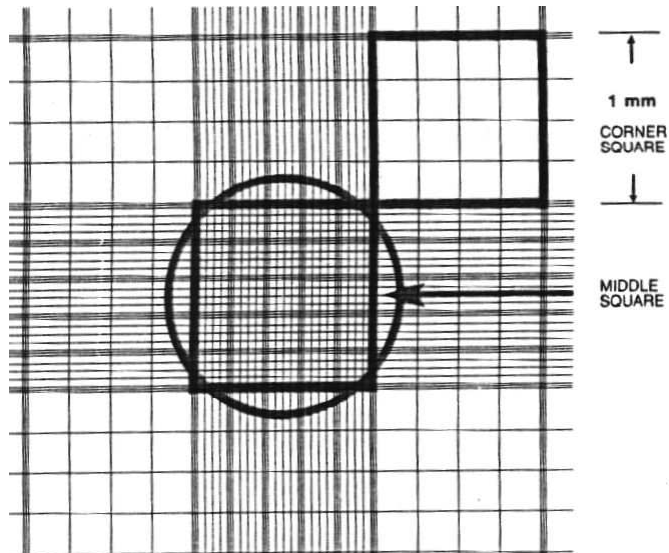
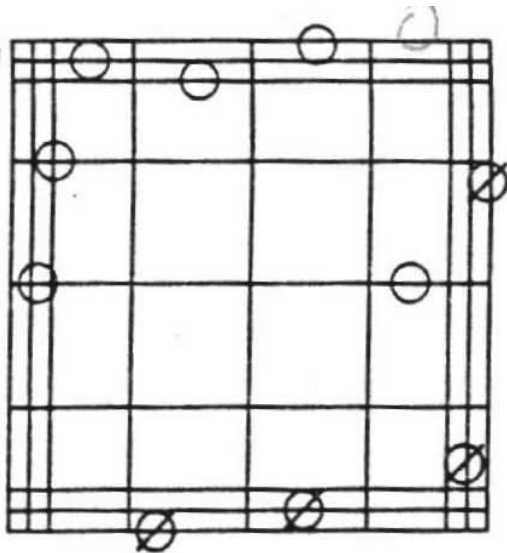
Numero di cellule vive = N totale di cellule contate – N di cellule non vitali (blu)

% di vitalità = N cellule vive / N totale cellule contate

Conteggio cellulare con emocitometro (camera di Burkner) (si ringrazia Massimo Vischi © 2000)

- Preparare la sospensione cellulare
- Utilizzando una pipetta Pasteur trasferire una piccola quantità di sospensione cellulare in entrambe le camere del vetrino (con il coprioggetto montato!) permettendo il riempimento della camera per capillarità.
- Partendo dalla prima camera contare le cellule nel quadrato centrale da 1mm e nei 4 quadrati da 1 mm agli angoli (**Fig.1**).
 - ***Nota:** contare le cellule in alto e a sinistra che toccano la linea centrale del perimetro di ciascun quadrato. Non contare le cellule che toccano la linea centrale in basso e a destra (**Fig.2**)*
- Ripetere la procedura per la seconda camera
- Se si contano meno di 200 o più di 500 cellule nei 10 quadrati (20-50 cellule per singolo quadrato) aggiustare la concentrazione della sospensione cellulare in modo opportuno.
- **Conta delle cellule.** Ciascun quadrato dell'emocitometro con il coprioggetto in posizione ha un volume di 0.1 mm^3 o di 10^{-4} cm^3 . Essendo 1 cm^3 equivalente a 1 ml la concentrazione di cellule per ml sarà determinata con il seguente calcolo:

Cellule per ml = conteggio medio per quadrato x fattore di diluizione x 10^4



(si ringrazia Massimo Vischi © 2000 - http://www.dpvta.uniud.it/~Vischi/docs/Biot_Gene/burker.htm)

CRIOPRESERVAZIONE DELLE CELLULE

Un laboratorio di colture cellulari deve essere in grado di congelare e scongelare cellule. È fondamentale per mantenere la **COSTANZA** della linea, in quanto una coltura prolungata può determinare dei cambiamenti del fenotipo e del genotipo. Inoltre il congelamento riduce il rischio di contaminazione e riduce i costi di mantenimento. È inoltre possibile spedire cellule congelate scambiandole tra laboratori anche dritanti.

Cellule che sono in attiva crescita:

- contate e risospese in un medium specifico (freezing buffer) ed in provette speciali resistenti al freddo
- congelate a -70°C
- per periodi lunghi si trasportano in un recipiente di azoto liquido

Scongellamento:

- scongelare i criotubes in acqua a 37°C
- trasferire le cellule in una provetta con medium
- centrifugare
- risospendere il pellet in medium e mettere in incubatore.

COSA FARE CON LE COLTURE CELLULARI:

Effetto dei farmaci su:

- vitalità, capacità proliferativi, morfologia
- produzione di sostanze: ormoni, citochine, neurotrasmettitori
- attivazione di sistemi di traduzione o fattori di trascrizione
- caratterizzazione dei recettori, canali, enzimi
- ingegneria genetica (trasfezione cellule mammifero)

TRASFEZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO

La trasfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi.

In farmacologia → trasfezione di recettori:

- per aumentare il numero e facilitarne lo studio

- recettori modificati per capire a cosa servono le varie parti di una molecola di recettore e quindi disegnare farmaci appropriati
- per capire l'interazione tra diversi recettori

MECCANISMI D'AZIONE DEI FARMACI

Gli effetti della maggior parte dei farmaci sono il risultato della loro interazione con i componenti macromolecolari dell'organismo. Queste interazioni alterano la funzione del componente, originando le modificazioni tipiche della risposta farmacologia.

Le proteine costituiscono la classe più numerosa di bersagli

- enzimi
- trasportatori
- canali ionici
- recettori "classici" di sostanze endogene
- DNA

Esistono eccezioni: es. antiacidi, diuretici osmotici

Aspetti quantitativi

Aspetti molecolari