FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA
ASSOCIAZIONE ITALIANA TOSSICOLOGIA IN VITRO

ATTI DEL CORSO

PRINCIPI E METODI DI TOSSICOLOGIA IN VITRO

a cura di: Marina Losio - Barbara Bertasi

Brescia, 16-21 Settembre 1996

40

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DEL CORSO

PRINCIPI E METODI DI TOSSICOLOGIA IN VITRO

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
13 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
14 - 1985 5° Simposio Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino.
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1983 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986.
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni Alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del Suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale
36 - 1994 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche
38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA
ASSOCIAZIONE ITALIANA TOSSICOLOGIA IN VITRO

ATTI DEL CORSO

PRINCIPI E METODI DI TOSSICOLOGIA IN VITRO

a cura di: Marina Losio - Barbara Bertasi

Brescia, 16-21 Settembre 1996

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via A. Bianchi, 1 - 25124 Brescia

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, Febbraio 1997

Tipolitografia La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia, 1997

INDICE

PRESENTAZIONE DEL VOLUME . . . . . pag. 7

PREFAZIONE . . . . . » 9

M. FERRO - Uso delle colture cellulari nella ricerca sul metabolismo dei tossici . . » 11

F. ZUCCO - Le colture di cellule di mammifero in tossicologia . . . . . » 23

E. TESTAI - La biotrasformazione degli xenobiotici . . . . . » 31

R. TIOZZO - I test di citotossicità . . . . . » 45

V. BIANCHI - Standardizzazione e convalida dei test in vitro . . . . . » 55

O. SAPORA - I meccanismi di danno e morte cellulare (1ª parte) . . . . » 59

V. BIANCHI - I meccanismi di danno e morte cellulare (2ª parte) . . . . » 77

È noto come per anni siano state utilizzate sostanze naturali e sintetiche spesso in maniera sconsiderata e che solo di recente le Organizzazioni Nazionali ed Internazionali (tra cui l'Organizzazione Mondiale della Sanità, la Comunità Economica Europea e la *Food and Drug Administration*) si siano poste il problema della valutazione del rischio che tali "sostanze" possono causare all'uomo, agli animali ed all'ambiente.

In seguito a tali strategie la maggior parte dei prodotti correntemente in uso (cosmetici, additivi dei mangimi, aromatizzanti, additivi degli alimenti, materiali da imballaggio, sostanze chimiche industriali, pesticidi, ecc..), prima di essere ammessi al consumo, devono essere sottoposti a *test* al fine di evidenziare eventuali parametri specifici di tossicità e ciò in base alla Direttiva CEE 79/831 che prevede una serie di esami tossicologici attualmente eseguiti usando gli animali da esperimento.

È evidente quindi come, per poter assolvere alla normativa vigente, un notevole numero di animali da esperimento debba essere sacrificato e ciò è causa, ormai da diversi anni, di appassionate discussioni di carattere etico e scientifico. Infatti, se da un lato il problema della sofferenza degli animali ha coinvolto l'opinione pubblica, dall'altro la validità scientifica dei saggi *in vivo* è argomento di accese discussioni tra gli stessi ricercatori. In questo contesto non va inoltre dimenticato come i risultati ottenuti con prove *in vivo* possano essere inficiati dal fatto che le sostanze chimiche possono essere metabolizzate in forma differente nelle diverse specie animali e nell'uomo. Infine si deve anche considerare l'elevato costo ed il lungo tempo richiesto dalle prove *in vivo* che rendono ragione della necessità di incentivare lo sviluppo e, dove è possibile, l'applicazione di metodiche alternative per l'indagine tossicologica.

La necessità dello sviluppo dei metodi alternativi trova inoltre una base legislativa nella direttiva CEE 86/609 che richiede esplicitamente, dove possibile, la sostituzione degli animali da esperimento o almeno la riduzione del loro numero e del grado delle sofferenze imposte.

Tra i metodi alternativi, quello più promettente è sicuramente rappresentato dalle colture cellulari in quanto, pur avendo perso la struttura organizzativa degli organi in toto, rappresentano ancora unità funzionali viventi in grado di fornire un sistema biologico semplificato capace di garantire, oltre allo studio del meccanismo d'azione dei tossici, una elevata riproducibilità dei risultati.

In base a queste constatazioni di ordine etico e, nel medesimo tempo, anche di ricerca di metodi più pratici nella diagnostica tossicologica, la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e con l'Associazione Italiana di Tossicologia, pubblica gli Atti del primo Corso teorico-pratico svoltosi a Brescia nell'autunno 1996, sui "Principi e Metodi di Tossicologia in vitro".

Fondazione Iniziative
Zooprofilattiche e Zootecniche

Dal 16 al 21 Settembre 1996 si è svolto, presso i Laboratori Didattici della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, un corso teorico-pratico su "Principi e Metodi di Tossicologia *in vitro*", originato dalla collaborazione tra la Fondazione, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e Cell Tox, Associazione di recente istituzione che ha come scopo la promozione, in tossicologia, dell'applicazione di metodi diagnostici e di ricerche che impiegano sistemi non-animali.

L'argomento è di grande attualità per diversi motivi. Uno etico, in quanto sempre più numerosi sono, giustamente, i contrari alla sofferenza degli animali da esperimento, che può essere evitata con l'uso di metodi alternativi basati soprattutto sull'utilizzo delle colture di cellule provenienti da vari tessuti e diverse specie animali, tra cui anche l'uomo. Un motivo economico, legato al più basso costo dei test *in vitro* rispetto a quelli *in vivo*. Inoltre, poiché uno dei principali problemi nella valutazione del rischio per l'uomo è che il metabolismo dei composti tossici è sovente diverso nell'animale da esperimento, è quanto mai utile la disponibilità di cellule umane o che esprimono comunque geni umani.

Al Corso hanno partecipato 25 giovani laureati (biologi e veterinari) provenienti da diverse regioni d'Italia, scelti tra un notevole numero di aspiranti. Oltre alle lezioni teoriche, il cui testo è qui raccolto, si sono articolate esercitazioni pratiche che prevedevano l'attività dei partecipanti divisi a coppie di lavoro. Tutti gli argomenti, dai *test* di citotossicità basale, alla determinazione di attività di metabolismo dei tossici, sono stati seguiti con molto interesse.

Copie di ciascun protocollo sperimentale e dei lucidi discussi alle lezioni sono stati distribuiti a tutti i partecipanti, mentre il contatto diretto tra studenti e docenti ha contribuito ulteriormente all'attività formativa. Le strutture tecnico-didattiche messe a disposizione sono state adeguate alle finalità e i tecnici ed i collaboratori, sia della Fondazione come dell'Istituto Zooprofilattico, si sono prodigati nel preparare monostrati cellulari, soluzioni e materiali, in modo da agevolare il difficile compito di riprodurre, in più copie, i protocolli sperimentali.

Margherita Ferro
Presidente Cell Tox - Associazione
Italiana Tossicologia in vitro

MARGHERITA FERRO

USO DELLE COLTURE CELLULARI NELLA RICERCA SUL METABOLISMO DEI TOSSICI

Istituto di Patologia Generale - Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università degli Studi - Genova

RIASSUNTO

Dato il ruolo fondamentale del metabolismo degli xenobiotici, si sono sviluppati in questi ultimi anni modelli diversi con lo scopo di trovare un metodo affidabile in grado di riprodurre *in vitro* le attività enzimatiche di fase 1 e di fase 2 responsabili di attivazione e inattivazione di farmaci e altri composti chimici. All'uso di microsomi, fettine di fegato ed epatociti isolati, che sono sistemi di breve durata, si affiancano modelli basati sulla coltura di epatociti (anche umani), di linee stabilizzate di epatoma e di linee transgeniche. Ognuno di questi modelli presenta vantaggi e svantaggi, tuttavia sono ormai entrati in uso in molti laboratori, e molti sono anche commercialmente disponibili. Per studiare effetti citotossici e/o genotossici, oppure il metabolismo di xenobiotici conviene comunque affidarsi ad un sistema ben caratterizzato dal punto di vista del fenotipo metabolico.

Tra i siti extra-epatici coinvolti nella biotrasformazione la cute svolge un ruolo importante per la vastità della sua superficie. Anche in questo caso sono disponibili molti sistemi, tra cui il più usato è la coltura di cheratinociti umani. Le conoscenze sul metabolismo in queste cellule sono più scarse rispetto al fegato, tuttavia è prevedibile un loro ampio impiego in un prossimo futuro per la valutazione della tossicità dei cosmetici. Si illustrano i modelli cellulari più importanti ed il loro uso in tossicologia.

Parole chiave: biotrasformazione - colture cellulari - epatotossicità - tossicità cutanea

USE OF CELL CULTURES FOR THE EVALUATION OF XENOBIOTIC METABOLISM

SUMMARY

Due to the crucial role played by xenobiotic biotransformation, several "in vitro" models have been developed recently to find a reliable system for phase 1 and phase 2 dependent metabolism of drugs and other chemicals. Short-term systems such as microsomes, liver slices, isolated hepatocytes and different culture-based models, such as primary hepatocytes (also from humans), established hepatoma cell lines and transgenic lines are currently used. Some of these systems are also commercially available. However, the metabolism of the cellular model should be well-characterized, before any toxicological study.

The skin also plays an important role in biotransformation as well, due to its large surface. The most important system for skin metabolism studies are the human keratinocytes cultures. Even if our knowledge of these cells is less than that of hepatocytes, there will be more use of "in vitro" methods, especially cosmetology, in the near future. This lesson deals with major cellular models and their use in toxicology.

Key words: biotransformation - cell lines - hepatotoxicity - skin toxicity

INTRODUZIONE

Tra i sistemi non-animali attualmente usati per scopi tossicologici, la coltura di cellule di mammifero è di gran lunga il mezzo sperimentale più promettente. Le cellule si possono studiare immediatamente dopo l'isolamento dall'organo mantenendole in *sospensione* ma, ovviamente, la loro funzionalità è limitata a 2-3 h, quindi si preferiscono di solito le *colture primarie* che derivano dall'iniziale isolamento senza successive subcolture. Tuttavia si possono ottenere *linee cellulari stabilizzate* per immortalizzazione della primitiva popolazione cellulare; questo processo di selezione *in vitro* tende però a favorire le cellule meno differenziate. Talvolta l'espressione fenotipica è migliorata dalla *co-coltura* tra cellule diverse. Infine, oggi le tecniche di ingegneria genetica e biologia molecolare hanno consentito di manipolare il materiale genetico introducendo geni mancanti o poco espressi e creando così *linee cellulari transgeniche*. Come descritto nelle lezioni della Dott.ssa Testai (vedi pg. 23), la grande maggioranza delle sostanze chimiche con cui i mammiferi ogni giorno vengono a contatto (farmaci, additivi alimentari, pesticidi, cosmetici, inquinanti ambientali) sono biotrasformate attraverso complessi sistemi enzimatici localizzati soprattutto nel fegato, ma anche nella cute, polmoni, reni, intestino ed in altri distretti.

Poiché la tossicità è il risultato finale di complesse reazioni biochimiche, suddivise in due fasi, una prevalentemente attivante e la seconda (di solito successiva alla prima) prevalentemente inattivante, è chiaro che questo sistema metabolico deve essere mantenuto dal modello prescelto *in vitro*.

Si prenderanno in considerazione le attività enzimatiche espresse in diversi modelli cellulari derivati da quelli che sono considerati i due siti principali di biotrasformazione di composti chimici esogeni: il fegato e la cute.

FEGATO

Il modello degli epatociti isolati

Gli epatociti isolati e mantenuti in sospensione conservano buoni livelli di attività funzionale per non più di 3-4 h e sono un modello tuttora impiegato per molti studi *in vitro* a breve termine. Oggi è piuttosto semplice isolare epatociti dal fegato di animali adulti, da essere umani, da feti animali, ma gli epatociti di ratto adulto

sono di gran lunga i più usati. Una preparazione soddisfacente di epatociti isolati dal fegato di animale adulto si può ottenere perfondendo l'organo con enzimi secondo una metodica ormai ben collaudata e riassunta nella tab.1. La base del metodo di perfusione con collagenasi è una modifica del metodo originale descritto da Seglen (32) e adottato dalla maggior parte dei ricercatori.

Tabella 1. Fasi della preparazione e purificazione di epatociti di ratto isolati

1) Anestesia dell'animale (ratti maschi 180-250 g) inoculando i.p. Nembutal (1,5 ml/Kg) e eparina (1000 IU) e.v..
2) Immobilizzazione dell'animale e lavaggio dell'addome con etanolo al 95%, incisione e spostamento dell'intestino a lato.
3) Pre-perfusione *in situ* per via portale con tampone HEPES (a) senza Ca^{2+} per 10-15 minuti, a 37°C (non ricircolante).
4) Perfusione dell'organo, rimosso dall'animale, con collagenasi 0,01-0,1% (p/v) e ioni Ca^{2+} a 20 ml/min per 15 minuti (ricircolante).
5) Rottura meccanica del fegato e dispersione delle cellule in terreno.
6) Pre-incubazione di 30 min a 37°C in sistema agitato per eliminare le cellule danneggiate.
7) Filtrazione su retini di nylon (250 m e 100 m).
8) Purificazione per centrifugazione differenziale 3 volte a 50 x g per 2 minuti a 4°C.

a) Composizione del tampone: NaCl 160,8 mM; KCl 3,15 mM; $Na_2PO_4 \cdot 12\ H_2O$ 0,7 mM; HEPES 0,33 mM.

La sospensione cellulare ottenuta non è una vera coltura, ma una sopravvivenza di cellule. In linea di massima non si mantengono attività funzionali degli epatociti per più di 90', anche se questi sono stati impiegati per tempi fino a 4 h. Sospensioni di epatociti (5-10x10^6 cellule/ml) sono state usate per studi a breve termine in diverse condizioni sperimentali, ma spesso non si ottengono attività fisiologiche e vitalità ottimali. Per quanto riguarda i mezzi di sospensione, sono state usate diverse soluzioni tamponate, spesso con aggiunte di gelatina o albumina serica bovina (BSA). In realtà si ottengono risultati migliori con terreni completi. Il pH ottimale è 7,3-7,4. Come supporto per l'incubazione si possono usare provette, Erlenmeyer o fiasche da coltura, immerse in bagnomaria agitato a 37°C.

Gli epatociti isolati sono stati usati per ricerche sugli effetti di composti dotati di meccanismi di tossicità molto rapidi come, ad esempio il CCl_4 inibitore «suicida» del citocromo P450 che quindi agisce solo finché viene metabolizzato. Il CCl_4 e altri composti clorurati sono stati somministrati a sospensioni di epatociti sotto forma di vapori. La perossidazione lipidica, la produzione di radicali liberi e di aldeidi altamente reattive e il loro metabolismo sono fenomeni studiati con questo modello (6, 35, 25).

Gli epatociti isolati sono stati anche usati per rilevare gli effetti farmacologici, il metabolismo e la epatotossicità di diversi farmaci. Poiché esistono differenze qualitative e quantitative nel metabolismo dei farmaci in specie diverse, si sono anche effettuate ricerche su epatociti umani (27).

Con epatociti di specie diverse si sono attuate prove preliminari che potrebbero essere utili per stabilire per ogni composto da analizzare quale sia la specie con caratteristiche più simili all'uomo e quindi più adatta alla sperimentazione. Inoltre, confrontando sospensioni di epatociti provenienti da individui diversi è stato possibile rilevare il polimorfismo di determinate isoforme di citocromo P450 implicate nel metabolismo dei farmaci (21).

Anche nello sviluppo di studi su farmaci anti-tumorali, immunosoppressivi, antivirali e altri ci si è avvalsi utilmente di epatociti umani isolati. Tuttavia sussiste il problema della scarsa disponibilità di materiale umano, che è destinato soprattutto al trapianto d'organo.

Con i moderni sistemi di crioconservazione si possono però conservare gli epatociti umani per alcuni anni e dopo lo scongelamento una grande parte di cellule è ancora in grado di sopravvivere mantenendo l'integrità di membrana e la sintesi proteica, così come le principali attività metaboliche di fase I e II (4).

Il modello della coltura primaria

Dopo essere stati isolati come descritto nella sezione precedente, gli epatociti possono essere mantenuti in coltura primaria su diversi supporti producendo monostrati su superfici di plastica o vetro con o senza strato di collagene e altri substrati. Tra i vari elementi aggiunti ai terreni (molto usati sono: Waymouth MB 752/1, Ham F12, Williams'E, Medium 199), il siero fetale bovino dal 5 al 20% è sempre necessario (salvo che per gli epatociti da fegato rigenerante). Quando si allestisce una coltura primaria di epatociti, entro le prime 24 h le cellule vitali si attaccano al substrato e si appiattiscono mentre le cellule adiacenti ricostituiscono i complessi giunzionali ed i canalicoli biliari; dal secondo giorno le cellule formano un monostrato quasi continuo. Le popolazioni di epatociti in coltura monostrato sono stabili per due o tre giorni, indi diminuiscono rapidamente per distacco cellulare (10-20% al giorno).

Sintesi e secrezione di molte proteine, inducibilità della tirosina-aminotransferasi, sintesi di glicogeno, diverse regolazioni ormonali, così come la sintesi e secrezione di lipoproteine sono tutte funzioni mantenute in vario grado specialmente nelle colture di epatociti di animale adulto.

Tuttavia l'adattamento degli epatociti al loro "nuovo" ambiente porta alla perdita completa di alcune funzioni come l'inducibilità di alcune isoforme di citocromo P450 e alla forte attenuazione di altre, come la secrezione di alcune proteine plasmatiche.

Contemporaneamente le cellule cominciano ad esprimere funzioni di tipo fetale; la trascrizione di geni epato-specifici diminuisce fino al 1-10% rispetto a quella del fegato *in vivo* dopo 24 h di coltura. Anche in presenza di siero fetale che favorisce l'ancoraggio degli epatociti alla plastica, le funzioni epato-specifiche si perdono molto rapidamente. Le alterazioni funzionali sono più precoci e più pronunciate negli epatociti di roditore che non in quelli umani che, in coltura pura, sono più stabili. Per esempio, il citocromo P450 cala a meno del 10% del valore iniziale entro il quarto giorno negli epatociti di ratto, mentre in quelli umani permane al 50% (10, 13).

Negli ultimi anni, quindi, si sono sviluppati vari sistemi sperimentali volti a migliorare l'espressione di funzioni differenziate negli epatociti in coltura. Fino a ora sono stati individuati sostanzialmente tre sistemi: l'aggiunta ai terreni di fattori solu-

bili, l'uso di substrati a base di componenti di matrice extracellulare e la co-coltura con cellule diverse dagli epatociti.

1. Aggiunta ai terreni di fattori esogeni solubili

Un gruppo di fattori solubili comprende ormoni, fattori di crescita, nutrienti ed elementi in traccia. È da tempo noto che corticosteroidi ed altri ormoni migliorano la sopravvivenza e le funzioni degli epatociti *in vitro*. Altri fattori che favoriscono la sopravvivenza e la funzionalità degli epatociti in coltura sono: il fenobarbital, la nicotinamide e il dimetilsulfossido che, aggiunto al terreno in concentrazione finale pari al 2%, ha prolungato la sopravvivenza dell'epatocita di ratto per più di 40 giorni (16).

2. Uso di substrati a base di componenti della matrice extracellulare

L'efficienza di ancoraggio e la longevità delle colture aumenta quando le cellule sono coltivate su piastre di plastica rivestite di collagene (3), fibronectina (20), o miscele di componenti estratti dal fegato o prodotti da linee di cellule endoteliali confluenti (8), oppure quando sono piastrate direttamente su *gel* di collagene galleggiante (22) o su *gel* di collagene immesso in reti di *nylon* (34).

Tuttavia questi sistemi non sono particolarmente efficaci e ciò che provoca deformazione delle cellule ne diminuisce la differenziazione. Molto più soddisfacenti sono alcuni studi effettuati con il Matrigel, matrice ricca in laminina, in grado di mantenere la forma sferica degli epatociti producendo per alcune settimane una forte espressione di molte funzioni fegato-specifiche. Può essere utile anche l'aggiunta di certi proteoglicani e glicosaminoglicani normalmente reperibili nel fegato e di fattori di crescita come TGF-ß (29).

Un nuovo sistema che favorisce la stato differenziato, sperimentato di recente, consiste nella coltura di epatociti isolati intrappolati tra due strati di *gel* di collagene di tipo I, una specie di *sandwich* che sembra ricostituire l'architettura epatica e la polarità dell'epatocita necessaria per il mantenimento di funzionalità a lungo termine. Sembra che non sia importante la composizione del *sandwich*, ma il fatto che gli epatociti riescano a mantenere vicino il collagene che essi stessi producono. Questa produzione endogena di collagene e lo stato differenziato sono aiutati dalla presenza nel terreno di L-prolina (19).

3. Co-coltura con cellule diverse dagli epatociti

Una migliore attività funzionale è stata ottenuta allestendo delle co-colture con altri tipi cellulari epatici, prevalentemente con cellule epiteliali normali derivate dal fegato di ratti di 10 giorni (9). In questo sistema di co-coltura gli epatociti di molte specie, compreso l'uomo, sopravvivono per alcune settimane mantenendo buone capacità funzionali.

Impiego delle colture primarie in campo tossicologico

I diversi tipi di coltura primaria precedentemente descritti sono stati largamente impiegati nei laboratori, con lo scopo di trovare il modello più adatto a studi di meccanismi di tossicità, di farmaco-cinetica, di citotossicità etc.

Dato che la maggior parte dei tossici viene metabolizzata, il primo problema affrontato è stata la perdita del citocromo P450 all'inizio della coltura e dei sistemi per mantenerlo. Poi si è cercato di controllare se le colture primarie rispondessero agli induttori del citocromo P450 in modo uguale a quello *in vivo*.

Espressione delle attività di biotrasformazione

Il livello totale di P450 diminuisce rapidamente durante il primo giorno di coltura e, dopo 4 giorni, è quasi indosabile. Anche le attività catalitiche P-450-dipendenti si riducono, se pure in maniera variabile, probabilmente per la diversa stabilità degli isoenzimi. Gli enzimi di fase II invece sono ben mantenuti nelle colture di epatociti di ratto e in quelle umane.

Si sono fatti molti studi per prevenire la perdita di citocromo P450, data la sua importanza. Le strategie sono state analoghe a quelle usate per mantenere le altre funzioni epato-specifiche, che abbiamo descritto in precedenza.

La co-coltura con cellule parenchimali, è stata molto studiata. Alcuni AA (11) hanno utilizzato come seconda popolazione cellulare una linea epiteliale del ratto, ottenendo un netto miglioramento nell'espressione differenziata degli epatociti in coltura. Ma anche altre cellule possono essere usate allo scopo di fornire quei messaggi intercellulari che inducono lo stato più differenziato dell'epatocita: linee di fibroblasti murini e epiteliali. Queste linee cellulari proliferano in coltura e tendono quindi a sopraffare gli epatociti, che non crescono. Per impedire questo sviluppo che causa problemi tecnici, si trattano le cellule *helper* con mitomicina C (5). Essendo presenti due tipi di cellule in co-coltura ed essendo gli epatociti molto ben attaccati al *feeder layer* non si possono riferire i valori trovati negli epatociti alle proteine o al DNA cellulari. Ci sono due possibilità per valutare le proporzioni relative delle due popolazioni cellulari: una è la citometria a flusso, l'altra è la sottrazione dagli epatociti delle proteine di una popolazione *helper* di controllo seminata in assenza di epatociti.

Uno studio dettagliato dei sistemi di biotrasformazione negli epatociti di ratto in co-coltura con diverse linee cellulari ha evidenziato una migliore espressione e più duratura di molte attività enzimatiche (5). Le attività aril-idrocarbo-idrossilasi (AHH) ed etossicumarina deetilasi (ECOD) sono mantenute a livelli più elevati in co-coltura con la linea MS (rene di scimmia) che non in coltura pura di epatociti (47% e 41% dei valori iniziali, rispettivamente). Dopo 10 giorni entrambe le attività erano ancora presenti a livelli pari al 30% di quello di partenza, mentre in coltura pura queste attività erano quasi scomparse al 4-5° giorno. Anche gli enzimi di fase II UDP-glucuronil-transferasi e glutatione-S-transferasi rimanevano stabili negli epatociti in co-coltura, come in coltura pura.

Induzione delle attività di biotrasformazione

Data l'importanza dell'induzione nel determinare l'esito finale del metabolismo, dipendente dall'equilibrio tra fase di bioattivazione e fase di bioinattivazione del composto, è chiaro che un modello di coltura *in vitro* deve non solo mantenere il citocromo P450, ma anche la sua inducibilità. Inoltre l'induzione degli isoenzimi

del P450 è clinicamente importante poiché può modificare il metabolismo dei farmaci potenziando o riducendone gli effetti, oppure producendo danno epatico.

I principali e più conosciuti induttori *in vivo* sono il 3-metilcolantrene (MC) e il fenobarbital (PB). Ciascuno induce specifiche attività catalitiche: le attività AHH ed etossi-resorufina deetilasi (EROD), che sono preferenzialmente catalizzate dal P450 1A1 sono marcatamente indotte da MC. La ECOD dipende da differenti isoenzimi, come 1A1, 2A1, 2B1 e 2B2 ed è indotta sia da PB che da MC. La pentossiresorufina deetilasi (PROD) è soprattutto indotta da PB e dipende dal P450 2B1.

L'induzione può essere rilevata in coltura *in vitro* a livello di proteina, di attività catalitica e di mRNA. Con queste tecniche si sono trovate, in colture primarie di ratto e umane, inducibilità delle sottofamiglie di citocromo P450: 1A, 2B, 2E, 3A e 4A, dopo esposizione a MC, PB, etanolo, pregnenolone-16-carbonitrile e clofibrato, rispettivamente (5, 17, 33).

Tuttavia la risposta della forma 2B1, (PB inducibile) è generalmente molto più bassa rispetto alla situazione *in vivo*.

Recentemente, tuttavia, si sono sviluppati metodi che incrementano significativamente la risposta delle colture primarie di epatociti di ratto al fenobarbital basati sull'impiego di terreni senza siero e piastre ricoperte di Matrigel o Collagene (17).

L'induzione delle attività di biotrasformazione è anche duratura nelle co-colture, che rispondono ancora ai classici induttori dopo 7 giorni dalla semina, mentre le colture pure raggiungono il massimo dopo 5 giorni (5).

Il modello delle linee stabilizzate

La coltura *in vitro* di una linea stabilizzata è più semplice di quella primaria di epatociti soprattutto perchè si evitano i numerosi problemi tecnici e gli inconvenienti che comunque si presentano durante le procedure di isolamento cellulare. Inoltre le linee stabilizzate sono più vantaggiose rispetto alle colture primarie per la minore variabilità inter- ed intra-laboratorio e per la possibilità di trattamenti a lungo termine. Le linee cellulari in monostrato si mantengono mediante tecniche standard di coltura e, disponendo anche di sistemi di crioconservazione in azoto liquido, è possibile utilizzarle per un tempo praticamente indefinito. Unico inconveniente, nelle colture a lungo termine, sono la contaminazione da micoplasmi, che può colpire in maniera subdola le linee stabilizzate, e le variazioni fenotipiche che si verificano durante l'invecchiamento in coltura.

Nonostante le perplessità legate a questa de-differenziazione, alcune linee di epatoma del ratto ed umane sono state studiate specialmente nel laboratorio di F. Wiebel e nel nostro. Si è accertato che molte attività enzimatiche di fase I e di fase II sono ben espresse ed inducibili specialmente nelle linee FaO, H4IIEC3, MH1C1 ed Hepa1c1c7. Poiché recentemente F. Wiebel (15) ha raccolto in un catalogo tutte le caratteristiche emerse dalla letteratura e potenzialmente utili a coloro che vogliano documentarsi, si rimanda per una rassegna esauriente a tale raccolta.

Da questa breve rassegna è evidente come ciascuno dei due sistemi di coltura cellulare più usati, cioè quello degli epatociti adulti e quello delle linee stabilizzate, presenti degli inconvenienti. Gli epatociti di animali adulti si dedifferenziano più o meno rapidamente e non mostrano proliferazione permanente *in vitro*. Le linee

cellulari d'altra parte hanno basse capacità di bioattivazione. Per tentare di superare questi problemi, gli epatociti sono stati immortalizzati per fusione con la linea FaO ottenendo linee, dette epatocitomi, alcune delle quali hanno presentato alcuni fenotipi più vicini alla linea FaO, altre agli epatociti, e altre intermedi. I livelli enzimatici intermedi tra la linea FaO ed epatociti erano comunque molto bassi, per quanto riguarda la fase I, mentre le reazioni di coniugazione (fase II) erano espresse a buoni livelli. Quindi neanche dalla fusione tra cellule si è potuto ottenere quel modello ideale che molti sognano e che dovrebbe consistere in un vero fegato *in vitro* capace di esprimere e mantenere tutte le funzioni epato-specifiche.

È evidente che un tale modello ideale per ora non esiste, anche se alcune linee ingegnerizzate sono capaci di esprimere alcuni geni P450 in maniera stabile. Tuttavia, anche se questo ultimo modello è utile a studi di metabolismo, non può essere considerato come un fegato *in vitro*.

Pertanto soltanto le diverse applicazioni pratiche potranno indicare via via i vantaggi e gli svantaggi di ciascun sistema.

CUTE

Modelli in vitro *rappresentativi del tessuto cutaneo*

Partendo da biopsie di pelle animale o umana è possibile coltivare la maggior parte di cellule cutanee in sistemi sia bidimensionali (monostrati) sia tridimensionali (colture organotipiche).

I principali modelli che si usano in tossicologia sono:

1. Coltura di espianti di pelle

La pelle è prelevata e mantenuta in sopravvivenza in condizioni di coltura cellulare. L'interesse principale consiste nella possibilità di testare delle sostanze su un materiale biologico simile alle condizioni reali (presenza di tutti gli strati cutanei: epidermide, derma, ipoderma) e soprattutto tenendo conto delle funzioni di barriera di uno strato cutaneo intatto. I campioni, tuttavia, non possono essere mantenuti vitali per molti giorni.

2. Colture convenzionali

Cellule dermiche: i fibroblasti dermici sono facili da isolare da biopsie cutanee e sono molto usati in tossicologia (26). Tuttavia non sono molto implicati nel metabolismo dei tossici.

Cellule epidermiche: i melanociti possono essere bersaglio di agenti tossici e cancerogeni. Esistono linee stabilizzate di melanomi murini o umani; oggi sono disponibili in commercio anche colture primarie di melanociti ottenuti dalla pelle umana normale.

Sono usati per valutare efficacia ed eventuale tossicità di agenti iper- o depigmentanti. In co-coltura con i cheratinociti permettono di ricostituire *in vitro* unità epidermiche di melanizzazione.

Le cellule di Langerhans sono utilizzate nella valutazione dell'ipersensibilità da contatto.

I cheratinociti sono le cellule più importanti della cute anche sotto il profilo metabolico e sono particolarmente utilizzati in tossicologia cutanea. Le condizioni di isolamento e coltura di cheratinociti sono state ampiamente descritte (28), inoltre sono disponibili in commercio sia le colture primarie che i terreni adatti al mantenimento.

A partire da una biopsia umana si possono ottenere due tipi di colture di cheratinociti. La prima è una coltura ad alta densità (più di 10^5 cellule/cm^2 alla semina) e pura, cioè senza altri tipi di cellule. La confluenza è raggiunta da 2 a 4 giorni dopo la semina.

La seconda è a bassa densità (meno di 10^4 cellule/cm^2) e in co-coltura con fibroblasti 3T3 irradiati o trattati con Mitomicina C. In queste condizioni vi è un notevole sviluppo della coltura ed è possibile il clonaggio cellulare.

Esistono inoltre alcune linee stabilizzate di cheratinociti umani, tra cui soltanto due (HaCaT e NCTC 2544) sono state per ora studiate dal punto di vista della capacità metabolica.

3. Modelli tridimensionali o organotipici

Si basano sulla ricostruzione di tutti gli strati epidermici o del derma o della pelle umana (epidermide + derma) e sono disponibili in commercio per i test *in vitro*.

Alcuni modelli sono composti esclusivamente di equivalenti dermici, costituiti da collagene e fibroblasti e vengono commercializzati sotto forma di *kit*. La secrezione *in situ* da parte dei fibroblasti di collagene e di altre macromolecole ricostituisce il "derma-equivalente" (23).

Altri modelli sono invece composti da un equivalente epidermico (epidermide ricostituita) e possono essere su supporto acellulare colonizzabile o no.

Il supporto può essere sintetico (per esempio filtro in acetato di cellulosa) oppure biologico (derma umano morto e de-epidermizzato o collagene umano).

La coltura finale viene fatta emergere dal terreno per consentire la differenziazione terminale così che si possano applicare su questo modello formule e composti non idrosolubili oppure agenti fisici come i raggi U.V..

Il terzo tipo di modello è costituito da un equivalente dermico su cui è fatto sviluppare un equivalente epidermico. Anche qui la tappa emersa della coltura permette la differenziazione terminale della pelle ricostituita.

IL METABOLISMO CUTANEO *IN VITRO*

Il metabolismo cutaneo può determinare biotrasformazione di composti venuti a contatto con la cute con conseguente tossicità (sensibilizzazione e tumori). Talvolta, invece, il metabolismo può de-tossificare un composto, in maniera del tutto analoga a quanto accade nel fegato. Anche se il metabolismo cutaneo è stato fino a poco tempo fa sottovalutato, oggi si sa che sia gli enzimi di fase 1 che di fase 2 sono ben rappresentati. Anzi, tenendo presente l'enorme sviluppo della superficie, possiamo considerare la pelle come un distretto molto importante di biotrasformazione dei composti chimici.

La pelle contiene livelli bassi di isoenzimi del CYP450 (tra cui CYP1A, 2B e 3A) e livelli più alti di enzimi di fase 2, come glutatione-S-transferasi (GST) e UDP-glucuroniltransferasi (UDP-GT). Quindi in condizioni basali la pelle ha più probabilità di de-tossificare un composto che non di bio-attivarlo. Tuttavia molti composti possono indurre il CYP1A1, specialmente gli idrocarburi policiclici aromatici, e quindi potenziare l'attivazione di mutageni e cancerogeni.

In questi ultimi anni è stata studiata l'espressione sia delle attività di fase 1 che di quelle di fase 2 nei diversi modelli cellulari descritti sopra, così come la capacità di rispondere agli induttori, specialmente del CYP1A1.

Nelle colture di cheratinociti sono stati trovati livelli bassi, ma inducibili di diverse isoforme di citocromo P450, in particolare delle famiglie 1,2,3 e 4. Inoltre l'induzione di CYP1A1 è influenzata dal siero e dal calcio presenti nel terreno di coltura (1). Sono stati dimostrati diversi enzimi detossificanti: la GST e la epossido-idrolasi sono ben espresse nelle colture di cheratinociti e nell'epidermide ricostituita (2, 24). Fino a ora la maggior parte degli enzimi metabolizzanti è stata studiata in colture di cheratinociti di ratto e di topo (2, 12, 18, 30, 31), mentre in quelle umane le conoscenze sono più limitate. Recentemente (14) alcuni AA hanno valutato l'influenza di diverse condizioni (grado di confluenza, crioconservazione, subcolture) sulla espressione di diverse attività enzimatiche. Sembra abbia molta più importanza il grado di confluenza della subcoltura, mentre il congelamento influenza solo leggermente le attività enzimatiche.

Un modello molto promettente è quello delle colture di cheratinociti di follicolo pilifero, che hanno una buona espressione e inducibilità di enzimi (7).

Anche nell'epidermide ricostituita (24) si sono trovate diverse attività enzimatiche di fase I e II. Il modello delle linee stabilizzate è quello meno studiato, forse perché si è sempre considerato poco differenziato.

Recentemente nei nostri laboratori sono stati eseguiti alcuni esperimenti, di cui si è riferito, con le linee NCTC 2544 (M. Ferro) e HaCat (N. Ledirac e D. Pallet, comunicazioni personali), che suggeriscono una buona espressione di attività enzimatiche citocromo P-450-dipendenti in entrambe le linee cellulari. Inoltre queste cellule sembrano rispondere bene ad induttori e inibitori del citocromo P450, il che sta a suggerire un loro possibile impiego in tossicologia cutanea.

BIBLIOGRAFIA

1) BERGHARD A., GRADIN K. and TOFTGÄRD R. (1990) *Serum and extracellular calcium modulate induction of cytochrome P-450IAI in human keratinocytes*, J. Biol. Chem., 265, 21086-21090.

2) BIRKERS D. R., MERCELO C., DUTTA-CHOUDHURY T. and MUKHTAR H.. (1982) *Studies on microsomal cytochrome P-450, monooxygenases and epoxide hydrolase in cultured keratinocytes and intact epidermis from BALB/C mice.* J. Pharmacol. and Exp. Therap., 223, 163-168.

3) BONNEY R. J., BECKER J. E., WALKER R. R. and POTTER V. R. (1974) *Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchimal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis.* In Vitro, 9, 339-413.

4) DE SOUSA G., DOU M., BARBE D., LACARELLE B., PLACIDI M. and RAHMANI R. (1991) *Freshly isolated or cryopreserved human hepatocytes in primary-culture: influence of drug metabolism on hepatotoxicity.* Toxicology in Vitro, 5, 483-486.

5) DONATO M. T., GOMEZ-LECHON, CASTELL J. V. (1992) *Co-cultures of hepatocytes: a biological model for long-lasting cultures.* In: In Vitro Alternatives to Animal Pharmaco-Toxicology (Eds. Castell J.V. & Gomez -Lechon M.J.) Farmaindustria, Madrid, 109-127.

6) ESTERBAUER H., ZOLLNER H. and LANG J. (1985) *Metabolism of lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and liver cytosolic fractions.* Biochem. J., 228, 363-373.

7) FRANKENBERG S., JUGERT F.K. and MERK H.F. (1993) *Multiple cytochrome P-450 isoenzymes present in human hair follicule-derived keratinocytes*, J. Invest. Dermatol., 100, 518-521.

8) GUGUEN-GUILLOUZO C., SEIGNOUX D., COURTOIS Y., BRISSOT P., MARCEAU N., GLAISE D. and GUILLOUZO A. (1982) *Amplified phenotypic changes in adult rat and baboon hepatocytes cultured on a complex biomatrix.* Biol. Cell, 46, 11-20.

9) GUGUEN-GUILLOUZO C., CLÉMENT B., BAFFET G.,BEAUMONT C., MOREL-CHANY E., GLAISE D. and GUILLOUZO A. (1983) *Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type.* Exp Cell Res., 143, 47-54.

10) GUILLOUZO A., BEAUNE P., GASCOIN M. N., BEGUE J. M., CAMPION J. P., GUENGERICH F. P. and GUGUEN-GUILLOUZO C. (1985) *Maintenance of cytochrome P-450 in cultured adult human hepatocytes.* Biochem. Pharmac., 34, 2991-2995.

11) GUILLOUZO A., MOREL F., RATANASAVANH D., CHESNE C. and GUGUEN-GUILLOUZO C. (1990) *Long-term culture of functional hepatocytes.* Toxic. in Vitro, 4, 415-427.

12) GUO J. F., BROWN R., ROTHWELL C. E. and BERNSTEIN I. A. (1990) *Levels of cytochrome P-450- mediated aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) are higher in differentiated than in germinative cutaneous keratinocytes*, J. Invest. Dermatol., 94, 86-93.

13) GUZELIAN P. S., BISSEL D.M. and MEYER U. A. (1977) *Drug metabolism on adult rat hepatocytes in primary monolayer culture.* Gastroenterology, 72, 1232-1239.

14) HIREL B., CHESNE C., PAILHERET J.P., GUILLOUZO A. (1995) *In Vitro expression of drug metabolizing enzyme activities in human adult keratinocytes under various culture conditions and their response to inducers.* Toxic. in Vitro, 9, 49-56.

15) HORNHARDT S. and WIEBEL F. J. (1996) *Catalogue of cell lines in Toxicology & Pharmacology*, G SF- Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.

16) ISOM H., GEORGOFF I., SALDITT-GEORGIEFF M. and DARNELL J.&. (1987) *Persistence of liver- specific messenger RNA in cultured hepatocytes: different regulatory events for different genes.* J. Cell Biol., 105, 2877-2885.

17) JAUREGUI H. O., NG S.F., GANN K. L. and WAXMAN D. J. (1991) *Xenobiotic induction of P-450 PB-4 (IIB1) and P-450c (IA1) and associated monooxygenase activities in primary cultures of adult rat hepatocytes.* Xenobiotica, 21, 1091-1106.

18) JIN P. X., ROTHWELL C. E. & BERSTEIN I. A. (1986) *Effect of 3-methylcholanthrene on the induction of aryl hydrocarbon hydroxylase by benz(a)anthracene in primary cultures of cutaneous keratinocytes from the newborn rat*, J. Toxicol., 5, 63-72.

19) LEE J., MORGAN J. R. and YARMUSH M. L. (1993) *Proline-mediated enhancement of hepatocyte function in a collagen gel sandwich culture configuration.* FASEB J., 7, 586-591.

20) MARCEAU N., NOËL M. and DESCHENES J. (1982) *Growth and functional activities of neonatal and adult rat hepatocytes cultured on fibronectin-coated substratum in serum-free medium.* In Vitro, 18, 1- 11.

21) MARRE F., FABRE G., LACARELLE B., BOURRIE M., CATALIN J., BERGER Y., RAHMANI R. and CANO J. P. (1992) *Involvement of the cytochrome P450IID subfamily in Minaprine 4-hydroxylation by human hepatic microsomes.* Drug Metabolism and Disposition, 20, 316-321.

22) MICHALOPOULOS G. and PITOT H. C. (1975) *Primary culture of parenchimal liver cells on collagen membranes.* Expl. Cell Res., 94, 70-78.

23) NAUGHTON G. K., JACOB L. and NAUGHTON B. A. (1989) *A physiological skin model for in vitro toxicity studies*, In: (A. Golberg ed.) Alternative methods in toxicology, 183-189, Mary Ann Libert Inc.New York.

24) PHAM M. A., MAGDALOU J., SIEST G., LENOIR M. C., BERNARD B. A., JAMOULLE J. C. and SHROOT B. (1990) *Reconstructed epidermis: a novel model for the study of dug metabolism in human epidermis.* J. Invest. Dermatol., 94, 749-752.

25) POLI G., DIANZANI M. U., CHEESEMAN K. H., SLATER T. F., LANG J. and ESTERBAUER H., M.U. (1985) *Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions.* Biochem. J., 227, 629-638.

26) PONEC M., HAVERKART M. and SOEI Y. L. (1990) *Use of keratinocyte and fibroblast culture for toxicity studies of topically applied compounds*, J. Pharm. Sciences, 79, 312-316.

27) RAHMANI R., DE SOUSA G., LACARELLE B., RAHMANI-JOURDHEUIL D., PLACIDI M. and CATALIN J. (1990) *Use of human hepatic cellular and subcellular model for assessing drug transport, biotransformation and toxicity.* In: Man and the laboratory animals: perspective for 1992. (Ed. Foundation Merieux), Lyon, 539-543.

28) REGNIER M. and PRUNIERAS M. (1988) *Culture de cellules épidermiques in: (M. Adolphe and G. Barlovatz-Meimon eds.)* Culture de cellules animales. Méthodologies, applications, 181-193, INSERM, Paris.

29) REID L. M., NARITA M., FUJITA M., MURRAY Z., LIVERPOOL C. and ROSENBERG L. (1986) *Matrix and hormonal regulation of differentiation in liver cultures.* In: Isolated and Cultured Hepatocytes. (Eds. A. Guillouzo & C. Guguen-Guillouzo) Les Editions INSERM, Paris & John Libbey Eurotext, London,. 225-258.

30) REINERS J.J, CANTU A. and PAVONE A. (1990) *Modulation of constitutive cytochrome P-450 expression. In vivo and in vitro in murine keratinocytes as a function of differentiation and extracellular Ca^{2+} concentration,* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1825-1829.

31) REINERS J.J, CANTU A., PAVONE A., SMITH S.C., GARDNER C.R, and LASKIN D.L. (1990) *Fluorescence assay for per-cell estimation of cytochrome P-450-dependent monooxygenase activities in keratinocyte suspensions and cultures*, Analyt. Biochem., 188, 317-324.

32) SEGLEN P. O. (1973) *Preparation of rat liver cells. II. Effect of ions and chelators on tissue dispersion.* Exp. Cell Res., 76, 25-30.

33) SINCLAIR J. F., MC CAFFREY J., SINCLAIR P. R., BEMENT W. J., LAMBRECHT L. K., WOOD S. G., SMITH E. L., SCHENKMANM J. B., GUZELIAN P. S., PARK S. S. and GELBOIN H. V. (1991) *Ethanol increases cytochromes P450IIE1, IIB1/2 & IIIA in cultured rat hepatocytes.* Arch. Biochem. Biophys., 284, 360-365.

34) SIRICA A. E., RICHARDS W., TSUKADA Y., SATTLER C. A. and PITOT H. C. (1979) *Fetal phenotypic expression by adult rat hepatocytes on collagen gel/nylon meshes.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 283-287.

35) SMITH M. T., THOR H., HARTZELL P. & ORRENIUS S. (1982) *The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes.* Biochem. Pharmacol., 19-26.

FLAVIA ZUCCO

LE COLTURE DI CELLULE DI MAMMIFERO IN TOSSICOLOGIA

Istituto di Tecnologie Biomediche
Consiglio Nazionale delle Ricerche - Roma

RIASSUNTO

L'uso delle colture cellulari di mammifero in tossicologia si sta rivelando di particolare interesse. Tra i vantaggi collegati a questo modello sperimentale vanno sottolineate la possibilità di usare cellule umane e la grande riproducibilità del sistema. Il limite maggiore è, invece, rappresentato dalla estrema semplificazione rispetto all'organismo in toto. Vari modelli sperimentali sono disponibili, il cui uso appropriato è correlato con gli obiettivi specifici della ricerca. Si possono individuare almeno tre grandi aree di applicazione delle colture cellulari in tossicologia: nello *screening* di sostanze, nello studio di meccanismi specifici di tossicità, negli studi di biotrasformazione. Ciascuna di queste aree è caratterizzata dall'uso di particolari modelli cellulari e specifici parametri

Parole chiave: colture cellulari - tossicologia

MAMMALIAN CELL CULTURES IN TOXICOLOGY

SUMMARY

Cell cultures in toxicology are a very promising experimental model. Some of the advantages of this model are the possibility of using human cells and the high reproducibility of the system. The main limitation is the extreme simplification compared to the entire living organism. Several in vitro cellular models are available depending on the different research aims. At least three main areas, in which cell cultures are widely used, can be identified: the screening of toxicants, the mechanism and biotransforming studies. Each of these areas are characterised by the use of particular cellular models and specific end-points.

Key words: cell cultures - toxicology

INTRODUZIONE

Le colture di cellule in vitro sono state adottate relativamente tardi in tossicologia, se si pensa invece alla larga diffusione che esse ormai hanno raggiunto nella ricerca biomedica in generale (7). La difficoltà di penetrazione di questo modello

sperimentale in campo tossicologico e farmacologico è da imputare soprattutto al versante applicativo e legislativo di queste discipline, in quanto queste sono chiamate a pronunciarsi sulla predittività della sperimentazione rispetto alla specie umana ed a formulare valutazioni di rischio ed efficacia rispetto a determinate sostanze. Tuttavia, nell'ultimo decennio, si è assistito ad una rapida espansione dell'uso delle colture di cellule di mammifero anche in questi settori della ricerca. Sono nate riviste internazionali specializzate e parecchie sono ormai le pubblicazioni disponibili (1 - 2 - 3 - 6 - 12).

Le colture di cellule occupano un posto di particolare rilievo tra i metodi considerati alternativi alla sperimentazione animale in quanto la cellula, pur essendo un sistema estremamente semplificato rispetto all'organismo vivente, ne rappresenta tuttavia l'unità elementare. Essa conserva quindi un grado di complessità di strutture e funzioni che consentono di riprodurre in vitro alcuni fenomeni complessi che si hanno in vivo. A questo va aggiunto il progresso che si è avuto, negli scorsi anni, nelle tecniche di coltura, grazie alle quali si riescono a riprodurre e mantenere in vitro funzioni cellulari altamente specializzate e complesse.

VANTAGGI E SVANTAGGI NELL'USO DELLE COLTURE CELLULARI

Come modello sperimentale le colture cellulari presentano una serie di aspetti vantaggiosi. Il più interessante è costituito dalla possibilità di sperimentare sulla specie umana senza i limiti che, invece, gli studi in vivo incontrano per motivi eminentemente di ordine etico (9). Le colture di cellule consentono inoltre di poter studiare meccanismi di tossicità direttamente a livello molecolare e cellulare, a tempi molto brevi ed in maniera dettagliata. La reversibilità degli effetti può essere facilmente verificata. Dal punto di vista strettamente tecnico esse rappresentano un modello altamente riproducibile e standardizzabile e quindi facilmente suscettibile di automatizzazione. I relativi saggi possono essere miniaturizzati, risolvendo così anche il problema delle piccole quantità di tossici da testare e/o da identificare che spesso si presenta nella ricerca tossicologica. Non presenta, infine, difficoltà l'allestimento di un numero di prove soddisfacente dal punto di vista statistico. Per i motivi sopracitati questi modelli sperimentali possono risultare più economici in termini di costi e tempi del corrispettivo modello animale, rispetto a cui rappresentano anche un modello eticamente più accettabile.

Tuttavia ci sono limiti intrinseci alla sperimentazione in vitro che vanno tenuti ben presenti. Il più rilevante è che le colture cellulari rappresentano un modello estremamente riduttivo rispetto all'organismo in toto. Gli effetti mediati dal sistema neuroendocrino od immunitario non possono, ovviamente, essere studiati su questi modelli, per quanto complessi essi siano. A causa della vita limitata di una coltura cellulare, si possono studiare prevalentemente gli effetti acuti piuttosto che cronici di determinate sostanze, e comunque solo un limitato numero di meccanismi può essere preso in considerazione di volta in volta. Anche dal punto di vista tecnico si riscontrano dei problemi relativi, ad esempio, alla esposizione alle sostanze (solubilità, volatilità, etc...) ed alle concentrazioni da scegliere. Infatti non risulta così semplice mettere a punto un disegno sperimentale che sia facilmente correlabile alla situazione in vivo, sia nella impostazione che nella valutazione dei risultati.

VARI TIPI DI COLTURE CELLULARI

Diversi tipi di colture cellulari si possono allestire, con caratteristiche molto diverse tra loro, che possono soddisfare specifiche esigenze della sperimentazione. Queste tipologie sono illustrate nella tabella 1.

Tabella 1 - Modelli Cellulari *In vitro*

	Caratteristiche *in vitro/in vivo*	Durata e tipo di coltura	Standardizzazione	Cellule più comunemente usate
Cellule isolate	buone cariotipo normale	poche ore sospensione	scarsa	epatociti; cellule reticolo endoteliali; cellule intestinali.
Colture primarie	buone cariotipo normale	poche ore monostrato	scarsa	fibroblasti; cellule epiteliali (organo-specifiche).
Linee cellulari a vita finita	variabili soprattutto diploidi senescenti	mesi/anni monostrato	buona	fibroblasti normali; c. epiteliali normali; (organo-specifiche).
Linee cellulari continue	scarse cariotipo aneuploide immortali	anni monostrato sospensioni	buona	cellule umane tumorali; cellule animali trasformate tumorali.

Cellule isolate di fresco e colture primarie sono la scelta per eccellenza quando vi è l'interesse ad avere un modello sperimentale *in vitro* il più possibile vicino alla situazione *in vivo*, con le stesse caratteristiche del tessuto o dell'organo di origine. Questo tipo di colture cellulari tuttavia sono di breve durata ed anche scarsamente riproducibili.

Le linee cellulari a vita finita o continua, in genere, sono costituite da cellule trasformate, se non addirittura tumorali, che hanno perso molte delle caratteristiche delle cellule normali da cui sono derivate. Queste cellule però si riproducono in coltura, e le tecniche relative sono più facilmente standardizzabili, a garanzia di una maggiore riproducibilità dei risultati. Questo tipo di cellule è, quindi, prescelto in caso di studi di *routine*, come può essere lo *screening* di sostanze tossiche (15).

AREE DI APPLICAZIONE DELLE COLTURE CELLULARI IN TOSSICOLOGIA

In tossicologia si possono identificare almeno tre grandi aree di applicazione delle colture cellulari: lo *screening* di sostanze tossiche o sospette tali, gli studi di meccanismi specifici di tossicità, gli studi di biotrasformazione dei tossici (Tabella 2).

Tabella 2. Aree di ricerca in tossicologia in cui si fa uso di modelli cellulari

A. Test di citotossicità di sostanze chimiche
(tossicità cellulare intrinseca)

Scopi:
- identificare l'ambito delle dosi effettive
- selezionare priorità
- valutare il potenziale tossico di una sostanza rispetto ad una lista di riferimento
- acquistare informazioni sui meccanismi coinvolti

End-points presi in considerazione:
- correlati soprattutto con la morte cellulare
- correlati a specifiche funzioni e/o strutture cellulari

Cellule:
- prevalentemente linee cellulari

B. Studi di meccanismi

Scopi:
- studio di meccanismi correlati con le funzioni basali della cellula
- studio di meccanismi organo-specifici

End-points:
- molto specifici, in relazione al meccanismo studiato

Cellule:
- vari tipi cellulari, soprattutto linee cellulari stabilizzate
- colture primarie o linee cellulari derivate da specifici organi o tessuti

C. Studi di biotrasformazione

Scopi:
- studi di enzimi di fase I e II
- rilevamento e misura di metaboliti o prodotti secondari

End-points:
- soprattutto reazioni enzimatiche e loro prodotti

Cellule:
- epatociti preparati di fresco
- cellule derivate da altri organi o tessuti (preparate di fresco o linee cellulari
- cellule ingegnerizzate

1. Lo screening di sostanze tossiche

L'uso di *test* di tossicità si basa su alcune assunzioni di fondo, che fanno ritenere il modello in vitro affidabile ai fini della predittività del rischio in vivo. Tali assunzioni si possono riassumere in quanto segue:

— un ampio spettro di patologie può essere ricondotto ad un numero relativamente ristretto di eventi cruciali a livello cellulare, specialmente nel caso della tossicità acuta;

— parecchi elementi della complessità dell'organismo possono essere riprodotti in vitro;

— le condizioni di esposizione in vivo possono essere adeguatamente riprodotte in vitro.

Il modello sperimentale prevalentemente usato in questo tipo di studi, è costituito da linee cellulari stabilizzate di tipo continuo. Due ordini di motivi stanno alla base della preferenza per questo modello cellulare. Il primo riguarda la strategia sperimentale che prevede, nel caso dello *screening* delle sostanze tossiche, l'uso di *endpoints* riguardanti le strutture e le funzioni basali della cellula. È dunque evidente che per tale tipo di analisi non necessitano cellule altamente specializzate. Il secondo ordine di motivi risiede nel fatto che questo tipo di cellule consente un'alta standardizzazione delle tecniche e quindi una agevole riproducibilità dei risultati.

I *test* di citotossicità vengono generalmente usati nei seguenti casi:

— nello *screening* di composti e sostanze non note, per identificare la loro potenziale tossicità;

— per stabilire priorità ai fini di studi futuri e selezionare le concentrazioni appropriate delle sostanze da studiare;

— per classificare alcune molecole sulla base della loro tossicità rispetto ad una lista di riferimento.

In questi *test*, in genere, l'effetto tossico viene determinato in termini di morte cellulare mediante una serie di parametri a questa correlati.

Si danno tuttavia casi in cui lo *screening* di sostanze tossiche viene effettuato su cellule specializzate, laddove l'organo bersaglio sia conosciuto o sospettato e si voglia verificare l'azione di una determinata famiglia di composti su una specifica funzione.

2. Gli studi di meccanismi specifici di tossicità.

In questa area si collocano tutti quegli studi che mirano all'analisi di meccanismi specifici di tossicità, siano essi correlati ad una determinata funzione o ad organi e/o tessuti particolari. Si trovano quindi in questo settore modelli sperimentali molto vari, a seconda degli obiettivi dello studio. Parecchi di questi modelli riguardano cellule derivate da organi o tessuti, che conservino *in vitro* determinate funzioni specializzate. Non sorprende quindi che siano molto presenti le colture primarie o le cellule isolate di fresco. Tuttavia si riscontra anche la presenza di linee cellulari stabilizzate, specialmente di origine umana, la cui caratterizzazione ha messo in evidenza la preservazione di elevati gradi di differenziamento, anche in condizioni di coltura prolungata.

In un prossimo futuro, grazie alle tecniche di ingegneria genetica, sarà forse possibile immortalizzare cellule normali dotate di funzioni specializzate. Questi modelli consentirebbero di abbinare il vantaggio della disponibilità illimitata di un determinato tipo cellulare, a quello della conservazione delle caratteristiche di normalità e specializzazione.

Gli studi dei meccanismi specifici di tossicità mediante le colture cellulari non sono oggetto di questa presentazione, ma si possono consultare su questo tema vari testi in lingua inglese (2 - 3 - 5 - 11 - 12) e italiano (15).

3. Gli studi di biotrasformazione

I composti chimici sono soggetti a fenomeni di biotrasformazione nel fegato. A seguito delle reazioni prodottesi in questo organo, i composti e/o i loro metaboliti possono risultare più o meno tossici per l'organismo. È quindi estremamente importante comprendere le possibili reazioni a cui determinate sostanze possono andare incontro, una volta raggiunto questo organo.

In vitro questi studi sono stati tradizionalmente eseguiti su epatociti isolati prevalentemente dal ratto, tuttavia si è fatto uso anche di epatociti di cavia, di topo e di pollo. L'uso di epatociti umani è ancora limitato sia da problemi di disponibilità, che da problemi di coltura e mantenimento in vitro. Infatti ancora non si è riusciti ad ottenere colture di epatociti umani, che soddisfino le varie esigenze di ricerca (8 - 10 - 13).

Più di recente, cellule derivate da altri tessuti od organi sono state caratterizzate per le loro attività di biotrasformazione. Queste ultime sono risultate presenti in molte di esse, per esempio nei cheratinociti della pelle, nelle cellule intestinali, nei macrofagi polmonari, anche se a livelli inferiori che nel fegato. Anche linee cellulari stabilizzate in coltura hanno mostrato di conservare alcune di queste proprietà, come risulta dal catalogo recentemente pubblicato da un gruppo di ricercatori tedeschi (4).

L'ingegneria genetica ha, infine, aperto una nuova strada anche in questo settore, in quanto è possibile costruire linee cellulari che esprimano in particolare l'una o l'altra delle attività di biotrasformazione desiderate.

BIBLIOGRAFIA

1) BARILE F.A. (1994) *Introduction to in vitro toxicology. Mechanism and methods.* CRC Press, Boca Raton, Ann Harbor, London, Tokyo.

2) FRAZIER R.I. (1992) *In vitro toxicity testing - Application to safety evaluation.* Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong.

3) GAD S.C (1994) *In vitro toxicology.* Raven Press, New York.

4) HORNARDT S. AND WIEBEL F.J. (1996) *Catalogue of cell lines in toxicology and pharmacology.* GFS- Forschungcentrum fur umwelt und gesundheit, Bericht 3/96, ISSN 0721-1694.

5) JOLLES G. and CORDIER A. (1992) *In vitro methods in toxicology.* Rhone -Poulenc Rorer Foundation, Academic Press, London, New York.

6) O'HARE S. and ATTERWILL C.K. (1995) *Methods in molecular biology* Vol. 43: In vitro toxicity testing protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey.

7) PAGANUZZI STAMMATI A., SILANO V. and ZUCCO F. (1981) *Toxicology investigations with cell culture systems.* Toxicology, 20, 91-153.

8) RODRIGUES A.D. (1994) *Use of in vitro human metabolism studies in drug development. An industrial perspective.* Biochem. Pharmacol., 48, 2147-2156.

9) ROGIERS V., SONK W., SHEPHARD E., VERCRUYSSE A. (1993) *Human cells in in vitro pharmacotoxicology.* VUBPress, Brussels.

10) SKETT P., TYSON C., GUILLOUZO A., MAIER P. (1995) *Report on the international workshop on the use of human in vitro liver preparations to study drug metabolism in drug development.* Biochem. Pharmacol., 50, 280-285.

11) TYSON C.A. and FRAZIER J.M. (1993) *Methods in toxicology, Vol 1 Part A: In vitro biological system, Part B: in vitro toxicity indicators.* Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. New York, London.

12) WATSON R.R (1992) *In vitro methods of toxicology.* CRC Press, Boca Raton, Ann Harbor, London, Tokyo.

13) WRIGHTON S.A., VANDENBRANDEN M., STEVENS J.C. *et al.* (1993) *In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development.* Drug Met. Rev., 25, 453-484.

14) ZUCCO F. (1992) *Use of continuous cell lines for toxicological studies. In:* In vitro alternatives to animal pharmacotoxicology. Castell J.V and Lechan M.J. Eds. Farmaindustria, Serie Cientifica, Madrid, pp 43-68.

15) ZUCCO F. e BIANCHI V. (1994) *Colture cellulari in tossicologia,* Lombardo Editore, Roma.

EMANUELA TESTAI

LA BIOTRASFORMAZIONE DEGLI XENOBIOTICI

Laboratorio di Tossicologia Comparata e Ecotossicologia
Reparto di Biochimica Tossicologica - Istituto Superiore di Sanità - Roma

RIASSUNTO

La funzione svolta dai sistemi enzimatici per il metabolismo degli xenobiotici (sostanze chimiche estranee ad un organismo), è quella di aumentarne il grado di idrosolubilità, favorendo così la loro escrezione ed evitandone l'accumulo fino al raggiungimento di concentrazioni tossiche. Le reazioni enzimatiche di biotrasformazione degli xenobiotici vengono schematicamente suddivise in due fasi. Gli enzimi della Fase I catalizzano l'introduzione (o la liberazione) di un gruppo polare reattivo (-OH; -COOH; $-NH_2$) attraverso reazioni di ossidazione, riduzione o idrolisi, nella molecola dello xenobiotico, rendendolo substrato opportuno per le reazioni di coniugazione della Fase II, il cui prodotto altamente idrofilo viene rapidamente escreto. Le reazioni di biotrasformazione sono generalmente un processo di detossificazione; tuttavia alcune di esse (sia della Fase I che della Fase II) sono vere e proprie bioattivazioni, perchè si formano intermedi di reazione o metaboliti reattivi elettrofili che sono più tossici del composto parentale. Tra queste reazioni particolare attenzione è rivolta alle ossidazioni microsomiali, catalizzate da un sistema multienzimatico comprendente il citocromo P450.

Alcune caratteristiche generali delle reazioni enzimatiche implicate nel metabolismo degli xenobiotici (specificità di substrato, saturabilità, inducibilità, espressione polimorfica) vengono considerate criticamente, mettendo in evidenza le conseguenze tossicologiche che ne derivano, come la difficoltà di estrapolazione degli effetti misurati sia dalle alte alle basse dosi che tra le specie e la variabilità interindividuale nella risposta ad un agente chimico, sia esso una sostanza tossica o un farmaco (responsabile a volte dell'inadeguatezza di alcune terapie farmacologiche). La possibilità di interazioni tra sostanze chimiche e sistemi enzimatici deputati al loro metabolismo é uno dei fattori che determinano la variabilità nelle capacità metaboliche degli individui, dipendente dallo stile di vita di ciascuno (dieta, consumo di farmaci e di alcoolici, abitudine al fumo, contaminanti ambientali e occupazionali, stati patologici). L'altro fattore che regola la suscettibilità individuale ad effetti tossici e a stati patologici con etiologia ambientale è il polimorfismo genetico degli enzimi del metabolismo.

I vantaggi e i limiti di vari sistemi sperimentali *in vitro* utilizzati negli studi di metabolismo delle sostanze chimiche vengono poi presentati criticamente. Accanto a modelli sperimentali tradizionali quali gli enzimi purificati, le frazioni subcellulari, le cellule fresche isolate e le linee cellulari stabilizzate vengono considerati anche sistemi più recentemente introdotti negli studi tossicologici come i topi transgenici e le linee di cellule geneticamente ingegnerizzate, capaci di esprimere specifiche attività enzimatiche anche umane.

Parole chiave: metabolismo degli xenobiotici - reazioni di biotrasformazione - sistemi *in vitro*

THE BIOTRANSFORMATION OF THE XENOBIOTICS

SUMMARY

Since most xenobiotics are lipophilic compounds, they can easily penetrate cellular lipid membranes and bioaccumulate in the body until reaching toxic concentrations. The drug-metabolising enzymatic system has been naturally selected in order to increase xenobiotic hydrophilicity, thus favouring their excretion. Biotransformation reactions are usually considered in two phases. Phase I enzyme catalyze oxidation, reduction and hydrolysis reactions, which introduces a polar reactive group (-OH, -COOH, $-NH_2$) into the xenobiotic molecule. This creates substances which are suitable substrates for Phase II reactions. During Phase II, a hydrophilic endogenous substrate is conjugated with the xenobiotic (altered or not) to yield a water-soluble product which is easily excreted. Although the biotransformation reactions are generally considered a detoxication process, however a bioactivation mechanism may occur due to the production of reactive metabolites which is actually more dangerous than the parent compound. We have paid particular attention to the microsomal mixed-function oxidations, catalyzed by the cytochrome P450 dependent monooxygenase system.

We have critically described some of the main features of the enzymatic reactions responsible for xenobiotic metabolism, such as substrate specificity, induction and inhibition processes, saturation kinetics and polymorphic expression. Some toxicological consequences of these features, including the problem of interspecies and high-to-low dose extrapolations, are underlined. Furthermore, the interindividual variation in the susceptibility to chemicals has been shown. Indeed, both life style (diet, cigarette smoke, alcohol consumption), patological conditions (i.e. diabetes), and environmental or occupational contaminants together with genetic factors (i.e. polymorphism) may modulate the espression of the enzymatic systems, causing different susceptibility to xenobiotics (both drug and toxic substances).

In the last part we have critically presented the main experimental systems (both traditional such as subcellular fractions and more recent ones as genetically engineered cells or trangenic animals) used in *in vitro* toxicology; this was to show the advantages and the limitation of each.

Key words: xenobiotic metabolism - biotransformation reactions - in vitro systems

INTRODUZIONE

Da sempre gli organismi viventi sono esposti ad un numero imprecisato di sostanze chimiche naturali (ma non per questo non nocive), a cui solo in tempi più recenti si è aggiunta una enorme quantità di sostanze di sintesi che la specie umana ha introdotto per migliorare la qualità della vita tra cui farmaci, additivi alimentari, conservanti, pesticidi, prodotti industriali. La necessità di fronteggiare questo conti-

nuo attacco chimico, ha fatto sì che la selezione naturale favorisse organismi dotati di "sistemi di difesa" che permettessero di trasformare o eliminare le sostanze estranee impedendone l'accumulo. Ed è infatti un concetto fondamentale in tossicologia che "la dose fa il tossico".

L'effetto tossico conseguente all'esposizione di un organismo ad una sostanza estranea (o xenobiotico) si manifesta come conseguenza di una complessa serie di processi, comprendenti i fenomeni tossicocinetici (assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione), tossicodinamici (interazione tossico-recettore nel tessuto bersaglio) e di recupero (rigenerazione cellulare e riparazione del DNA).

La conoscenza dei parametri tossicocinetici, l'identificazione e la quantificazione degli intermedi reattivi e della loro diversa attività biologica, e la conoscenza delle differenze metaboliche e farmacodinamiche tra le specie, sono indispensabili per determinare la "concentrazione reale" della specie chimica responsabile dell'effetto tossico nella cellula (o nell'organo) bersaglio. Disporre di questi parametri è necessario per formulare stime quantitative del rischio tossicologico per una sostanza, vale a dire per calcolare l'incidenza dell'effetto studiato in una popolazione, in relazione all'esposizione ad una certa dose della sostanza stessa.

Una sostanza tossica, per essere tale, deve prima essere assorbita: lo strato corneo dell'epidermide e le ciglia dell'epitelio della mucosa nasale possono essere considerate un esempio di prime barriere di difesa dell'organismo. La caratteristica che accomuna la maggior parte degli xenobiotici è la lipofilicità; questo fa sì che, una volta assorbiti debbano legarsi a proteine di trasporto per essere distribuiti attraverso il circolo ai vari distretti corporei, tra cui l'eventuale tessuto e/o organo bersaglio, gli organi metabolicamente competenti o gli organi di escrezione (7). Ma, data la loro alta affinità per i lipidi, essi tenderanno principalmente ad accumularsi nel tessuto adiposo (2), e nelle membrane degli altri tessuti dell'organismo esposto, fino al raggiungimento di concentrazioni tossiche. Tenendo conto che l'escrezione avviene principalmente attraverso soluzioni acquose (urine, lacrime, sudore), l'unica possibilità di difendersi per l'organismo è di aumentare il grado di idrosolubilità delle molecole esogene eliminandole ed evitando così il loro accumulo. È proprio questa la funzione svolta dai sistemi enzimatici per il metabolismo degli xenobiotici e per questo motivo le reazioni di biotrasformazione sono considerate generalmente un processo di detossificazione (3). Tuttavia possono formarsi metaboliti reattivi elettrofili che, come agenti alchilanti, sono in grado di reagire con i siti nucleofili delle macromolecole (DNA, RNA e proteine) e con altri costituenti cellulari a più basso peso molecolare (peptidi, vitamine e lipidi). Possono anche generarsi radicali liberi che agiscono principalmente come agenti ossidanti e, come tali, possono estrarre un idrogeno dalle catene degli acidi grassi poliinsaturi dei lipidi, iniziando così fenomeni di perossidazione delle membrane. Quando gli intermedi di reazione o i prodotti finali hanno una attività biologica maggiore, ovvero sono più tossici del composto parentale, si parla più appropriatamente di reazioni di bioattivazione (11, 18). Una volta formatisi, i metaboliti possono produrre effetti tossici localizzati nel sito di formazione, effetti sistemici o estremamente specifici. La localizzazione organospecifica dell'azione di singole sostanze tossiche e/o cancerogene è il risultato di un bilancio tra formazione ed eliminazione degli intermedi reattivi a rilevanza tossicologica, formati *in situ* ma anche in altri organi e poi successivamente trasportati dal circolo sanguigno nell'organo bersaglio (3, 7).

All'espressione dell' effetto tossico contribuiscono anche fenomeni che possono rendere reversibile la lesione prodotta, come la rigenerazione cellulare o la sintesi riparativa del DNA, che sono presenti in maniera disomogenea nei vari tessuti.

Le reazioni enzimatiche di biotrasformazione degli xenobiotici vengono schematicamente suddivise in due fasi: gli enzimi della Fase I catalizzano l'introduzione (o la liberazione) di un gruppo polare reattivo (-OH; -COOH; $-NH_2$) attraverso reazioni di *ossidazione*, riduzione o idrolisi. Questo non solo aumenta l'idrosolubilità dello xenobiotico, ma lo rende substrato opportuno per le reazioni di *coniugazione* della Fase II: la reazione con un substrato endogeno dà luogo ad un prodotto altamente idrofilo, che viene rapidamente escreto (1). Le principali reazione di coniugazione sono catalizzate dalla UDP-glucuroniltrasferasi (UDPGT), dalla solfotransferasi (ST), dalla N-acetiltrasferasi (NAT) e dalla glutatione-trasferasi (GST). Il glutatione ridotto (GSH) è un tripeptide sulfidrilico, disponibile nei vari distretti cellulari ad alte concentrazioni (15), con un ruolo protettivo nei confronti delle macromolecole cellulari. Può infatti reagire anche indipendentemente dall'intervento enzimatico della GST con gli xenobiotici e gli intermedi più reattivi come bersaglio alternativo ai gruppi nucleofili (soprattutto ai tioli) delle proteine e del DNA. In genere nelle reazioni di coniugazione si introduce nella molecola del substrato un gruppo acido, facilmente riconosciuto dagli enzimi di trasporto di membrana epatici e renali, che rappresentano le due maggiori vie di escrezione dell'organismo. Il peso molecolare e l'ingombro sterico del coniugato sono i fattori principali che determinano la prevalenza di una via rispetto all'altra; maggiore è il peso molecolare, maggiore è la percentuale di coniugato escreto attraverso la bile anzichè nelle urine. Una volta escreto a livello intestinale il coniugato può essere riassorbito, ritornando così al fegato (circolazione enteroepatica). Inoltre sia nell'intestino che nei tubuli renali possono essere presenti enzimi come le ß-liasi o le ß-glucuronidasi che scindono i coniugati liberando la forma attiva dello xenobiotico, lontano dal sito di formazione.

Come già accennato, sebbene questa sequenza di eventi sia generalmente una detossificazione, alcune di queste reazioni (sia della Fase I che della Fase II) sono in realtà delle bioattivazioni. Le reazioni più frequentemente responsabili della attivazione degli xenobiotici sono le ossidazioni microsomiali, catalizzate da un sistema multienzimatico che ha il citocromo P450 (P450) come ossidasi terminale. Nella reazione, un atomo di una molecola di O_2 è ridotto ad H_2O, mentre l'altro è incorporato nel substrato; per questa caratteristica spesso si usa il termine di monoossigenasi. Alla reazione partecipa un altro enzima: la NADPH-citocromo P450-reduttasi, una flavoproteina che catalizza il trasferimento degli equivalenti riducenti dal NADPH al P450 (1). Tra le reazioni catalizzate da questo sistema multienzimatico sono comprese: idrossilazioni, epossidazioni, deaminazioni, desulfurazioni, dealogenazioni e in alcuni casi anche riduzioni (12). Sia le sostanze naturali tra cui antibiotici, tossine, lipidi e ormoni steroidei (17), che la maggior parte dei composti organici di sintesi sono substrati del P450, che può essere perciò considerato il più versatile dei catalizzatori biologici finora noti. Il P450 è presente nei microrganismi e nei tessuti di piante e animali; nei mammiferi è stato determinato in tutti i tessuti esaminati, tuttavia la sua principale localizzazione è nel reticolo endoplasmatico liscio e nei mitocondri degli epatociti. Il P450 è in realtà una famiglia di emoproteine legate alla membrana; attualmente oltre 200 diversi P450 di specie diverse, tra cui l'uomo, sono già stati clonati e caratterizzati. La superfamiglia di geni codificanti

per i P450 è il prodotto della divergenza evolutiva da un unico gene ancestrale apparso 3 miliardi di anni fa. Al momento attuale sono note 35 diverse famiglie di geni (31 negli eucarioti e 9 nei procarioti): le proteine codificate da geni della stessa famiglia presentano una analogia nella sequenza amminoacidica >40%. Nei mammiferi sono state identificate 12 famiglie, indicate da 1 a 12 con numeri arabi (20) (CYP1); all'interno di ciascuna famiglia sono presenti isoenzimi diversi indicati con lettere dell'alfabeto (CYP1A) e ad un livello successivo diversificati da un ulteriore numero arabo (CYP1A1, CYP1A2). Solo gli isoenzimi appartenenti alle famiglie da 1 a 4 intervengono nel metabolismo degli xenobiotici. Ciascun CYP può avere una assoluta specificità di substrato come gli isoenzimi coinvolti nell'anabolismo degli steroidi) o catalizzare la monoossigenazione di molti substrati diversi, sovrapponendo la propria attività catalitica a quella di altri isoenzimi.

Questa relativa aspecificità e l'alto numero di singole forme di CYP sono sicuramente un vantaggio evolutivo, considerando l'elevato carico giornaliero di sostanze, anche molto diverse nella struttura chimica, endogene e non (contaminanti ambientali, additivi alimentari, farmaci, etc.) che devono essere detossificate dall'organismo. Per una descrizione più dettagliata delle varie reazioni e per esemplificazioni di profili metabolici di sostanze tossiche si rimanda al capitolo relativo alla biotrasformazione degli xenobiotici del testo "Colture cellulari in Tossicologia" (23).

CARATTERISTICHE GENERALI DELLE REAZIONI DI BIOTRASFORMAZIONE

Gli epatociti, dove la concentrazione degli enzimi chemiometabolizzanti è più elevata, sono il principale sito di biotrasformazione dei mammiferi. Le varie sostanze assorbite nel tratto gastrointestinale possono essere immediatamente detossificate (o bioattivate): la rete di capillari intestinali si convoglia infatti nella vena porta, direttamente collegata con il fegato. Anche altri organi che, come il fegato, si trovano in posizione strategica rispetto a vie di entrata o di escrezione (reni, polmoni, tratto gastrointestinale, mucosa nasale, cute) sono dotati di capacità metaboliche che, sebbene quantitativamente minore a quelle epatiche, non sono certo meno importanti. Infatti, nonostante il contributo del metabolismo extraepatico al metabolismo totale sia di solito quantitativamente scarso, può essere presente una *specificità* elevata nei confronti di alcuni substrati. Tale specificità può essere dovuta alla presenza (o assenza) di enzimi in grado di riconoscere con affinità diverse la molecola come proprio substrato o a particolari condizioni fisiologiche del tessuto (pH, ossigenazione, presenza di cofattori), che alterano il funzionamento dell'enzima, determinando la formazione di alcuni metaboliti rispetto ad altri. Il profilo metabolico di una sostanza può essere multiplo; lo stesso enzima, o enzimi diversi, possono concorrere alla formazione di più metaboliti, il cui ammontare relativo è determinato dalla velocità delle varie reazioni coinvolte. La concentrazione del substrato è importante nel determinare il contributo di ciascuna reazione. Infatti, alle basse concentrazioni intervengono gli enzimi con affinità maggiore per quella sostanza chimica; all'aumentare della sua concentrazione si ha un aumento proporzionale della quantità di metaboliti prodotti nel tempo, fino a quando il sistema enzimatico coinvolto non sia saturato e lavori alla velocità massima. A *concentrazioni di substrato* supe-

riori a quella di *saturazione*, possono venire attivate vie metaboliche diverse, catalizzate da sistemi enzimatici con affinità minore. Una conseguenza pratica dell'importanza di questo parametro è offerta dalla osservazione dei risultati ottenuti in molti *test* di cancerogenesi su roditori. Gli animali sono trattati infatti con dosi piuttosto elevate di cancerogeno. La scelta della dose viene effettuata generalmente sulla base della Massima Dose Tollerata. In questo modo si evidenzia il massimo effetto possibile, in termini di induzione di tumori, utilizzando un numero limitato di animali. Con questa procedura non si tiene conto però del fatto che la dose potrebbe essere tanto alta da saturare le vie metaboliche operanti alle basse dosi (tipiche peraltro dell'esposizione cronica) e da attivarne altre, che potrebbero essere non rilevanti per l'uomo.

La specificità degli enzimi del sistema chemiometabolizzante può essere determinata anche dalla *regioselettività* per precise posizioni del substrato o dalla *stereoselettività* che determina la configurazione del metabolita che si ottiene, con rilevanti conseguenze tossicologiche. Infatti, molecole con una diversa posizione di un gruppo funzionale o stereoisomeri diversi possono avere attività biologiche distinte.

Oltre alla saturabilità e alla specificità un'altra caratteristica rilevante degli enzimi del metabolismo è la loro *inducibilità*. Alcune sostanze chimiche (induttori) sono in grado di aumentare selettivamente una o più attività enzimatiche sia della Fase I che della Fase II, controllandone l'espressione, attraverso una regolazione sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale (23). Esempi sono offerti dai barbiturici come il fenobarbital, da alcool (etanolo) e chetoni (corpi chetonici nei diabetici), da idrocarburi policiclici aromatici come il benzo(a)pirene del fumo di sigaretta, noti induttori rispettivamente del CYP2B1, del CYP2E1 e del CYP1A1.

La biotrasformazione di uno xenobiotico può essere modulata significativamente da altri composti chimici, in grado di interagire con i sistemi biologici coinvolti. Poiché gli stessi enzimi (P450, GST, UDPGT) riconoscono come substrati vari composti chimici, seppur con affinità e specificità diverse, è possibile che sostanze cosomministrate competano per lo stesso enzima dando luogo a fenomeni di *inibizione enzimatica*. Può anche verificarsi una inibizione irreversibile o "suicida", quando il metabolita è talmente reattivo che reagisce con l'enzima che lo ha formato, producendo un addotto cataliticamente inattivo (16). Il risultato è una diminuzione netta delle capacità metaboliche, spesso estremamente selettiva nei confronti di alcuni CYP.

Questi fenomeni di *interazione tra sostanze chimiche* di cui induzione e inibizione enzimatica sono importanti esempi, sono particolarmente rilevanti se si considera l'esposizione multipla a composti molto diversi a cui siamo giornalmente sottoposti. Il risultato dell'interazione a livello metabolico di due o più sostanze chimiche (tossiche o meno) è generalmente diverso dalla somma algebrica degli effetti di ogni singola sostanza e dipende dalla via metabolica interessata. Infatti, se la sostanza A induce un enzima che catalizza la bioattivazione o se inibisce una reazione di detossificazione della sostanza B si ottiene un potenziamento del suo effetto tossico (sinergismo); se avviene il contrario, si verifica una sua diminuzione (antagonismo) (14).

Le sostanze chimiche interagendo con i sistemi enzimatici deputati al loro metabolismo possono modularne l'espressione, determinando così una variabilità dipendente dallo stile di vita (dieta, consumo di farmaci e di alcolici, abitudine al fumo, contaminanti ambientali e occupazionali, stati patologici) di ciascun individuo. L'e-

spressione di una attività enzimatica può essere modulata non solo da fattori socio-ambientali ma anche da fattori genetici. Molti degli enzimi del metabolismo mostrano infatti *espressione polimorfica*, responsabile della variabilità interindividuale nelle risposte ad un insulto tossico (4 - 10). Si parla di polimorfismo genetico e non più di singoli alleli mutati, quando le varianti alleliche di geni che codificano per questi enzimi sono presenti con una frequenza > 1%. La diversa frequenza di tali varianti alleliche nelle varie popolazioni o gruppi etnici determina la presenza di due fenotipi fondamentali: metabolizzatori lenti (*poor o slow metabolizers* = PM) e metabolizzatori veloci (*extensive o rapid metabolizers* = EM). La distribuzione di frequenza nella popolazione di una specifica attività enzimatica risulterà perciò bimodale.

Le possibili conseguenze del polimorfismo degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici sono l'inadeguatezza delle terapie farmacologiche e una diversa suscettibilità individuale a effetti tossici e a stati patologici con etiologia ambientale come alcune forme di tumore. I soggetti PM sono generalmente a maggior rischio di effetti avversi prodotti da sostanze chimiche che debbano essere detossificate; se i metaboliti prodotti sono però altamente tossici, la situazione si inverte. Sia il genotipo PM che l'EM sono stati alternativamente associati ad un aumentato rischio individuale di sviluppare specifiche patologie. Gli esempi più noti di polimorfismo degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici sono la N-acetilazione di idrazine e arilammine e l'ossidazione catalizzata dal P4502D6 di alcuni farmaci, tra cui l'antiipertensivo debrisochina (4). Nel polimorfismo della N-acetilazione, una delle forme citosoliche di N-acetiltrasferasi è significativamente ridotta negli acetilatori lenti che rappresentano il 40-70% della popolazione europea e il 10-20% degli asiatici. Trattamenti con farmaci come l'isoniazide provocano neuropatie negli acetilatori lenti dovute all'accumulo del farmaco. Negli acetilatori veloci però oltre che ad una mancanza di effetto terapeutico, è frequente l'insorgenza di gravi epatiti, dovute alla formazione di metaboliti tossici dell'isoniazide. D'altra parte il fenotipo acetilatore lento è significativamente più frequente nei pazienti affetti da tumore alla vescica indotto da alcune ammine per le quali la reazione di N-acetilazione è una reale detossificazione. Il polimorfismo dell'ossidazione epatica della debrisochina catalizzata dal P4502D6 (assente nel 7-10% della popolazione europea e in meno dell'1% tra gli asiatici) interessa molti farmaci (beta-bloccanti, antiaritmici, antidepressivi) e altri xenobiotici, tra cui alcuni componenti del fumo di tabacco come il 4-(metilnitrosammino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NNK), un potente precancerogeno del polmone e della mucosa nasale.

Per individuare soggetti "a rischio" possono essere condotti studi di genotipizzazione vale a dire la determinazione del genotipo attraverso test semplici sul DNA (amplificazione allele specifica) che identifichino la presenza di mutazioni note che determinano un determinato fenotipo PM e EM); o di fenotipizzazione cioè la determinazione del fenotipo PM o EM tramite somministrazione di una o più *probe drugs*. Queste ultime sono sostanze non tossiche per l'uomo, almeno a basse dosi, come la caffeina, la cumarina o alcuni farmaci fra cui gli antipiretici amminopirina e antipirina o la debrisochina. Di queste è necessario conoscere le vie metaboliche e l'enzima responsabile della formazione di ciascun metabolita. Una volta ottenute queste informazioni, generalmente attraverso studi *in vitro*, si passa alla somministrazione *in vivo*; il rilevamento dei metaboliti ottenuti nelle urine o nel sangue

permette di determinare la capacità metabolica di ciascun individuo relativa agli enzimi interessati.

La caffeina, per esempio, è N-demetilata specificamente nella posizione 3 dal CYP1A2, la stessa forma responsabile della bioattivazione del potente precancerogeno aflatossina B1 (24). Le N-7 e N-1 demetilazioni sono catalizzate dallo stesso isoenzima, ma in percentuali molto inferiori. La capacità di demetilare con efficienza la caffeina rappresenta perciò un indice della presenza di buoni livelli di CYP1A2 negli individui, che risultano perciò maggiormente suscettibili all'azione di precancerogeni come la aflatossina B1. I metaboliti primari della caffeina possono essere poi acetilati; il rilevamento nelle urine dei prodotti di questa reazione può dare anche un indice dei livelli di espressione di N-acetiltrasferasi.

SISTEMI *IN VITRO* PER STUDI DI METABOLISMO

La biotrasformazione è un fenomeno complesso per l'intervento di molteplici fattori concomitanti: substrati e metaboliti diversi e isoenzimi spesso espressi specificamente in particolari organi e/o tessuti e regolati dall'azione di altre sostanze chimiche o di ormoni.

Proprio questa situazione rende gli studi di biotrasformazione *in vivo* di difficile interpretazione. È necessario perciò ricorrere a sistemi *in vitro* (da enzimi purificati a organi perfusi, procedendo verso sistemi a complessità crescente), per poter effettuare studi di biotrasformazione e di meccanismi di tossicità in grado di fornire informazioni utili che poi potranno essere verificate *in vivo*. Il criterio cruciale per selezionare il sistema *in vitro* più appropriato a rispondere ad uno specifico problema sperimentale è la conoscenza delle proprietà intrinseche del sistema stesso.

Studi specifici su meccanismi di bioattivazione possono essere condotti con *enzimi purificati*, che permettono di lavorare avendo a disposizione un sistema molto semplificato, con una ben definita attività enzimatica. La purificazione comporta comunque un lavoro lungo, non compensato dalla limitata quantità del materiale ottenuto. La ricostituzione dell'ambiente necessario per il funzionamento degli enzimi purificati è inoltre un sistema molto artificiale e ben lontano da una situazione fisiologica.

Le *frazioni subcellulari* (omogenati di tessuto, frazione *post*-mitocondriale o S-9, microsomi e citosol) sono uno dei sistemi più usati perché offrono il vantaggio di essere facilmente reperibili, facili da preparare da specie e organi diversi e, una volta ottenute, se conservate a -80°C, possono essere utilizzate per tempi sufficientemente lunghi, mantenendo intatte le attività enzimatiche. Lavorando con le frazioni subcellulari è possibile l'identificazione dei vari metaboliti, dell'enzima responsabile della biotrasformazione di un dato xenobiotico, degli eventuali danni biochimici prodotti dai metaboliti tossici. È anche possibile studiare differenze di specie o di organo nel metabolismo di una sostanza, così come l'influenza di induttori o inibitori enzimatici. I microsomi sono vescicole membranose tondeggianti, che si formano spontaneamente per sedimentazione del reticolo endoplasmatico; essi contengono perciò tutti gli enzimi (P450, UDPGT e alcune forme di Epossido Idrolasi, ad esempio) localizzati nelle membrane del reticolo endoplasmatico liscio e ruvido, ma mancano dei vari cofattori necessari alla catalisi enzimatica, che vanno aggiunti dall'e-

sterno nei vari saggi di metabolismo. Utilizzando il citosol, si possono studiare invece quelle biotrasformazioni catalizzate da enzimi solubili come le GST o alcune forme di EH. L'uso della frazione post-mitocondriale (S-9) o degli omogenati di tessuto aumenta la complessità del sistema, offrendo come unico vantaggio quello di poter analizzare il metabolismo in maniera sequenziale.

Questa possibilità è offerta anche dall'uso di *cellule fresche isolate* (epatociti, cellule del tubulo contorto prossimale renale, enterociti, cellule di polmone) che hanno però un vantaggio in più: mantengono integra la struttura cellulare. Si è quindi più vicini alla situazione *in vivo*, pur disponendo ancora di un sistema relativamente poco complesso. Le cellule fresche isolate e tenute in sospensione sono quindi un buon modello per studi di metabolismo e citotossicità, ma non possono essere utilizzate per studiare effetti a lungo termine. Infatti solo nelle prime ore di utilizzazione *ex vivo* le cellule mantengono la loro funzionalità dal punto di vista metabolico; nelle colture primarie di epatociti, per esempio, a causa di una deficienza in L-ascorbato si ha una perdita significativa degli enzimi del metabolismo, in particolare di P450. Variazioni nella composizione del mezzo di coltura tramite aggiunta di vitamine, ormoni, fattori di crescita, induttori enzimatici, e vari altri cofattori, nel tentativo di mantenere inalterati i livelli delle attività P450-dipendenti, hanno dato risultati insoddisfacenti, così come le varie metodiche proposte di criopreservazione degli epatociti. Studi recenti hanno evidenziato che il mantenimento della funzionalità degli epatociti richiede condizioni ben definite, regolate non solo da fattori solubili esterni alla cellula, ma soprattutto da interazioni tra le cellule e tra cellule e matrice. Risultati incoraggianti si sono ottenuti utilizzando speciali supporti di derivazione biologica (matrigel o vetrogen) su cui far aderire le cellule. Probabilmente però l'approccio più promettente è quello delle co-colture di epatociti con cellule non parenchimatiche come cellule endoteliali, fibroblasti umani, linee cellulari stabilizzate di fibroblasti o di cellule epiteliali. In questo modo, attraverso una modifica delle interazioni tra le cellule si ottengono colture di epatociti idonee a studi di metabolismo e meccanismi di tossicità.

Le *linee cellulari stabilizzate* hanno dalla loro l'enorme vantaggio di avere una disponibilità elevata e una capacità di crescita illimitata. Sono però considerate spesso poco rappresentative rispetto a condizioni fisiologiche perché mancano di alcune attività enzimatiche, abbondando di altre. Un esempio sono le V79, una linea cellulare derivata da tessuto polmonare di hamster cinese. Queste cellule sono totalmente prive di attività monoossigenasica P450-dipendente, responsabile dei passaggi iniziali di biotrasformazione della maggior parte dei precancerogeni, ma mostrano livelli di GST addirittura superiori a quelli di epatociti freschi. In passato le V79 come altre linee cellulari di mammifero sono state spesso utilizzate in studi di mutagenesi come sistema indicatore in presenza di un sistema di attivazione esterno. Un sistema di attivazione esterno alla cellula ha però notevoli svantaggi. Infatti i metaboliti reattivi formatisi esternamente potrebbero non essere in grado di raggiungere il bersaglio critico intracellulare, attraversando la membrana sia per problemi di solubilità che di bassa emivita. È possibile infatti che reagiscano direttamente con i siti nucleofili delle proteine e dei lipidi della frazione subcellulare responsabile dell'attivazione, dando luogo a dei falsi negativi. Per questa ragione il sistema più idoneo è un organismo indicatore metabolicamente competente. Tuttavia gli studi di caratteriz-

zazione delle attività enzimatiche proprie del metabolismo degli xenobiotici nelle linee cellulari più utilizzate nei vari test di citotossicità (8), hanno mostrato che alcune linee (e non solo di epatociti) sono in grado di biotrasformare a livelli apprezzabili vari xenobiotici e rispondono bene all'azione di induttori.

Tali linee sono perciò un mezzo estremamente utile per studi tossicologici.

Negli ultimi anni è sempre più frequente l'uso di *linee di cellule geneticamente ingegnerizzate* che esprimono una attività enzimatica altamente definita ed hanno una disponibilità e una crescita illimitata. Un gene codificante un particolare enzima di qualsiasi specie, uomo incluso, può essere clonato e trasferito in una cellula recipiente, permettendo lo studio dell'attività dell'enzima codificato in un ambiente cellulare e non in un sistema ricostituito, come nel caso degli studi con enzimi purificati. Possono essere utilizzati batteri (E. coli) (6) e lieviti (13) come organismi recipienti, soprattutto se è necessaria l'espressione dell'enzima in larga scala per scopi sperimentali specifici. Sono utilizzate anche cellule di mammifero, che generalmente producono quantità minori di enzima, ma hanno il vantaggio di contenere rilevanti bersagli biologici. Un esempio è offerto dalle già menzionate V79 che sono un sistema particolarmente adatto a questo scopo, poiché, essendo prive di attività monoossigenasica propria, ben si prestano allo studio dell'attività dell'enzima espresso, senza interferenze (5). L'espressione di uno specifico CYP nelle V79 permette quindi di studiare gli effetti della biotrasformazione di un dato xenobiotico, sia a livello molecolare che cellulare nello stesso sistema biologico che ha funzioni sia di attivatore che di indicatore. Il trasferimento di più geni codificanti per enzimi diversi, aumenta gradualmente il grado di complessità permettendo di chiarire vie metaboliche multiple. L'espressione poi di geni umani può essere utilissima, data la scarsa possibilità di lavorare con frazioni subcellulari o con cellule fresche provenienti da tessuti umani (9).

I recenti progressi nelle tecniche di biologia molecolare, oltre all'introduzione dell'uso di linee cellulari ingegnerizzate hanno reso possibile anche lo sviluppo di modelli animali come i *topi transgenici* (19). Pur non trattandosi di un modello sperimentale proprio della tossicologia *in vitro*, è comunque un approccio estremamente interessante e promettente, e la possibilità di ottenere risultati più facilmente interpretabili rispetto ai test di tossicità classici può essere visto nell'ottica generale di tendenza alla diminuzione nell'uso di animali. I topi transgenici si ottengono utilizzando un vettore transgenico costruito con tecniche di DNA ricombinante per inserire un nuovo gene nel genoma murino oppure un gene di topo opportunamente mutato in modo da renderlo inattivo, per produrre topi *knock-out* (22). Una delle tecniche per ottenere topi transgenici è quella di iniettare il vettore in uova fertilizzate, rimosse dall'ovidotto e successivamente reintrodotte nell'ovidotto di una madre surrogato. Nel caso dei topi *knock-out* in alternativa il vettore può essere introdotto in cellule staminali embrionali per ricombinazione omologa. Il vettore contiene di solito anche sequenze geniche *marker*, in modo da poter selezionare *in vitro* solo le cellule staminali in cui la ricombinazione sia avvenuta. Solo quelle cellule selezionate come portatrici del gene mutato vengono inserite in embrioni di topo recipienti allo stadio di blastocisti. I topi chimerici ottenuti alla prima generazione e selezionati per il colore del pelo, di cui è responsabile un altro gene *marker* presente sul vettore, vengono successivamente accoppiati più volte tra loro in modo da ottenere topi eterozigoti e poi omozigoti per il gene interessato. Un modello come questo

può essere utilizzato per studiare la funzione di un gene *in vivo*; in particolare come e perché specifici geni sono espressi in alcuni tessuti e cellule e non in altri e i sistemi di regolazione della loro espressione.

Quest'ultimo aspetto è particolarmente interessante nel caso degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici, considerando che i livelli di attività di un enzima possono determinare un diverso grado di suscettibilità individuale ad un agente tossico. La costruzione di diverse linee di topi transgenici in grado di esprimere un gene a bassi o alti livelli o di non esprimerlo affatto, potrebbe essere direttamente rappresentativo della risposta ad un insulto tossico di una popolazione eterogenea.

BIBLIOGRAFIA

1) ARINC E., SCHENKMAN J. B. and HODGINS E. Ed. (1991). *"Molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds"* Plenum Press, New York.

2) BICKEL M.H. (1988) *Adipose tissue storage of xenobiotics* in "Metabolism of xenobiotics" Gorrod J.W., Oelschlaeger H. and Caldwell J. Eds., Taylor and Francis London, pag. 7-12.

3) CALDWELL J. AND JACOBY W. B. Eds (1983). *"Biological basis of detoxication"* Academic Press, New York.

4) DALY A.K., CHOLERTON S., GREGORY W. and IDLE J.R. (1993) *Metabolic polymorphisms.* Pharmac. Ther., 57, 129-160.

5) DOEHMER J., OESCH F. (1991) *V79 Chinese hamster cells genetically engineered for stable expression of cytochromes P450.* In: Waterman M., Johnson E. (eds) Methods Enzymol., 206, p 117-123.

6) FISHER C.W., CAUDIE D.L., MARTIN-WIXTROM C., QUATTROCCHI L.C., TUKEY R.H., WATERMAN M.R. and ESTABROOK R.W. (1992) *High level expression of functional human cytochrome P4501A2 in Escherichia coli,* FASEB J., 6, 759-764.

7) GILLETTE J.R. (1985) *Pharmacokinetics of biological activation and inactivation of foreign compounds, in "Bioactivation of foreign compounds"*, Anders M. W. Ed. Academic Press, New York, pag. 30-70.

8) GLATT H., GEMPERLEIN I., SETIABUDI F., PLATT K.L. and OESCH F. (1990) *Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds.* Mutagenesis, 5, 241-249.

9) GONZALES F.J., CRESPI C.L., GELBOIN H.V. (1990) *cDNA-expressed human cytochrome P450s: a new age of molecular toxicology and human risk assessment.* Mutat. Res., 247, 113-127.

10) GONZALES F.J. (1992) *Human Cytochrome P450: problems and prospects.* TIPS, 13, 346-352.

11) GUENGERICH F.P. (1992) *Metabolic activation of carcinogens*, Pharmac. Ther., 54, 17-61.

12) GUENGERICH F.P. (1991) *Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes.* J. Biol. Chem., 266, 10019-10022.

13) GUENGERICH F.P., BIAN W.R., SARI M.A., ROSS J.T (1991) *Expression of mammalian cytochrome P450 enzymes using yeast-based vectors* Methods Enzimol., 206, 130-145.

14) ISSX Proceedings, IV European ISSX Meeting *"Toxicological evaluation of chemical interactions:relevance of social, environmental and occupational factors"* (1992), Volume 1.

15) LARSSON A., ORRENIUS S., HOLMGREN A., MANNERVIK B. Eds. (1983) *"Functions of glutathione. Biochemical physiological, toxicological and clinical aspects"* Raven Press, New York.

16) MANNO M., DE MATTEIS F. and KING L.J. (1988) *The mechanism of the suicidal, reductive inactivation of microsomal P450 by carbon tetrachloride,* Biochem. Pharmacol., 37, 1981-1990.

17) MARTUCCI C.P. and FISHMAN J. (1993) *P450 enzymes of estrogen metabolism Pharmac.* Ther., 57, 237-257.

18) MILLER E.C. and MILLER J. (1985) *Some historical perspectives on the metabolism of xenobiotic chemicals to reactive electrophiles*, in "Bioactivation of foreign compounds" Anders M. W. Ed. Academic Press, New York, pag. 3-29.

19) MITCH E. (1993) *The use of transgenic mice for environmental health research.* Environ. Health Persp., 101, 298-300.

20) NELSON D.R., KAMATAKI T., WAXMAN D.J., GUENGERICH F.P., ESTABROOK R.W., FLYEREISEN R., GONZALES F.J., COON M.J., GUNSALUS I.C., GOTOH O., OKUDA K., NEBERT D.W. (1993) *The P450 superfamily: update of new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature.* DNA and Cell Biology, 12, 1-51.

21) PORTER T.D. and COON M.J. Cytochrome P450 (1991) *Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms.* J. Biol. Chem., 266, 13469-13472.

22) SHASTRY B.S. (1995) *Genetic knockouts in mice: an update.* Experientia, 51,1028-1039.

23) TESTAI E. (1994) *La biotrasformazione degli xenobiotici*, In "Colture cellulari in Tossicologia", F. Zucco e V. Bianchi Eds., Lombardo Editore - Roma, Cap. 4, pagg.81-98.

24) KALOW W. and TANG B.K. (1993) *The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal.* Chem. Pharmacol. Ther., 53, 503-514.

ROBERTA TIOZZO

I TEST DI CITOTOSSICITÀ

Dipartimento di Scienze Biomediche - Sezione di Patologia Generale
Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università degli Studi - Modena

RIASSUNTO

Le colture cellulari di mammifero possono essere utilizzate per fornire indicazioni preliminari sulla tossicità di sostanze ad azione non nota. Nella prima parte si descrivono la scelta della linea cellulare, le caratteristiche, la modalità di somministrazione della sostanza in esame ed il tipo di trattamento. Nella seconda parte sono illustrati i metodi più utilizzati per rilevare i principali indicatori di citotossicità quali la riduzione della vitalità cellulare (espressa come modificazione della permeabilità della membrana plasmatica), l'inibizione della crescita, le alterazioni metaboliche e morfologiche. I *test* di citotossicità presentano vantaggi e svantaggi; devono essere semplici, sensibili, economici in termini di tempo e di denaro, riproducibili all'interno e fuori del laboratorio e devono avere una buona base scientifica.

Parole chiave: colture cellulari - in vitro - citotossicità

IN VITRO CYTOTOXICITY ASSAY

SUMMARY

Mammalian cell cultures can be used for preliminary screening of acute toxicity of several chemical agents. In the first part of our report, we have shown the culture method, the nature and the concentration of the compounds and the exposure duration. In the second part, the range of aims considered for use in identifying cytotoxic effects are outlined. We have listed assays of cell viability, membrane integrity, cell growth, specific metabolic and morphological effects, indicating limitations, advantages and disadvantages. Cytotoxicity tests should be simple, reliable, sensitive, economic in terms of time and money and should be reproducible in the same laboratory and among laboratories.

Key words: cell cultures - in vitro - cytotoxicity

INTRODUZIONE

Utilizzando colture cellulari di mammifero, sistemi sperimentali relativamente semplici rispetto alla situazione *in vivo*, si possono ottenere indicazioni preliminari sulla tossicità di una sostanza ad azione non nota (il cosiddetto *screening*) per orientare

meglio ulteriori indagini *in vitro* e *in vivo* e si possono risolvere nei dettagli i meccanismi d'azione di composti già riconosciuti come tossici. Si passeranno in rassegna i metodi più seguiti nello *screening* dei composti tossici.

SCELTA DELLA LINEA CELLULARE

La scelta del tipo cellulare dipende principalmente dallo studio che si sta compiendo e dalla sostanza da saggiare. I saggi vengono per lo più eseguiti su linee stabilizzate. Queste sono facilmente disponibili ed omogenee in diversi parametri funzionali. Le linee stabilizzate sono però spesso prive delle vie di trasformazione metabolica, presenti invece *in vivo*. Per ovviare a questo problema, in molti casi i *test* vengono condotti in presenza o in assenza di sistemi metabolizzanti. Come sistemi metabolizzanti si aggiungono al mezzo di coltura cellule intatte, generalmente epatociti, oppure delle frazioni ottenute per centrifugazione frazionata dall'omogenato di fegato di ratto (S9, S15, frazione microsomiale). Se lo scopo del *test* è anche quello di predire la tossicità nell'uomo, è consigliabile il ricorso a linee umane piuttosto che a linee derivate da altri mammiferi.

LA SOSTANZA IN ESAME

1. Solubilità

I composti da saggiare possono essere solubili in acqua oppure insolubili, volatili o estratti liquidi. I composti insolubili in acqua possono essere studiati soltanto come sospensioni o dopo essere stati solubilizzati con solventi organici idrosolubili come l'etanolo, il dimetilsulfossido, la dimetilformamide, ecc. I solventi organici però possono essere di per sè tossici. L'etanolo per non produrre citossicità dovrebbe essere diluito 1000 volte, il dimetilsulfossido 100 volte. È comunque sempre necessario allestire appropriati controlli con il solo solvente.

2. Volatilità

Se la sostanza da esaminare è un composto volatile è necessario operare ad es. in bottiglie ben chiuse, piastre sigillate ecc., per evitare che l'evaporazione riduca la quantità del composto realmente presente, soprattutto se si eseguono trattamenti lunghi.

3. Conservazione

È pratica corrente preparare delle soluzioni stock del composto, suddividerle in aliquote e mantenerle congelate.

È importante ricordare che durante la sterilizzazione, se si utilizzano filtri di acetato o nitrato di cellulosa, si può verificare una perdita o un cambiamento strutturale del composto.

4. Interazioni con il mezzo di coltura e con l'ambiente della coltura

Di solito le cellule vengono trattate aggiungendo i composti da saggiare nel terreno completo di siero. Le proteine contenute nel siero possono però legare e/o inattivare i composti in esame, riducendone la quantità effettivamente disponibile e mascherandone l'eventuale tossicità. Queste interazioni possono essere evitate eseguendo i trattamenti in assenza di siero. In tal caso però questi trattamenti devono essere limitati nel tempo perché le lunghe incubazioni senza siero finiscono per danneggiare le membrane cellulari, indipendentemente dall'azione degli agenti tossici.

Quando gli esperimenti vengono condotti in capsule di plastica, è possibile che vengano rilasciati dei prodotti chimici dalla capsula stessa. Il contenitore può anche adsorbire in superficie i composti in esame oltre alle proteine provenienti dal mezzo di coltura.

5. Concentrazione della sostanza in esame

Nello screening preliminare, il FRAME (*Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments*) raccomanda di usare una ampia gamma di dosi, somministrando le sostanze alla concentrazione finale di 0.1, 1.0, 10, 100, 1000 μg/ml oppure, quando se ne conosce il peso molecolare, 10^{-3}M, 10^{-4}M, 10^{-5}M, 10^{-6}M. (2, 10). Una volta precisato l'andamento della curva dose-risposta, l'intervallo di concentrazioni può essere ristretto per determinare con più precisione l'andamento della curva dose-effetto ed eventualmente il valore della ID_{50} (dose inibitrice per il 50% delle cellule).

6. Tempo di esposizione

Nei saggi di citotossicità, il prodotto da saggiare aggiunto al mezzo di coltura vi rimane fino a che il mezzo non viene sostituito o fino al momento in cui esso non si degrada spontaneamente. È necessario tenere ben presente che queste modalità di trattamento contrastano con la situazione *in vivo*.

È provato che il trattamento con tripsina altera la suscettibilità delle cellule al composto tossico ed inoltre che il composto tossico può interferire con l'adesione delle cellule al substrato. È pertanto consigliabile includere nel protocollo sperimentale un intervallo tra la semina ed il trattamento, incubando le cellule in terreni appropriati prima dell'aggiunta della sostanza da saggiare.

La durata del tempo di esposizione dipende dalle caratteristiche e dalle proprietà della sostanza e dal tipo di parametro che si vuole misurare. Esistono saggi rapidi, da poche ore di esposizione, e saggi lenti anche di diversi giorni. Nella scelta di trattamenti prolungati, va tenuto conto dell'instabilità dei composti nel mezzo di incubazione. Durante tutto il periodo di incubazione è importantissimo mantenere controllati i fattori ambientali quali la temperatura, l'umidità, la composizione dell'atmosfera, la sterilità ed il pH.

7. Tempo di ripresa dopo l'esposizione

L'inserimento di un periodo di ripresa dopo l'esposizione delle cellule alla sostanza in esame è importante per varie ragioni: 1) può permettere l'inversione di una inibizione metabolica, 2) il danno può essere riparato, 3) può mettere in evidenza una citotossicità ritardata.

TRATTAMENTO

Nei trattamenti *in vitro*, le cellule sono direttamente esposte alle sostanze attraverso il mezzo di incubazione, ciò le rende particolarmente vulnerabili, con la possibilità di fornire sovrastime del potenziale citotossico dei composti saggiati. Queste condizioni sperimentali non riproducono le condizioni esistenti in vivo. *In vitro* inoltre si riproducono più facilmente i trattamenti di tipo acuto rispetto a quelli di tipo cronico.

È importante eseguire i trattamenti in condizioni il più possibile "fisiologiche" per le cellule, evitando cioè di provocare danni aspecifici dovuti non alla sostanza in esame, ma alle condizioni in cui le cellule vengono a trovarsi. È anche raccomandabile l'impiego di dosi non troppo elevate che non hanno nessuna relazione con le probabilità di esposizione *in vivo*.

TEST DI CITOTOSSICITÀ

Indicatori di citotossicità generale sono la riduzione della vitalità cellulare (espressa come modificazioni della permeabilità della membrana plasmatica), l'inibizione della crescita, le alterazioni metaboliche e morfologiche (5, 6). Si tratta di effetti piuttosto aspecifici, nel senso che possono risultare da interferenze con strutture e funzioni cellulari diverse.

Attualmente per quantificare e caratterizzare la vitalità cellulare si utilizzano diversi protocolli sperimentali in grado di misurare la capacità riproduttiva e/o la capacità funzionale delle cellule.

Permeabilità della membrana plasmatica

1. Esclusione di coloranti

Questi saggi si basano sulla misura della permeabilità della membrana cellulare, partendo dal presupposto che le membrane danneggiate permettono alle molecole di una certa dimensione, normalmente escluse dal citoplasma, di penetrare nella cellula. Se le molecole aggiunte sono colorate o fluorescenti, le cellule danneggiate possono essere identificate facilmente al microscopio. Il colorante più usato è il *tripan blu*, altri coloranti utilizzati sono la safranina, l'eosina e l'eritrocina. Come sostanze fluorescenti si usano lo ioduro di propidio, il bromuro di etidio e l'arancio di acridina: se la membrana cellulare è danneggiata esse entrano nella cellula, si

legano agli acidi nucleici e la cellula appare fluorescente. In questo caso la quantificazione delle cellule danneggiate deve essere eseguita con il microscopio a fluorescenza o con l'impiego di un citofluorimetro (FACS, *fluorescence activated cell sorter*).

2. Accumulo di coloranti

La vitalità cellulare può essere determinata anche in base alla perdita della capacità di trattenere coloranti vitali. Il diacetato di fluoresceina diffonde velocemente nelle cellule vive dove viene idrolizzato per opera delle esterasi cellulari a fluoresceina, molecola polare che viene intrappolata nel citoplasma e non diffonde attraverso gli strati lipidici del plasmalemma. Le cellule vitali, che hanno trattenuto il colorante, appariranno verdi al microscopio a fluorescenza, mentre le cellule morte risulteranno scure.

Un altro metodo che misura la perdita della capacità di trattenere coloranti nella cellula, è quello del rosso neutro, colorante che viene accumulato nei lisosomi delle cellule con le membrane integre (3). Il rosso neutro accumulato, viene estratto e la valutazione quantitativa viene fatta allo spettrofotometro. L'effetto di una sostanza tossica riduce la quantità di rosso neutro assunto dalle cellule. Questo metodo può fornire anche una determinazione indiretta del numero delle cellule.

3. Rilascio di costituenti cellulari nel mezzo di coltura: rilascio di enzimi

La vitalità cellulare può essere valutata misurando la perdita di costituenti cellulari nel mezzo di incubazione quali enzimi: lattico deidrogenasi, fosfatasi alcalina, galattosidasi, amino peptidasi, malatodeidrogenasi, ecc. ed acidi nucleici, nucleotidi, zuccheri e prodotti di degradazione. Tra gli enzimi rilasciati nel mezzo, la lattico deidrogenasi (LDH) è comunemente misurata in molti laboratori, ed esistono per questo saggio anche *kit* commerciali.

4. Premarcatura con Cromo esavalente

Il ^{51}Cr esavalente, un radioisotopo gamma, è usato generalmente per studiare la citotossicità anticorpo-mediata, ma anche per rivelare danni alla membrana cellulare. Il $Na_2{}^{51}CrO_4$ entra nelle cellule e si riduce a ^{51}Cr trivalente, che forma complessi con le proteine e con altri componenti cellulari e non è più in grado di attraversare la membrana. Le cellule vitali, al contrario di quelle danneggiate, non rilasciano radioattività nel mezzo. Uno degli svantaggi di questa misurazione è che, data la tossicità del cromo (VI), nelle prime 24 h di trattamento si verifica il rilascio spontaneo di circa il 45-50% delle proteine marcate con ^{51}Cr anche in cellule non trattate. Questo fatto limita l'applicazione del metodo a eventi citotossici che causano danni cellulari in tempo breve; inoltre per ottenere un buon legame intracellulare con le proteine, il $^{51}Cr^{6+}$ deve essere convertito a $^{51}Cr^{3+}$ e non tutte le cellule si marcano sufficientemente.

5. Rilascio di precursori marcati

Le cellule vengono premarcate con un precursore opportuno per il DNA o l'RNA o le proteine, quali ^{3}H-prolina, ^{3}H-uridina, ^{75}Se-metionina, poi portate in terreno

fresco non radioattivo e trattate con l'agente tossico. L'aumento della radioattività nel mezzo di coltura alla fine del trattamento rispetto ai controlli è segnale di lesioni alla membrana cellulare.

Il limite dei saggi di permeabilità è che essi individuano il danno alla membrana citoplasmatica solo quando questo è grave e particolarmente distruente. Ciò comporta che gli eventi citotossici che producono alterazioni in distretti diversi dalla membrana plasmatica possono passare inosservati fino a che il danno non si diffonde alla membrana stessa o che altri eventi potenzino il danno già presente.

Misura della crescita cellulare

Nei test di citotossicità il parametro più comunemente considerato è l'inibizione della proliferazione cellulare. La durata dei trattamenti, da 24 a 72 h, dipende soprattutto dalla durata del ciclo della linea cellulare usata. Il tempo più lungo dà risposte più nette e permette di riconoscere eventuali effetti ritardati.

Lo sviluppo può essere valutato mediante il *conteggio diretto delle cellule*, oppure misurando qualche parametro proporzionale al numero di cellule (*determinazione indiretta del numero delle cellule*) (8).

L'inibizione della crescita può essere determinata anche in colture clonali: esse risultano generalmente più sensibili e possono essere impiegate per determinare in modo più accurato piccole differenze di tossicità tra composti con proprietà simili.

1. Conteggio diretto delle cellule

Il conteggio diretto delle cellule viene eseguito al microscopio con una camera di Bürker o di Neubauer, oppure con l'ausilio di un contatore automatico. Nella maggior parte dei laboratori si ricorre al conteggio al microscopio. Data la laboriosità e la tediosità dei conteggi al microscopio, raramente questa procedura è usata come unico metodo.

2. Efficienza di piastramento

Il conteggio di colonie sviluppate da cellule singole trattate con vari composti tossici è un saggio molto sensibile e riproducibile, perché esso misura la reale integrità riproduttiva delle cellule. Una limitazione del test è data dall'esigua varietà di linee cellulari in grado di dare colonie da cellule singole e dalla durata piuttosto lunga del saggio. Ciò aumenta la probabilità di contaminazione delle colture, le possibili interazioni tra il tossico ed il mezzo di coltura e l'inattivazione del composto in esame.

3. Determinazione indiretta del numero di cellule

Tali test si basano sulla determinazione quantitativa di componenti endogeni delle cellule, quali DNA, RNA o proteine, o sull'estrazione di un colorante legato alle cellule presenti nei vari campioni sperimentali (9).

a) *Determinazione delle proteine totali*

I metodi tradizionali sono quello di Lowry e quello di Bradford su cui si basa un *kit* commerciale di largo impiego. Entrambi i metodi prevedono l'estrazione delle proteine dalle cellule e quindi la distruzione dei monostrati cellulari.

b) *Determinazione del DNA*

Il DNA è misurato con metodi colorimetrici specifici quali il Feulgen, o con coloranti fluorescenti come l'Hoechst 33258 o il Dapi. Il DNA estratto può essere misurato direttamente in base al suo assorbimento a 260 nm.

c) *Determinazione dell'RNA*

L'RNA può essere quantificato in base all'assorbimento all'ultravioletto, a 260 nm.

d) *Determinazione del contenuto di macromolecole totali*

Un metodo ancora più semplice sfrutta l'assorbimento spontaneo nell'UV degli acidi nucleici e delle proteine e misura il complesso di queste macromolecole presenti nella popolazione cellulare (7).

e) *Determinazione basata sull'uso di coloranti.*

Si può valutare il numero di cellule nei vari campioni sperimentali utilizzando coloranti che vengono prima fatti reagire con le cellule fissate (cristalvioletto, sulforodamina B, blu di toluidina, blu di metilene), o somministrati a fresco come il rosso neutro, e poi estratti dai monostrati in soluzioni di cui si misura la densità ottica alla spettrofotometro.

I metodi che prevedono la fissazione delle cellule prima della determinazione possono produrre sottostime della tossicità. Infatti durante la fissazione si conservano anche le cellule morte, ancora aderenti al substrato, che interferiscono poi nella misura. Con il rosso neutro invece, il colorante viene trattenuto soltanto dalle cellule vitali e la misura finale riguarda soltanto questa porzione della popolazione cellulare. I limiti di sensibilità e la linearità dei risultati sono influenzati anche dalle condizioni sperimentali quali, per es., il numero di giorni in coltura o la linea cellulare usata. È importante quindi inserire controlli interni ai singoli esperimenti, e standardizzare rigorosamente i metodi seguiti.

4. Interferenze con il ciclo cellulare

Colture che presentano inibizione della crescita mostrano anche alterazioni della progressione lungo il ciclo cellulare. Queste alterazioni possono chiarire il meccanismo alla base dell'inibizione. Con tecniche opportune si può misurare l'indice mitotico e la frazione ciclante.

5. Incorporazione di precursori marcati nelle macromolecole

La determinazione dell'incorporazione in macromolecole cellulari di un precursore marcato esogeno quale: timidina, uridina fornisce un parametro dell'inibizione della crescita più specifico della valutazione, diretta o indiretta, del numero di cellule.

Saggi metabolici

I saggi funzionali o metabolici valutano la vitalità cellulare misurando i componenti e le attività enzimatiche necessarie per il mantenimento dello stato energetico della cellula (1).

1. Determinazione dei livelli di ATP (adenosintrifosfato), ADP (adenosindifosfato), AMP (adenosinmonofosfato) intracellulari

L'energia cellulare è generalmente misurata determinando i livelli totali di ATP anche se la concentrazione totale di ATP, ADP e AMP sarebbero indici dello stato energetico cellulare più appropriato. Per misurare l'ATP si possono utilizzare attualmente diverse tecniche: a) il sistema enzimatico a bioluminescenza luciferina-luciferasi; b) la risonanza magnetica nucleare (NMR) dopo marcatura con ^{31}P, c) la misura del pool di ATP, ADP e AMP dopo marcatura con ^{32}P o con adenina ^{3}H; d) la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC).

2. Determinazione dell'attività di enzimi coinvolti nella sintesi di ATP (succinato deidrogenasi)

Il *test* con i sali di tetrazolio (MTT) (4) si basa sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima respiratorio mitocondriale succinato deidrogenasi in un prodotto insolubile in acqua di colore rosso mattone, il formazano. I cristalli di formazano sono solubilizzati con dimetilsulfossido e la soluzione colorata è misurata allo spettrofotometro. Le cellule vitali a differenza di quelle trattate riducono i sali di tetrazolio.Un limite è però dato dal fatto che vari tipi cellulari richiedono tempi diversi di colorazione e che il metodo non è particolarmente sensibile. Per queste ragioni, il test MTT può servire come saggio preliminare per uno *screening* grossolano di sostanze tossiche prima di utilizzare altri metodi più sensibili e accurati.

3. Determinazione della sintesi proteica

L'indice di incorporazione di aminoacidi marcati nelle proteine può offrire un metodo alternativo per la misura della vitalità cellulare. Si usa generalmente leucina marcata con ^{14}C o metionina marcata con ^{35}S.

4. Misura della capacità delle cellule di mantenere ioni e aminoacidi

Per mantenere l'equilibrio elettrochimico le cellule utilizzano le proprietà semipermeabili della membrana citoplasmatica e l'energia. I composti citotossici, che alterano la permeabilità della membrana e lo stato energetico cellulare, possono modificare più o meno severamente sia il gradiente di ioni che quello degli aminoacidi. I metodi per misurare i livelli di ioni e aminoacidi intra ed extracellulari comprendono tecniche di routine (tecniche radioisotopiche, marcatori fluorescenti, ecc.) e/o tecniche molto sofisticate (cromatografia, elettrodi che misurano le concentrazioni di calcio e potassio, spettrofotometro ad assorbimento atomico, ecc.).

5. Misura della respirazione e della glicolisi

Le variazioni indotte da sostanze tossiche nella respirazione e nella glicolisi possono essere rilevate polarograficamente con l'elettrodo di vetro di Clark o misurando la formazione di $^{14}CO_2$ in cellule preincubate con glucosio marcato.

Saggi morfologici

L'osservazione della morfologia è il modo più semplice per valutare la normalità delle cellule. I *test* morfologici possono essere eseguiti con il microscopio ottico, a contrasto di fase, a fluorescenza o con il microscopio elettronico. Cambiamenti morfologici più o meno evidenti della superficie, delle dimensioni e della forma della cellula, del nucleo e del nucleolo, delle giunzioni cellula/cellula e del citoscheletro possono verificarsi dopo l'esposizione ad una sostanza tossica.

Questi cambiamenti sono manifestazioni non necessariamente specifiche di tossicità e sono pertanto meno utili dei *test* di permeabilità, dei test di funzionalità e di quelli riproduttivi.

CONCLUSIONI

I saggi di citotossicità *in vitro* hanno raggiunto attualmente un grado di riproducibilità e concordanza notevole. Quello che rimane da accertare è se tali effetti si producono anche in vivo nelle cellule che vengono raggiunte dai composti tossici, o comunque se è possibile trovare una correlazione tra gli effetti *in vitro* e quelli *in vivo*.

Gli scopi per i quali i *test* di citotossicità vengono messi a punto sono vari, e richiedono *test* con caratteristiche differenti. Se lo scopo è quello di ridurre la sperimentazione *in vivo*, allora è importante disporre di *test* semplici e ben standardizzati riproducibili in qualunque laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1) ANDREOLI T., DAL DEGAN B, DE ANGELIS I, FORTUNATI E. REGGIANI D., BIANCHI V., TIOZZO R. and ZUCCO F. (1991) *Evaluation of metabolic end-points of acute cytotoxicity in V79 fibroblasts.* Toxicol in Vitro, 5, 549-553.
2) BALLS M. and HORNER S.A., (1985) *The FRAME interlaboratory programme on in vitro cytotoxicology.* Fd Chem Toxic, 23, 209-213.
3) BORENFREUND E. and PUERNER J.A. (1985) *Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption.* Toxicol Lett, 24, 119 -124.
4) BOREFREUND E., BABICH H. and MARTIN-ALGUACH N. (1988), *Comparison of two in vitro cytotoxicity assys- the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests Toxic.* In Vitro, 2, 1-6.
5) CINGI M.R., DE ANGELIS I., FORTUNATI E., REGGIANI D, BIANCHI V., TIOZZO R., and ZUCCO F. (1991). *Choice and standardization of test protocols in citotoxicology: a multicentre approach.* Toxicol in Vitro, 5, 119-125.
6) COOK J.A. and MITCHELL J.B. (1989). *Viability measurements in mammalian cell systems.* Anal Biochem, 179, 1-7.
7) FORTUNATI E. and BIANCHI V. (1991) *Spectrophotometric determination of total macromolecules for the evaluation of cellular density in cytotoxicity tests.* ATLA, 19, 119-125.
8) MARTIN A. and CLYNES M. (1993); *Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays.* Cytotechnology, 11, 49-58.
9) RIDDEL R.J., CLOTHIER R.H. and BALLS M. (1986) *An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays Fd. Chem.* Toxic, 6/7, 469-471.
10) KNOX P., UPHILL P.F., FRY JR, BENFORD J. and BALLS M. JR, (1986) *The FRAME multicentre project on in vitro cytotoxicology.* Fd Chem Toxic, 24, 457-463.

Libri e monografie consultate

1) CASTELL J.V., GOMEZ - LECHON M.G. (1992). *In vitro alternatives to animal pharmacotoxicology* Farmaindustria, Madrid.
2) FRESHNEY R.I., (1994) *Measurement of viability and cytotoxicity in "Culture of animal cells"* Third Edition, Wiley-Liss, New York, 287-307.
3) SNELL K. and MULLOK EDS, (1987) *Biochemical Toxicology.* A practical approach IRL Press, Oxford-Washington.
4) SKEHAN P. (1995) *Assays of cell growth and cytotoxicity in* "Cell growth and apoptosis", *Studzinski GP.ed.,* IRL Press, Oxford-Washington, 169-191.
5) ZUCCO F. e BIANCHI V., (1994). *Colture cellulari in tossicologia* Lombardo Editore in Roma.
6) WILSON A.P. (1986) *Cytotoxicity and viability assays in* "Animal cell culture - a practical approach" Freshney RI ed., IRL Press, Oxford - Washington, 183-216.

VERA BIANCHI

STANDARDIZZAZIONE E CONVALIDA DEI TEST IN VITRO

Dipartimento di Biologia - Facoltà di Scienze Biologiche
Università degli Studi - Padova

RIASSUNTO

I saggi di citotossicità *in vitro* hanno attualmente raggiunto un grado di riproducibilità e concordanza notevoli. Rimane comunque ancora da accertare la rilevanza degli effetti misurati *in vitro* rispetto alla tossicità che si manifesta *in vivo*. Il problema dell'estrapolazione del rischio *in vivo* dai risultati ottenuti *in vitro* rappresenta il problema centrale della tossicologia *in vitro*. Il dibattito sulle possibilità applicative dei test *in vitro* ha prodotto diverse proposte operative il cui controllo sperimentale è solo in parte compiuto.

Parole chiave: standardizzazione - convalida - test di citotossicità

SUMMARY

In vitro cytotoxicity tests have reached a high degree of reproducibility. However the relevance of results obtained *in vitro* to *in vivo* toxicity was still not been fully assessed. An important consideration is the extrapolation of the *in vivo* risk from *in vitro* data. Different operational schemes have been proposed to define the range of application of *in vitro* tests. The experimental validation of such schemes was only been partially completed.

Key words: standardisation - validation - cytotoxicity tests

INTRODUZIONE

I *test* in vitro di citotossicità offrono ampie possibilità di applicazione nel campo della valutazione e prevenzione del rischio legato all'esposizione umana a composti tossici. Gli scopi per cui tali *test* potrebbero venire impiegati si possono così riassumere: 1) classificazione delle sostanze in base alla loro tossicità mediante un processo di *screening* rapido ed economico, 2) riduzione/sostituzione degli animali sperimentali impiegati per la valutazione del rischio, 3) saggi su cellule o tessuti umani, 4) comprensione dei meccanismi di tossicità che operano *in vivo*. Tali scopi rivestono grande interesse dal punto di vista economico, normativo e scientifico e sono oggetto di intenso dibattito da più di un decennio. Un numero crescente di gruppi spontanei e di istituzioni internazionali si occupa di discutere le basi teoriche e le linee operative da seguire per la progressiva, auspicata sostituzione dei test *in vivo* con quelli *in vitro* (1, 3, 4, 7, 9). Congressi scientifici e convegni tecnico-normativi

si tengono di frequente per discutere i vari aspetti dello sviluppo e della convalida dei *test*. I risultati di tali convegni vengono regolarmente pubblicati: una delle riviste che più si dedicano alla diffusione di questi testi è ATLA, pubblicata dal FRAME (*Fund for the replacement of animals in medical experiments*) con il supporto di ECVAM (*European Centre for the validation of alternative methods*).

La comunità scientifica ha ideato e messo a punto un gran numero di *test in vitro*, spesso allo scopo di risolvere specifici quesiti nati dall'attività di ricerca. Tali *test* possono essere applicati anche in altri contesti, quali quelli citati più sopra. Resta però il problema, molto complesso, di stabilire quali di questi test siano effettivamente utili per scopi applicativi, e quale sia il loro valore e la loro attendibilità come metodi sostitutivi alla sperimentazione animale. Tra i numerosi aspetti dibattuti si possono citare:

1. *la rilevanza degli effetti misurati in vitro per la tossicità da predire in vivo.* Idealmente sarebbe opportuno disporre di sistemi che permettano di misurare *in vitro* esattamente l'effetto citotossico responsabile della tossicità *in vivo*. Ciò permetterebbe di predire con soddisfacente esattezza la pericolosità dei composti. In realtà questo è reso difficile dal fatto che le nostre conoscenze dei meccanismi che stanno alla base della tossicità *in vivo* sono incomplete o fortemente carenti.

2. *possibilità di individuare non soltanto i composti altamente citotossici, ma anche quelli innocui*, o almeno di definire con certezza le dosi prive di effetto. In realtà la classificazione del potere citotossico dei composti ha sempre un valore relativo, dato che è sempre possibile, alzando la dose, arrivare a produrre effetti tossici *in vitro*, anche se aspecifici. È quindi necessario disporre di stime sui probabili livelli di esposizione che si potrebbero raggiungere nella vita reale, e della "dose al bersaglio", cioè l'effettiva concentrazione che la sostanza tossica potrebbe raggiungere nell'organo o tessuto bersaglio della sua azione.

3. *messa a punto di modelli tossico-cinetici attendibili*, basati sulle caratteristiche fisiologiche della specie per cui si vuole predire il rischio, che forniscano le stime di esposizione suddette. Tali modelli sono oggi oggetto di studio intenso, grazie alla disponibilità di potenti *computer* che permettono di elaborare simulazioni complesse. I fattori che vengono presi in considerazione nella costruzione di tali modelli sono l'assorbimento della sostanza, la sua distribuzione, il metabolismo e l'escrezione (riassunti nell'acronimo ADME).

4. *estrapolazione dai dati ottenuti in sistemi sperimentali alla situazione in vivo.* Questo problema riguarda non soltanto l'estrapolazione dei dati *in vitro*, ma anche di quelli *in vivo* ricavati dalla sperimentazione animale. Ormai sono numerose le prove dell'inadeguatezza dei modelli animali per la corretta predizione del rischio umano. In questo contesto la disponibilità di cellule e tessuti umani rappresenta un importante vantaggio dei sistemi *in vitro*.

5. *la definizione del potere predittivo dei test in vitro necessita di dati in vivo di riferimento attendibili.* È quindi preferibile ricorrere a dati sull'uomo, quando essi sia disponibili. Questo concetto è stato applicato dagli ideatori e organizzatori del progetto multicentrico MEIC.

Nel corso degli anni il dibattito sulle possibilità applicative dei *test in vitro* ha portato alla definizione di una serie di schemi operativi che dovrebbero condurre alla convalida e all'accettazione anche a livello normativo di test *in vitro* alternativi a quegli sugli animali.

Inizialmente l'attenzione si è centrata sulle modalità per perfezionare singoli *test* e valutarne la rilevanza, attendibilità e il valore predittivo. Pionieristica a questo proposito è stata l'opera del FRAME (2). In tempi più recenti sono stati organizzati progetti multicentrici fondati su diversi principi ispiratori (1, 5, 7, 8, 9). In questi mesi si è conclusa la fase principale del progetto MEIC (1), ideato e organizzato dalla società scandinava di tossicologia cellulare.

Caratteristica distintiva di questo programma è la scelta di usare dati di tossicità umana come riferimento *in vivo*, e di saggiare quindi i composti per cui questi dati siano disponibili. È stata così fornita una lista di 50 composti che i partecipanti al progetto avrebbero saggiato nei *test* nei loro laboratori, secondo i loro protocolli abituali. Questo tipo di approccio alla convalida dei test *in vitro* è molto diverso e più flessibile di quelli proposti da altri gruppi, quali p.es. il FRAME. I risultati dell' elaborazione di una prima parte dei dati raccolti sono stati pubblicati di recente: si discuteranno quelli di maggior interesse per il futuro della tossicologia *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

1) AAVV (1996) *Evaluation of acute systemic toxicity*, ATLA, 24, Suppl.1, 249-311.
2) Balls M. and S. A. Horner (1985) *The FRAME interlaboratory programme on in vitro cytotoxicology*. Food Chem. Toxic., 23, 209-213.
3) Balls M. *et al.* (1995) *Practical aspects of the validation of toxicity test procedures.* ATLA, 23, 129-147.
4) Barrat M.D. *et al.* (1995) *The integrated use of alternative approaches for predicting toxic hazard.* ATLA, 23, 410-429.
5) Cingi M.R. *et al.* (1991) *Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach.* Toxic. in Vitro, 5, 119-125.
6) Curren R.D. *et al.* (1995) *The role of prevalidation in the development, validation and acceptance of alternative methods.* ATLA, 23, 211-217.
7) Louekari, K. (1996) *In vitro toxicology and the test guidelines.* ATLA, 24, 435-438.
8) Walum E. *et al.* Ecitts (1992) *An integrated approach to the application of in vitro test systems to the hazard assessment of chemicals.* ATLA, 20, 406-428.
9) Walum ET, *et al.* (1996) *Dynamic qualities of validation and the evolution of new in vitro toxicological tests.* ATLA, 24, 333-338.

ORAZIO SAPORA

I MECCANISMI DI DANNO E MORTE CELLULARE (1ª parte)

Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia - ROMA

RIASSUNTO

La morte cellulare é un normale processo fisiologico che interviene durante lo sviluppo e la rimozione di cellule danneggiate od alterate. Vi sono due differenti forme di morte cellulare, necrosi ed apoptosi. La prima é caratteristica di esposizioni acute ad agenti tossici mentre la seconda é caratterizzata dall'attivazione di processi enzimatici attivi che implica la esistenza di uno stretto controllo genetico. La gran parte degli agenti tossici, sia fisici che chimici, che inducono apoptosi sono anche noti agenti ossidativi. L'ossigeno come accettore terminale dell'elettrone nei processi di fosforilazione ossidativa é essenziale alla vita tuttavia, a causa della sua alta reattività, può interagire con tutte le macromolecole biologiche, direttamente o provocando reazioni a catena. Questo é il caso della perossidazione lipidica, coinvolta in molte patologie. Ciò é dovuto al fatto che gli acidi grassi insaturi sono molto abbondanti e che il processo é altamente distruttivo. Anche le proteine possono essere danneggiate dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sebbene in questo caso non si possa parlare di reazioni a catena ma di effetto diretto sulle molecole degli aminoacidi. Il DNA, infine, viene considerato come il *target* più importante di radicali altamente reattivi i quali possono produrre danni alle basi, allo zucchero, singole e doppie rotture della catena, e legami crociati. Le cellule hanno sviluppato, nel tempo, differenti e complessi sistemi di difesa verso le ROS. Tali sistemi possono reagire direttamente con le specie o, tramite sistemi enzimatici, possono fermare la catena di reazioni o controllare le concentrazioni di metalli che possono favorirne la formazione. Inoltre se una molecola biologicamente importante viene danneggiata può essere rimossa o riparata. Il ruolo critico della riparazione della molecola del DNA é chiaramente indicata dalla presenza di sindromi umane che difettano di uno o più passi della riparazione di questa importante molecola. L'ultima difesa per l'organismo per evitare l'espansione clonale di una cellula alterata é l'induzione dei meccanismi di morte programmata.

Parole chiave: morte cellulare - necrosi - apoptosi

THE MECHANISMS OF CELL DAMAGE AND DEATH

SUMMARY

Cell death occurs naturally during development and may be responsible for the removal of cells that are damaged, abnormal or functionally and spatially inappropriate. Programmed cell death, distinct from necrosis, implies the existence of a

predetermined genetic switch. High doses of chemical and physical toxic agents may cause necrosis suggesting that the severity of insult determines the form of cell death. Much chemical and physical treatment capable of inducing cell death are also known to cause oxidative stress. Molecular oxygen is essential for many metabolic processes associated with the aerobic life as terminal electron acceptor for the oxidative phosphorylation. However its high reactivity creates a variety of oxygen reactive species (ROS) capable of reacting with cellular macromolecules. This either damages them directly or sets a chain reaction where the free radical passes from one molecule to another, causing in extensive damage to cellular structures such as membranes. Lipid peroxidation has been implicated in many tissue injuries due to the fact that PUFA are so common and the process is very destructive. Damage to proteins is very different to lipid peroxidation because protein oxidation is much less likely to have any chain reaction features. Furthermore DNA has been considered to be an important target for ORS attack since it is clearly very important for cell function and has been clearly shown to be susceptible to damage. Both bases and sugar are also potential targets for ORS which create a large number of different products. Cells have developed several levels of antioxidant defence which either scavenge and detoxify reactive species, block free-radical chain reactions or sequester transition metals. Moreover damaged molecules can be removed or repaired. The critical role of DNA repair in preventing mutagenic and cancerogenic events is revealed by several syndromes in which specific repair pathways are blocked. The last defence of mutated cells to prevent clonal expansion is to programmed cell death. One possible hypothesis is that it is not the ROS mediated damage per se which results in the programmed cell death, rather there is an oxidative shift in the cellular redox state which modifies the nature of the stimulatory signals and results in cell death as opposed to proliferation.

Key words: cell death - necrosis - apoptosis

INTRODUZIONE

Le strutture cellulari sono costituite da molecole altamente instabili sottoposte all'azione continua di stimoli interni ed esterni. Molti di questi sono direttamente od indirettamente la conseguenza dei cambiamenti prodotti nelle macromolecole biologiche da agenti fisici e chimici. A questi segnali la cellula risponde adattando temporaneamente o permanentemente il proprio stato metabolico e/o morfologico ed attivando sistemi di difesa in grado di rimuovere il danno, potenzialmente avverso all'integrità e alla funzionalità cellulare, e ristabilire il normale equilibrio. Nel caso in cui i sistemi di difesa dovessero fallire, come ultima possibilità la cellula può autodistruggersi attraverso differenti meccanismi di morte cellulare (fig.1) (7 - 36).

La morte cellulare in generale può avvenire secondo due differenti modalità comunemente chiamate necrosi e apoptosi (14). Il primo tipo di morte avviene in seguito a severi danni cellulari ed é caratterizzata da degradazione generale delle strutture e delle funzioni a cui fa seguito la lisi della cellula o di gruppi di cellule e processi infiammatori a carico dei tessuti circostanti. Questo tipo di morte é caratteristico di eventi patologici gravi, come conseguenza di esposizioni acute a composti tossici ed in caso di severa anossia.

L'apoptosi, al contrario, é un fenomeno di morte cellulare che coinvolge una serie di eventi che richiedono l'attiva partecipazione della cellula. Non vi é lisi cellulare, non si riscontrano processi infiammatori ed i corpi apoptici, che si formano, vengono fagocitati dai macrofagi e il loro contenuto riciclato. Questa via mette a disposizione dell'organismo un efficiente e sicuro sistema per rimuovere sia singole cellule dal *turn over* tissutale, che specifiche cellule durante lo sviluppo embrionale e può essere considerata come la controparte della divisione cellulare per mezzo della mitosi.

I processi di morte cellulare controllata durante lo sviluppo embrionale sono noti da oltre cento anni, e sono stati descritti come *gene-directed cell death*. L'apoptosi è un evento fisiologico che avviene in molti tessuti di organismi adulti a rapida proliferazione come la mucosa della prostata e la mucosa dell'intestino tenue nell'uomo. Inoltre la morte cellulare programmata é un valido sistema di controllo della "normalità" delle singole cellule. La soppressione momentanea di questo controllo o la sua totale eliminazione può portare alla sopravvivenza e all'accumulo patologico di cellule aberranti. Infatti in molti casi l'espansione clonale di cellule cancerogene e il conseguente accrescimento tumorale può essere dovuto all'inibizione o al cattivo funzionamento dei processi di apoptosi, provocato o dall'espressione di nuovi geni o dall'interruzione della catena di segnali cellulari che attivano il processo stesso.

I meccanismi coinvolti differiscono nei vari tipi cellulari per cui il tracciare un singolo schema non può descrivere adeguatamente il fenomeno nella sua complessità. Tuttavia il processo, prendendo come esempio il sistema cellulare modello dei timociti (10 - 51), può essere diviso nelle seguenti fasi: (I) attivazione dei recettori, (II) sintesi di proteine specifiche, (III) aumento di Ca^{++} citosolico, (IV) attivazione di una endonucleasi Ca^{++}/Mg^{++} dipendente, (V) condensazione della cromatina, (VI) frammentazione discreta del DNA e (VII) formazione di corpi apoptotici. La fenomenologia dell'apoptosi può variare da cellula a cellula a seconda del suo stato metabolico e del bagaglio genetico espresso. Infine i segnali che portano all'attivazione dell'apoptosi sono integrati con altri segnali che permettono alla cellula e all'organismo di adattarsi a differenti condizioni fisiologiche e a *stress* biologici. È necessario sottolineare che un evento tossico, prima di essere segnale di induzione di processi di morte cellulare, può essere un segnale per l'induzione di altre risposte come l'adattamento, la riparazione e l'induzione o l'arresto della proliferazione.

SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS).

È sorprendente notare come la vita si basi su specie chimiche altamente instabili e reattive, che se da una parte facilitano reazioni chimiche fondamentali per la vita, dall'altra sono portatrici di un'alta instabilità molecolare. Un esempio di tale paradosso è l'ossigeno (11), accettore terminale di elettroni nei processi respiratori. Nelle cellule specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono prodotte in continuazione non solo durante i processi respiratori, ma anche nei processi infiammatori, nella fagocitosi, da enzimi come le cicloossigenasi, la citocromoossidasi P450, la xantinoossidasi e la NADPHossidasi, che intervengono nel metabolismo ossidativo, e da un numero imprecisato di agenti sia fisici che chimici (17).

Date le caratteristiche chimico-fisiche, l'ossigeno molecolare può partecipare alla reazione di trasferimento di un solo elettrone per volta rendendo possibili solo tre tipi di reazioni: la formazione di radicali perossidi, la formazione del radicale superossido e specie relative e la formazione di ossigeno singoletto (20 - 38).

La prima reazione é legata alla forte affinità dell'ossigeno per i radicali liberi che si possono formare su una macromolecola biologica provocandone la perossidazione (sensibilizzazione da radicali liberi, di tipo I).

$O_2 + M\cdot \rightarrow MOO\cdot$

La reazione avviene in prevalenza sul carbonio delle macromolecole biologiche e generalmente vicino ad un doppio legame.

La formazione di superossido si ha quando l'O_2, che possiede una alta elettroaffinità, reagisce con un elettrone prodotto dalla ionizzazione di una macromolecola biologica (sensibilizzazione di tipo elettro affine, di tipo II).

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$

Lo ione superossido per dismutazione spontanea o per reazione enzimatica catalizzata dalla superossido dismutasi (SOD) produce H_2O_2, che a sua volta può essere trasformata, dalla catalasi in acqua, o produrre, in presenza di Fe^{++}, il radicale ossidrilico *OH*· ritenuto il maggiore responsabile degli avversi effetti biologici.

Infine la terza reazione è quella che porta alla formazione di ossigeno singoletto. La produzione di questa specie è stata messa in evidenza nei processi di fagocitosi, di fotosensibilizzazione, nelle reazioni catalizzate dalla perossidasi, nella ricombinazione di radicali perossidi e in alcune condizioni patologiche.

Contro queste specie reattive la cellula ha sviluppato tutta una serie di sistemi di difesa che vanno sotto il nome di sistemi antiossidanti. Questi sono organizzati su livelli temporali differenti e si basano su diversi meccanismi (9 - 19 - 33 - 61).

a) Compartimentalizzazione delle molecole sensibili: molecole critiche come il DNA sono isolate da quelle strutture, come i mitocondri, in cui vi é una alta produzione di ROS.

b) Controllo della concentrazione di metalli di transizione liberi. La presenza di metalli come il ferro possono facilitare le reazioni che portano alla formazione di specie reattive come l'*OH*·. Per evitare questo fenomeno avverso, senza diminuire drasticamente il livello di tali cationi necessari al metabolismo cellulare, la cellula ha sviluppato sistemi di compartimentalizzazione e di immagazzinamento.

c) *Scavenger* di radicali e antiossidanti *chain-breaking*. I primi sono sostanze, come il glutatione, che possono competere con l'ossigeno verso i radicali che si formano sulle macromolecole biologiche. Il secondo tipo di antiossidanti sono sostanze che funzionano interrompendo reazioni a catena come quelle che producono la perossidazione lipidica.

d) Rimozione di ROS per mezzo di enzimi antiossidanti. La cellula ha sviluppato tutta una serie di enzimi antiossidanti come le SOD, la catalasi e la GSH ossidasi, in grado di eliminare le specie reattive dell'ossigeno.

e) Inibizione di processi sensibili. Una volta che il danno é stato prodotto é necessario poterlo rimuovere evitando di interferire con altri processi cellulari. Allo scopo la cellula possiede sistemi attivabili che possono momentaneamente bloccare questi processi per permettere una accurata riparazione.

f) Riparazione e controllo della fedeltà. Il danno sulle strutture biologiche é anche un segnale per l'attivazione di vie metaboliche costitutive o inducibili in grado di correggere il danno.

g) Morte cellulare (apoptosi). È l'ultima risorsa dell'organismo per evitare che cellule mutate o trasformate si dividano e si propaghino.

DNA COME TARGET DELLE ROS

Le ROS sono potenzialmente dannose per la cellula poiché possono interagire e modificare un ampio spettro di biomolecole, come nel caso della perossidazione lipidica, della modifica ossidativa delle proteine e delle alterazioni alla sequenza e alla struttura della molecola del DNA. Varie condizioni patologiche sono associate alla produzione di ROS inclusi induzione di tumori, invecchiamento, artriti reumatoidi, alcune malattie polmonari e danni dovuti ad eventi ischemici.

Non tutte le macromolecole rivestono la stessa importanza come *target* delle specie reattive dell'ossigeno. Una proteina di cui la cellula possiede un certo numero di copie funzionanti può essere facilmente sostituita, mentre il DNA, una molecola "unica" depositaria dell'intero codice genetico della cellula, é generalmente considerato il bersaglio più importante di agenti sia fisici che chimici.

a) *Danni al DNA*

Si può definire come danno qualsiasi alterazione che modifichi la sequenza, la struttura e le funzioni del DNA. Tutte le molecole che compongono il DNA possono essere danneggiate (32 - 35).

Le ROS possono interagire con il DNA causando un ampio spettro di lesioni come danni alle basi, singole rotture, doppie rotture, legami crociati e danni al desossiribosio. La gran parte dei danni è prodotta dall'ossidrile $OH\cdot$. Uno dei danni più importante è la 8-ossi-deossiguanina (8-oxoG) una lesione premutagena probabilmente coinvolta sia nella generazione spontanea che indotta di tumori. Altri danni alle basi importanti sono la 8-ossi-adenosina, il glicol di timina, la diidrotimina, la 5-idrossicitosina e i siti abasici.

Per lungo tempo si é pensato che agenti tossici, e tra questi le ROS, producessero una distribuzione casuale del danno sulla molecola del DNA. Recentemente é stato dimostrato che: (I) geni in trascrizione sono più suscettibili ai diversi tipi di danno di geni non in trascrizione, (II) il DNA contenuto in cromatina in fase di replicazione é più danneggiabile del DNA presente in cromatina quiescente, (III) i *cross-links* tra DNA e proteine sono più frequenti nelle zone di contatto tra matrice nucleare e cromatina. Questi risultati indicano che il danno iniziale non é ugualmente distribuito lungo la catena del DNA, ma vi sono zone più suscettibili e che tali zone sono strettamente correlate ad una struttura della cromatina meno compatta (2 - 12).

b) *Riparazione del danno al DNA (22).*

Per riparazione si intendono tutti quei processi metabolici in grado di restituire la corretta struttura e la corretta funzione del DNA cellulare (49). Queste vie metaboliche, coordinate con i processi di replicazione e di duplicazione, sono parte integrante del metabolismo generale di questa molecola (8 - 27).

Il ruolo critico della riparazione del DNA nella rimozione dei danni è chiaramente indicato dalla presenza di sindromi umane in cui non sono attive specifiche vie di riparazione. In questi casi si ha una ipersensibilità ad agenti ossidanti come UVA,

UVB e radiazioni ionizzanti con una più alta incidenza di eventi mutageni e di insorgenza di tumori (1 - 53).

Si è calcolato che una singola cellula viene sottoposta ogni giorno a circa 1000 eventi ossidativi e a 500-800 eventi di deaminazione e di demetilazione, essenzialmente dovuti al metabolismo ossidativo della cellula ed alla azione di agenti chimici e fisici presenti nell'ambiente. Malgrado questo elevato numero di eventi la stabilità genetica è molto alta. Ciò è dovuto al fatto che la cellula ha sviluppato differenti sistemi enzimatici in grado di controllare, di rilevare e di riparare efficientemente vari tipi di alterazioni molecolari.

In generale vi sono due gruppi di sistemi enzimatici della riparazione: (i) sistemi enzimatici costitutivi che agiscono anche in condizioni di non accrescimento e sono in genere esenti da errori; (ii)) sistemi enzimatici inducibili che agiscono solo in condizioni di accrescimento, necessitano di nuova sintesi e possono commettere errori.

Negli eucarioti il substrato su cui gli enzimi della riparazione agiscono è costituito da una struttura altamente organizzata, compatta e non continua (3 - 4 - 6 - 24). Questo fatto può influenzare non solo la distribuzione del danno, ma anche la sua riparazione favorendo o impedendo l'accesso al sito danneggiato degli enzimi coinvolti. In generale sono riparati più rapidamente i danni localizzati in regioni aperte del genoma. Infatti geni in trascrizione sono riparati più rapidamente di geni non in trascrizione o silenti. Inoltre processi come l'acetilazione, la fosforilazione e la ribosilazione, hanno un ruolo importante, potendo modulare l'affinità delle proteine istoniche e non istoniche per la molecola del DNA, regolandone la disponibilità e l'attività degli enzimi legati alla riparazione cellulare (15 - 40 - 56).

Altri fattori proteici non enzimatici possono modificare e/o controllare la riparazione delle lesioni indotte (54 - 58). L'evidenza sperimentale dell'esistenza di tali fattori deriva dallo studio di sindromi umane con difetti della riparazione. In pazienti affetti da Xeroderma Pigmentosum gruppo C, la riparazione avviene solo sul DNA localizzato in geni in trascrizione, mentre il danno presente nella parte di genoma non trascritto non viene riparato (59). Al contrario in pazienti affetti da Sindrome di Cockayne si ha la riparazione solo del danno localizzato in domini di cromatina inattiva (60). Questi risultati indicano l'esistenza di fattori specifici per le differenti conformazioni della cromatina che permettono l'accesso degli enzimi della riparazione al sito danneggiato.

Infine é necessario per la cellula non solo eseguire la corretta riparazione della sequenza del DNA e della struttura cromatinica, ma anche riapporre nella giusta posizione la distribuzione delle metilazioni lungo la catena del DNA che svolge importanti ruoli funzionali.

Esistono differenti sistemi di riparazione di cui si é potuto identificare il susseguirsi delle reazioni, gli enzimi coinvolti ed i fattori necessari. Per una trattazione dettagliata delle varie vie metaboliche si rimanda il lettore ad articoli specializzati (22 - 26 - 49). Qui si riporta come esempio la riparazione chiamata N.E.R. (*Nucleotide Excision Repair*) (fig. 3) (48). È questo uno dei sistemi di riparazione più studiato e molte delle informazioni, che hanno portato ad individuarne i passi essenziali, sono state ottenute dallo studio di sindromi umane di origine genetica, come lo Xeroderma Pigmentosum (XP), la sindrome di Cockayne (CS) e la PIBIDS, una forma di tricotiodistrofia, che presentano difetti nei sistemi riparativi.

Il sistema di riparazione NER consiste in cinque passi: (I) riconoscimento del danno, (II) incisione della catena danneggiata ai due lati del danno, (III) rimozione del polinucleotide contenente il danno, (IV) sintesi di nuovo DNA e (V) chiusura dell'ultimo legame tra zucchero e fosfato.

Il numero di geni che controllano il sistema NER negli eucarioti è alto. Venti differenti geni sono già stati identificati alcuni dei quali in comune con altri sistemi di riparazione.

Il riconoscimento iniziale del danno è effettuato nei geni trascritti, dal complesso della RNA polimerasi, mentre nel resto del genoma il riconoscimento è effettuato da un sistema di scansione costituito da un complesso enzimatico che comprende anche gli enzimi della riparazione. La ricerca di alterazioni strutturali da parte dell'RNA polimerasi è più rapida e può avvenire direttamente durante il processo di trascrizione. Inoltre i complessi enzimatici della riparazione sono localizzati sulla matrice, associati o in prossimità, dei complessi enzimatici dedicati alla trascrizione.

Il fatto che, nelle sindromi citate, il difetto possa essere corretto introducendo nella cellula una endonucleasi esogena, suggerisce che i difetti genetici siano localizzati nei passi della riparazione compresi tra il riconoscimento del danno e l'incisione dello stesso.

DANNI AD ALTRE STRUTTURE CELLULARI

Le ROS sono specie ossidative a bassa specificità di azione per cui, anche se il DNA é probabilmente il target più importante, altre macromolecole come le proteine e i lipidi possono essere danneggiate.

a) *Danno ossidativo su molecole proteiche*

Non tutti gli aminoacidi hanno un alta sensibilità verso le specie reattive dell'ossigeno. I più sensibili sono gli aminoacidi contenenti anelli insaturi e gruppi SH. Questi ultimi possono funzionare anche da protettori essendo in grado di reagire con le specie reattive dell'ossigeno con meccanismi di tipo *scavenger*. Le proteine danneggiate sono riconosciute dalle proteasi e completamente degradate ad aminoacidi. Poiché una proteina modificata può contenere al massimo due o tre aminoacidi ossidati, la maggior parte degli aminoacidi potrà essere riutilizzata per la sintesi ex novo di nuove proteine. In alcune condizioni patologiche e durante l'invecchiamento, quando le difese naturali diminuiscono al di sotto di un livello critico di attività, la capacità proteolitica della cellula può non essere sufficiente a far fronte all'attività necessaria in caso di forti stress ossidativi. In questi casi le proteine ossidate non vanno incontro ad una appropriata digestione proteolitica, ma possono formare aggregati poco solubili dannosi per la vita ed il funzionamento della cellula (5 - 16 - 31).

b) *Danno ossidativo sulle membrane cellulari*

Più importanti e più studiati sono gli effetti delle ROS su substrati e strutture cellulari contenenti acidi grassi. Probabilmente insieme al DNA le membrane cellulari costituiscono uno dei target preferenziali delle ROS. I lipidi sono molecole con una parte idrofila ed una idrofoba costituita da acidi grassi saturi ed insaturi (PU-

FA). Questi ultimi a causa dei doppi legami presenti lungo la catena acilica, da uno a sei, sono altamente instabili e sensibili alla perossidazione.

La perossidazione lipidica (45) è il processo biologico di tipo ossidativo più studiato, ciò é dovuto all'importanza di questo tipo di reazioni nei processi di decomposizione dei grassi alimentari.

In generale lo schema delle reazioni è il seguente: l'ossigeno in varie condizioni é in grado di reagire con l'acido grasso a livello del doppio legame dando origine ad un perossido il quale non è stabile e si trasforma in idroperossido, stabile, sottraendo un idrogeno ad un acido grasso insaturo vicino. Il radicale che si forma su quest'ultimo reagisce, a sua volta, con l'ossigeno iniziando così una catena di reazioni che porta all'accumulo di più idroperossidi a livello locale. Gli idroperossidi formatisi sono idrofili e come conseguenza producono una deformazione locale del doppio strato altamente idrofobo con penetrazione di molecole d'acqua e cambiamento microlocale delle proprietà chimico-fisiche della membrana (42). In un lipide vi sono due posizioni sensibili all'attacco delle ROS, a livello del gruppo carbossilico e del/dei doppi legami lungo la catena acilica. Inoltre i PUFA con un maggior numero di legami insaturi sono più instabili e più suscettibili al danno. Importante é la posizione del doppio legame lungo la catena acilica, più é vicino alla testa polare e meno deformazione produrrà nel doppio strato lipidico. Un altro fattore importante che può influenzare la produzione di danno é la presenza di colesterolo, che agisce come *chain breaking* agent, e di protettori come la vitamina E, che agiscono con meccanismi di scavenger delle ROS o dei radicali che si formano, interrompendo la catena di reazioni di perossidazione (21 - 42 - 46).

La perossidazione lipidica riveste una particolare importanza per l'integrità cellulare perché (25):

1) é una reazione auto catalitica a catena che si può innescare facilmente;

2) interessa gli acidi grassi insaturi (PUFA) che sono estremamente abbondanti nelle membrane cellulari;

3) il processo é distruttivo poiché il danno non è riparabile;

4) é un processo che si propaga rapidamente danneggiando, partendo da un evento iniziale, gli acidi grassi presenti nel microintorno.

L'accumulo di danni ossidativi nelle membrane cellulari ha il suo effetto in numerose forme patologiche come l'arteriosclerosi, il morbo di Altzeimer, l'anemia emolitica e nei processi di invecchiamento.

Il processo produce due effetti: il primo diretto sulla membrana ed il secondo indiretto mediato dal rilascio nel citosol di molecole potenzialmente tossiche (52). L'effetto diretto prodotto dalla formazione di idroperossidi porta come conseguenza cambiamenti delle proprietà chimico-fisiche della membrana con una diminuzione della fluidità, del potenziale elettrico e della mobilità delle proteine di membrana. Queste alterazioni della struttura del doppio strato lipidico provocano inoltre l'inattivazione di enzimi e di recettori e la perdita della compartimentalizzazione cellulare essenziale al metabolismo e al mantenimento della integrità cellulare. L'effetto indiretto può essere meno immediato ma non meno dannoso ed é dovuto essenzialmente al rilascio nel citosol di aldeidi. La più comune é il 4-idrossinonenale (HNE) che è in grado di: (i) reagire con i tioli, (ii) inibire un ampio spettro di processi enzimatici inclusa la sintesi di DNA, RNA proteine, e la respirazione mitocondriale, e (iii) alterare la pompa Ca^{++} del reticolo endoplasmatico.

L'effetto letale generalizzato della perossidazione lipidica probabilmente é dovuto in parte all'attivazione di segnali specifici ed in parte alla perdita di omeostasi. Per esempio un aumento del calcio nel citosol può attivare proteasi, fosfolipasi ed endonucleasi causando frammentazione di DNA, segnali sbagliati e distorsione del citoscheletro (18).

c) *Prodotti di perossidazione come segnali*

È peculiare che le cellule sia animali che vegetali si circondino e delimitino il loro ambiente interno con membrane costituite da un'alta percentuale di acidi grassi polinsaturi estremamente sensibili alla presenza dell'ossigeno ed ad altri agenti ambientali. Una possibile spiegazione può essere che l'ossidazione di PUFA possa servire di segnale per rilevare lo stato redox dell'ambiente circostante la cellula (34 - 55).

In generale segnali possono partire dalla membrana sotto forma di prodotti di ossidazione (fig. 4). La liberazione diretta di acidi grassi ossidati o dovuta all'azione di fosfolipasi, genera segnali in grado di aumentare il livello del calcio citoplasmatico e modulare l'espressione genica. È questo il caso dell'effetto citotossico mediato dal *Tumor Necrosis Factor* a. Il TNFa si lega al recettore stimolando la produzione di ROS, l'attivazione di fosfolipasi A2, l'ossidazione e la liberazione di acido arachidonico che a sua volta stimola la sintesi di prostaglandine e l'aumento di calcio intracellulare. Questo ultimo é uno dei segnali caratteristici dell'apoptosi. L'acido arachidonico, con 4 insaturazioni, e l'acido linoleico, con due insaturazioni, sono i PUFA più abbondanti nelle membrane di cellule di mammifero (13 - 23 - 28 - 29 - 37 - 44 - 57).

Vi sono altre evidenze che la perossidazione lipidica sia coinvolta nei segnali di membrana che portano all'apoptosi. Il 15-HPETE, un prodotto del catabolismo ossidativo dei lipidi, quando é presente, causa un aumento di calcio intracellulare, cambiamenti morfologici e frammentazione del DNA. La presenza di un chelante del calcio annulla l'effetto mentre non esercita alcuna protezione una sopraespressione di Bcl-2.

Il gene Bcl-2 controlla un sistema antiossidante presente nelle membrane cellulari (30). Il fatto che l'azione del 15-HPETE non venga inibita dalla espressione di Bcl-2 indica che é il prodotto dell'ossidazione che agisce direttamente da segnale e che l'azione del Bcl-2 si esercita prevenendo la formazione del prodotto di ossidazione e non l'effetto di quello già presente.

Un simile risultato é stato ottenuto con il 3-HODE il prodotto di ossidazione dell'acido linoleico. Il 3-HODE si può formare per azione enzimatica della fosfolipasi D. È stato inoltre dimostrato che l'attività delle fosfolipasi aumenta fortemente in presenza di prodotti di ossidazione dei PUFA come il 3-HODE (39).

Un altro fosfolipide coinvolto nei segnali cellulari che controllano la proliferazione e la morte cellulare programmata, é la sfingomielina (40). Da questo fosfolipide si possono formare, come prodotti di ossidazione o per via enzimatica, due molecole, la ceramide e la sfingosina 1-fosfato, che agiscono come messaggeri cellulari. Questi segnali sembrano essere segnali complementari di controllo per la morte o la proliferazione e il differenziamento.

I segnali mediati dalla perossidazione lipidica sono sotto controllo enzimatico e differenti forme di fosfolipasi, localizzate sulla membrana cellulare, sono in grado di rilasciare prodotti come il 15-HPETE, il 3-HODA o l'acido arachidonico.

L'evento iniziale che libera i segnali può avere due differenti origini che non si escludono a vicenda. Le alterazioni della struttura della membrana cellulare, prodotte dalle ROS, provocano l'attivazione delle fosfolipasi (A2, D, C) che liberano le molecole segnale, oppure le specie reattive dell'ossigeno attaccano i legami tra le molecole liberando direttamente molecole segnale come acido arachidonico, 3-HODE e 15-HPETE. È dimostrato infatti che tipici agenti ossidanti, come le radiazioni ionizzanti, UVA ed UVB, sono in grado di produrre il rilascio dello stesso tipo di molecole, e quindi produrre lo stesso segnale e le stesse conseguenze.

CONCLUSIONI

Vi sono chiare evidenze sperimentali che indicano lo stress ossidativo come mediatore fisiologico per la morte cellulare programmata.

I limiti e l'estensione del fenomeno, i segnali e le vie metaboliche coinvolte non sono tuttavia completamente chiarite.

La cellula, in risposta ad un tipo di vita fortemente instabile, ha sviluppato tutta una serie di difese atte a prevenire, annullare e minimizzare gli effetti deleteri delle specie reattive dell'ossigeno, allo scopo di preservare la propria integrità funzionale e genetica.

Tra questi meccanismi di difesa sono da annoverare: (i) la compartimentalizzazione delle molecole particolarmente sensibili all'attacco delle ROS, (ii) sistemi antiossidanti come molecole in grado di agire da *scavenger* o da *chain breaking*, (iii) il controllo della concentrazione intracellulare di metalli come il ferro, (iv) l'inibizione di processi cellulari che possano interferire con i processi riparativi, (v) sistemi attivi di controllo della corretta struttura e della riparazione.

Nel caso che questi differenti livelli di protezione falliscano il loro scopo, per impedire l'espansione clonale di una cellula alterata, vi é l'induzione dei processi attivi di morte programmata.

I segnali che inducono questo fenomeno possono essere quanto mai vari e complessi e la loro espressione varia da cellula a cellula. Possono essere dovuti ad un accumulo di prodotti intermedi, ad una perdita di regolazione di processi attivi, ad una diminuzione di ATP o di NADPH, a prodotti di ossidazione, ad errori nella duplicazione del DNA, o ad una perdita di omeostasi del Ca^{++}. Tutti questi segnali sebbene sequenzialmente e fenomenologicamente differenti portano allo stesso risultato finale, cioè alla attivazione di processi attivi di morte cellulare.

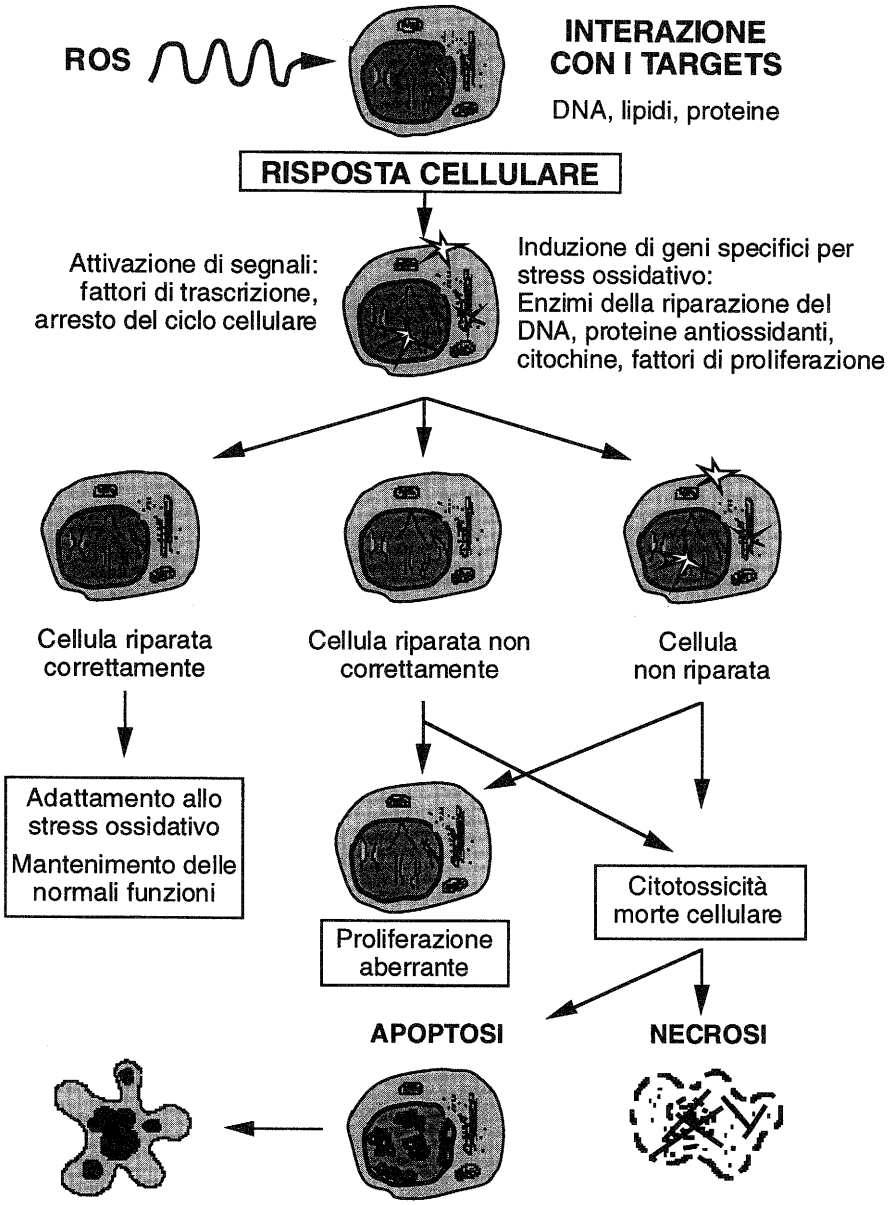

Fig. 1: Schema generale della progressione degli eventi prodotti dall'interazione di specie reattive dell'ossigeno con le macromolecole biologiche. Il danno iniziale può essere riparato in maniera corretta o non corretta. Nel primo caso si ripristina la giusta sequenza della macromolecola colpita mentre nel secondo l'alterazione stessa direttamente o indirettamente può agire da segnale di induzione di morte cellulare. Questo sistema permette all'organismo di eliminare cellule aberranti prima che possano espandersi.

STRUTTURA ELETTRONICA DELL'OSSIGENO MOLECOLARE E DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS).

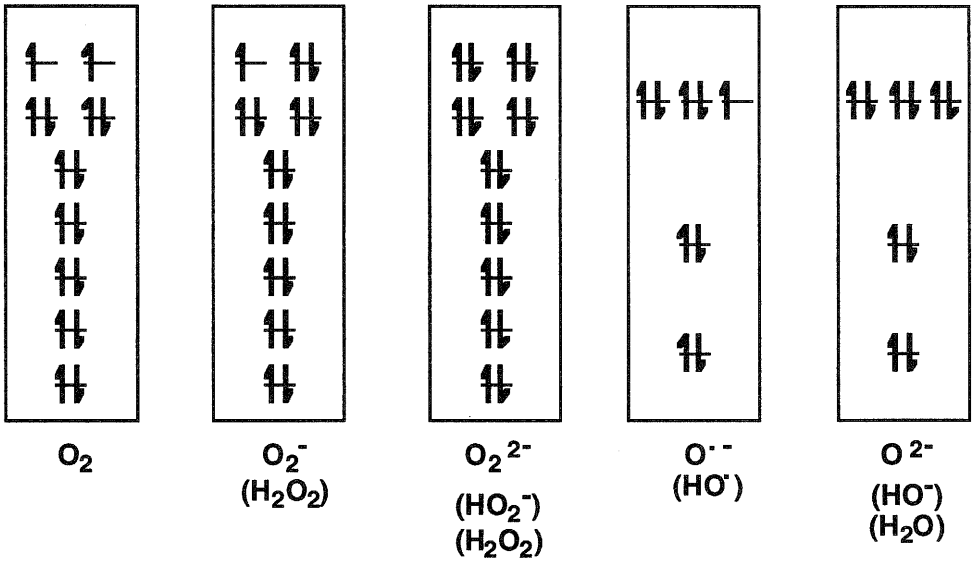

Fig. 2: Rappresentazione schematica degli orbitali elettronici dell'ossigeno molecolare e dell'ossigeno atomico. Gli spin elettronici sono indicati dalle frecce e le corrispondenti forme protonate sono rappresentate in parentesi. L'ossigeno molecolare possiede una caratteristica unica nel mondo della chimica. Infatti, sebbene esso contenga un numero pari di elettroni, ha due elettroni spaiati nei suoi orbitali. Questi due elettroni hanno lo stesso numero quantico di spin per cui se l'O_2 ossida un altro atomo o molecola accettando da essa un paio di elettroni, questi devono avere ambedue uno *spin* parallelo per poter riempire gli orbitali vuoti. In generale un paio di elettroni in un'orbita atomica o molecolare hanno *spin* antiparallelo.

Questo impone una importante restrizione nei processi ossidativi. L'ossigeno molecolare può infatti partecipare alla reazione di trasferimento di un solo elettrone per volta, rendendo così possibile solo tre tipi di reazione: la formazione del radicale superossido e specie relative, la formazione di radicali perossidi, e la formazione di ossigeno singoletto. Questo ultimo si ha quando i due elettroni spaiati cambiano da numero quantico di *spin* parallelo a numero quantico di *spin* antiparallelo (47).

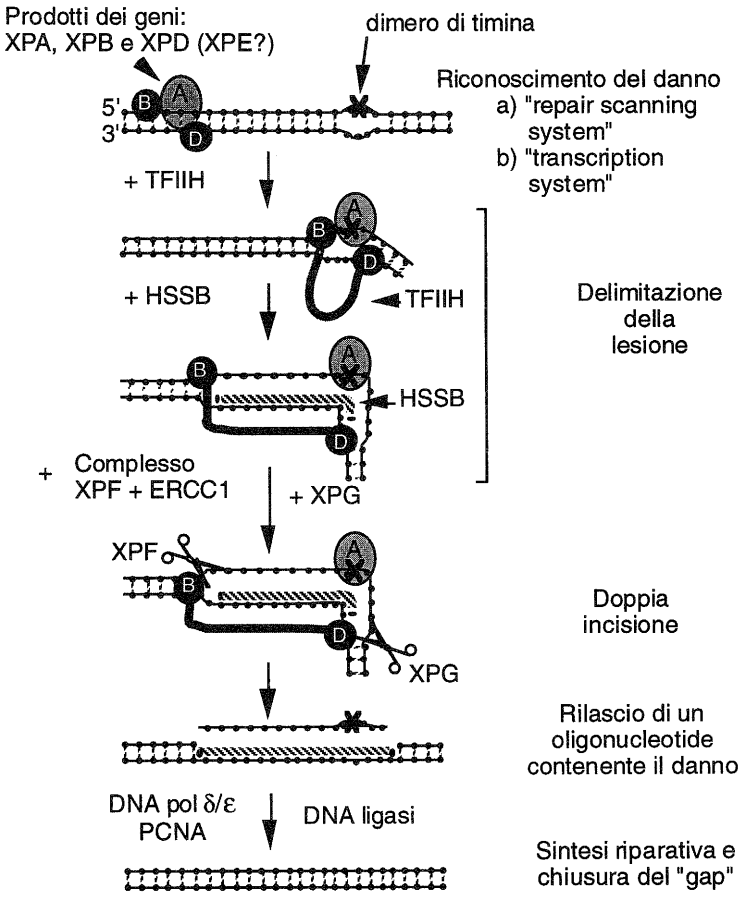

Fig. 3: Schema della riparazione NER (48). I prodotti del gene XPA, che è modulato dal calcio intracellulare, e del gene XPE sono coinvolti nel riconoscimento del danno. Vi sono indicazioni che a questo passo contribuisce inoltre o il fattore di trascrizione TFIIH e/o i prodotti dei geni XPB e XPD. Questi ultimi sono subunità del fattore TFIIH e possiedono proprietà elicasica bidirezionale. Il fattore TFIIH é un importante fattore trascrizionale formato da più subunità e coinvolto nell'iniziazione della trascrizione del DNA da parte della RNA polimerasi II. Nella trascrizione, l'attività elicasica di ERCC3 (XPB) è richiesta per permettere l'accesso e l'attacco della polimerasi sul DNA subito dopo il promotore. Il DNA denaturato dall'azione combinata delle due elicasi costituisce un substrato ideale per l'azione nucleasica dei prodotti dei geni XPF ed XPG. La proteina XPG introduce un taglio in maniera specifica sulla catena con il termine 5' alla distanza di tre nucleotidi dal danno, mentre il complesso ERCC1-XPF incide in direzione opposta alla distanza di 21-23 basi dalla lesione. Il risultante polinucleotide viene rimosso con l'aiuto della proteina HSSB una *melting protein* anch'essa coinvolta nei processi di trascrizione. La sintesi riparativa viene eseguita dalla polimerasi δ o ε poiché la reazione é dipendente dalla presenza di PCNA (*proliferating cell nuclear factor*). La polimerasi δ è coinvolta nella sintesi semi conservativa. La chiusura dell'ultimo *gap* é catalizzata da un enzima chiamato ligasi.

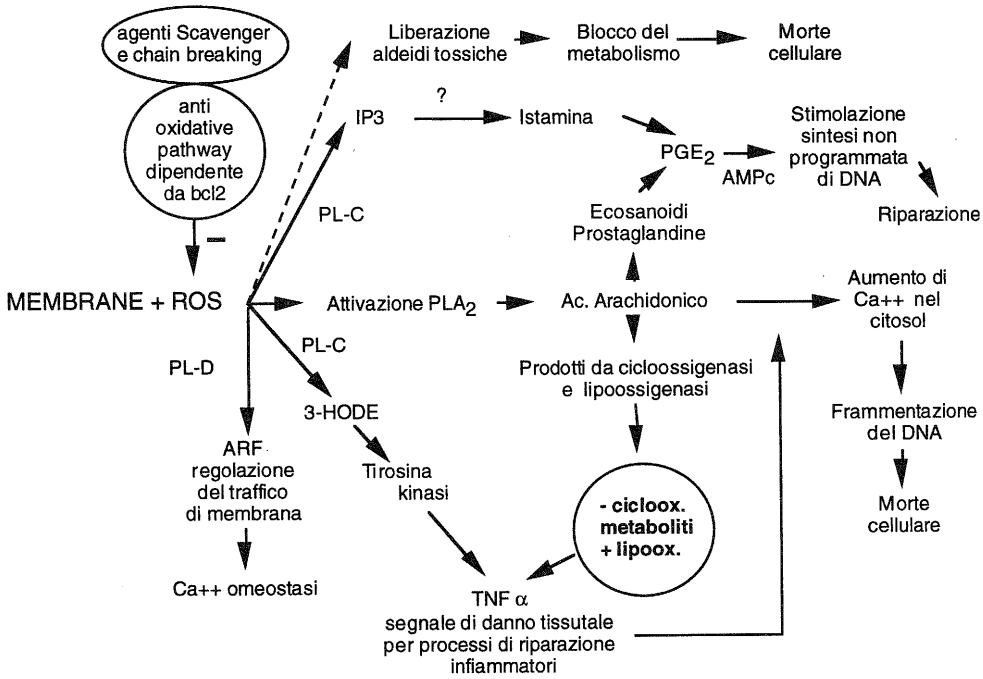

Fig. 4: Possibili vie metaboliche di segnali da e per la membrana prodotti dall'interazione di ROS con i lipidi di membrana. Il meccanismo generale che si può ipotizzare é il seguente: i prodotti di ossidazione dei PUFA o le alterazioni locali, causate da questi prodotti nel doppio strato lipidico, provocano l'attivazione delle fosfolipasi che liberano a loro volta i prodotti di ossidazione. Questi agiscono come segnali di stress ossidativo attivando una cascata di segnali che può portare all'induzione o di sistemi riparativi o ad innescare processi che hanno come scopo finale la morte cellulare. Se lo stress ossidativo è grave si ha la massiccia liberazione di aldeidi che producono un blocco generale del metabolismo cellulare e come conseguenza portano a morte cellulare (linea tratteggiata).

BIBLIOGRAFIA

1) ARLETT C.F. and LEHMANN A.R. (1978) *Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage.* Ann. Rev. Genet., 12, 95-115.

2) BARONE F., BELLI M., PAZZAGLIA S., SAPORA O., TABOCCHINI. M.A. (1989) *Radiation damage and chromatin structure.* Ann. Ist. Super. Sanità, 25, 59-68.

3) BEREZNEY R. (1991) *The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organisation and function in thi cell nucleus.* J. Cell. Biochem., 47, 109-123.

4) BODNAR J.W. (1985) *A domain model for eukaryotic DNA organisation: a molecular basis for cell differentiation and chromosome evolution.* J. Theor. Biol., 132, 479-507.

5) BOESEN J.B., DIOETEREN N., BAL E., LOHMAN P.H.M., and SIMONS J.W., (1992) *A possible factor in genetic instability of cancer cells: stress induced stress proteins lead to decrease in replication fidelity.* Carcinogenesis, 13, 2407-2414.

6) BONIFER C., HECHT A., SAUERESSING H., WINTER D.M., SIPPEL A.E. (1991) *Dynamic chromatin: the regulatory domain organisation of eukaryotic gene loci.* J. Cell. Biochem., 47, 99-108.

7) BOOBIS A.R, FAWTHROP D.J., DAVIS D.S. (1990). *Mechanisms of cell toxicity.* Curr. Opinion Cell Biol., 2, 231-237.

8) BOOTSMA D. and HOEIJMAKERS J.H.J, (1993) *Engagement with transcription.* Nature, 363, 114-115, 1993.

9) BORNKAMM G.W. and RICHTER C. (1995) *A link between the antioxidant defense system and calcium: a proposal for the biochemical function of Bcl-2.* Curr. Top. Microbiol. Immunol., 194, 323-330.

10) BUTTKE T.M. and SANDSTROM P.A. (1995) *Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes.* Free Rad. Res., 22, 389-397.

11) CADENAS E., (1989) *Biochemestry of oxygen toxicity.* Ann. Rev. Biochem., 58, 79-110.

12) CHIU S.M., OLEINICK N.L. (1982) *The sensitivity of active and inactive chromatin to ionizing radiation-induced DNA strand breakage.* Int. J. Radiat. Biol., 41: 71-77.

13) COHEN D. and DELEO V.A., (1993) *Ultraviolet radiation induced phospholipase A2 activation occurs in mammalian cell membrane preparations.* Photochem. Photobiol., 57, 383-390.

14) CORCORAN G.B., FIX L., JONES D.J., MOSLEN M.T., NICOTERA P., OBERHAMMER F.A, BUTTYAN R. (1994) *Apoptosis: molecular control point in toxicology.* Tox. Appl. Pharmac., 128, 169-181.

15) CSORDAS A., (1990) *On the biological role of histone acetylation.* Biochem. J., 265, 23-38.

16) DAVIES K.J.A. (1987) *Protein damage and degradation by oxygen radicals: General aspects.* J. Biol. Chem., 262, 9895-9901.

17) DE GROOT H. (1994) *Reactive oxygen species in tissue injury.* Hepato-Gastroenterol., 41, 328-332.

18) DOWD D.R. (1995) *Calcium regulation of apoptosis.* In: Advances in second messenger and phosphoprotein research. A.R. Means ed., 30, 255-280.

19) FERNANDEZ A., KEIFER J, FOSDICK L. MCCONKEY D. J. (1995) *Oxygen radical production and thiol depletion are required for Ca^{++} mediated endogenous endonuclease activation in apoptotic thymocytes.* J. Immun., 155, 5133-5139.

20) FOOTE C.S., (1976) *Photosensitised oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems.* In: Free Radicals in Biology, 2, W.A. Pryor ed., pp. 85-133, New York, Academic Press.

21) FORREST V.J., KANG Y-H., MCCLAIN D.E., ROBINSON D.H., RAMAKRISHNAN N. (1994) *Oxidative stress-induced apoptosis preventes by trolox.* Free Rad. Biol. Med., 16 (6), 675-684.

22) FRIEDBERG E.C. (1985) *DNA repair.* W.H. Freeman and Company, New York.

23) GALLO R.L., BROWNSTEIN E. and GRANSTEIN R.D., (1989) *Secretion of interleukin-3 actiity from a transformed murine keratinicyte cell line after exposure to UV light: Role of membrane signal transduction mechanisms.* J. Invest. Dermatol., 92, 432-442.

24) GASSER S.M., LAEMLI U.K., (1987) *A glimpse at chromosomal order.* Trends Genet., 3, 16-22.

25) GUTTERIDGE J.M.C. (1995) *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage.* Clin. Chem., 41, 1819-1828.

26) HANAWALT P.C. (1992) *Genomic heterogeneity of DNA repair;* Role in aging? Ann. N. Y. Acad. Sci., 663, 17-25.

27) HANAWALT P. (1994) *Transcription-coupled repair and human disease.* Science, 266, 1957-1958.

28) HANSON D. and DELEO V. (1989) *Long-wave ultraviolet radiation stimulates arachidonic acid release and cyclooxygenase activity in mammalian cells in culture.* Photochem. Photobiol., 49, 423-430.

29) HANSON D. and DELEO V., (1990) *Long-wave ultraviolet light induces phospholipase activation in cultured human epidermal keratinocytes.* J. Invest. Dermatol., 95, 158-63.

30) HOCKENBERG D.M., Z.N. OLTVAI, X.M. YIN, C.L. MILLIMAN, S.J. KORSMEYER. (1993) *Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis.* Cell, 75, 241-251.

31) HUNT J.V., SIMPSON J.A. and DEAN R.T. (1988) *Hydroperoxide mediated fragmentation of proteins.* Biochem. J., 250, 87-93.

32) HUTCHINSON F., (1985) *Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation.* Progr. Nucl. Ac. Res., 32, 115.

33) JACOB R.A and BURRI B.J. (1996) *Oxidative damage and defense.* Am. J. Clin. Nutr., 63, 985S-900S.

34) KHAN R.A. J.K. YUCEL, and V. MALHOTRA (1993) *ARF signalling: a potential role for phospholipase D in membrane traffic.* Cell, 75, 1045-1048.

35) LINDAHL T. (1993) *Instability and decay of the primary structure of DNA.* Nature, 362, 709-715.

36) MARTIN S.J. (1993) *Apoptosis: suicide, execution or murder?* Trends Cell Biol., 3, 141-144.

37) MATSUI M.S. and DELEO V.A., (1990) *Induction of protein kinase C activity by ultraviolet radiation.* Carcinogenesis, 11, 229-239.

38) MCCORD J. M. (1995) *Superoxide radical: controversies, contradictions and paradoxes. Proc. Soc. Exper.* Biol. Med., 209, 112-117.

39) MCLEAN L.R., HAGAMAN K.A., DAVIDSON W.S. (1993) *Role of lipid structure in the activation of phospholipase A2 by peroxidized phospholipids.* Lipids, 28, 505-511.61) *R.H.*

40) MICHELL R.H. and WALKELAM M.J.O. (1994). *Sphingolipid signalling.* Current biology, 4 (4), 370-374

41) NACKERDIEN Z., MICHIE J., BOHM L. (1989) *Chromatin decondensed by acethylation shows an elevated radiation response.* Radiat. Res., 117, 234-244.

42) PARASASSI T., SAPORA O., GIUSTI A.M., DESTASIO G., RAVAGNAN G., (1991) *Alterations on erythrocyte membrane lipids induced by low doses of ionizing radiation as revealed by 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence lifetime.* Int. J. Radiat. Biol., 59, 59-69.

43) PARASASSI T., GIUSTI A.M., RAIMONDI M., RAVAGNAN G., SAPORA O. and GRATTON E., (1995) *Cholesterol protects the phospholipid bilayer from oxidative damage.* Free Radical Biol. Med., 19, 511-516.

44) PENTLAND A.P., M. MAHONEY, S.C. JACOBS, and M. J. HOLTZMAN (1990) *Enhanced prostaglandin synthesis after ultraviolet injury is mediated by endogenous histamine stimulation.* J. Clin. Invest., 86, 566-574.

45) PORTER N.A., CALWELL S.E. and MILLS K.A. (1995) *Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids.* Lipids, 30(4), 277-290.

46) RAMAKRISHNAN N., MCCLAIN D.E. and CAVATRAS G.N. (1993) *Membranes as sensitive targets in thymocytes apoptosis.* Int. J. Radiat. Biol., 63, 693-701.

47) RELEY P.A., (1993) *Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation.* Int. J. Radiat. Biol., 65, 27-34.

48) SANCAR A. (1994) *Mechanisms of DNA excision repair.* Science, 266, 1954-1960.

49) SAPORA O. and QUINTILIANI M. (1981) *Riparazione del DNA e radioprotezione.* Giorn. Ital. Med. Lav., 3, 175.

50) SATOSH M.S. and LINDAHL T. (1994) *Enzymatic repair of oxidative DNA damage.* Cancer Res., 54, 1899s-1901s.

51) SCHWARTZMAN R.A. and CIDLOWSKI J.A. (1993) *Apoptosis: the biochemestry and molecular biology of programmed cell death.* Endocr. Rev., 14, 133-151.

52) SCHAUR R.J., ZOLLNER H., and ESTERBAUER H., (1991) *Biological effects of aldheydes with particular attention to 4-hydroxynonenal and malondialdehyde.* In: Membrane Lipid Oxidation III, C. Vigo-Pelfrey (ed.) CRC Press, Boca Raton, FL.

53) SETLOW R.B. (1978) *Repair deficient human disorders and cancer.* Nature, 271, 713-717.

54) SHIVJI M.KK., KENNY M.K., WOOD R.C. (1992) *Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair.* Cell, 69, 367-374

55) SLATER A.F.G., STEFAN C., NOBEL I., VAN DEN DOBBELSTEEN D.J., ORRENIUS S. (1995) *Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis.* Toxic. Letters, 82/83, 149-153.

56) SMERDON M.J. (1992) *DNA repair and the role of chromatin structure.* Curr. Opinion Cell Biol., 3, 422-428.

57) STREILEIN J.W. (1993) *Sunlight and skin-associated lymphoid tissues: if UVB is the tyrigger and TNFa is its mediator, what is the message?* J. Invest. Derm., 100 (suppl.1), 47S-52S.

58) TREIBER D.K., CHEN Z., ESSIGMANN J.M. (1992) *An ultraviolet light damaged DNA recognition protein absent in XP group E cells binds selectively to pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts.* Nucl. Ac. Res., 20 (21), 5805-5810.

59) VENEMA J., VAN HOFFEN A., NATARAJAN A.T., VAN ZEELAND A.A., MULLENDERS L.H.F., (1990) *The residual repair capacity of Xeroderma Pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA.* Nucl. Ac. Res., 18, 443-448.

60) VENEMA J., VAN HOFFEN A., NATARAJAN. A.T, VAN ZEELAND A.A., MULLENDERS L.H.F., (1990) *The genetic defect in Cockrayne syndrome is associated with a defect in repair of UV induced DNA damage in transcriptionally active DNA.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 4707.

61) WOLFE J.T., ROSS D. and COHEN G.M. (1994) *A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes.* FEBS Letters, 352, 58-62.

VERA BIANCHI

I MECCANISMI DI DANNO E MORTE CELLULARE (2ª parte)

Dipartimento di Biologia-Facoltà di Scienze
Università degli Studi - Padova

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un fenomeno che si verifica fisiologicamente nel corso dello sviluppo embrionale e nel corso del differenziamento dei tessuti, e che opera come meccanismo di difesa cellulare nei confronti delle infezioni virali e dei danni indotti da agenti esogeni fisici e chimici. Si ritiene inoltre che l'apoptosi partecipi ai processi di invecchiamento e che errori del suo funzionamento possano causare malattie degenerative e tumori.

Il quadro morfologico dell'apoptosi è descritto da tempo, e consiste in una serie di profonde alterazioni a carico della membrana plasmatica, del citoplasma, dell'involucro nucleare e della cromatina. Le alterazioni biochimiche che accompagnano quelle morfologiche sono caratteristiche e vengono utilizzate come indicatori per il riconoscimento precoce dell'apoptosi. Parecchi *test* sono stati proposti per individuare, in base agli effetti succitati, gli agenti che inducono apoptosi e già diversi *kit* commerciali sono disponibili per il rilevamento delle alterazioni di composizione della superficie cellulare, della frammentazione del DNA nucleare, ecc.

Le basi molecolari dell'apoptosi sono oggi oggetto di intensi studi, che stanno chiarendo molti aspetti di questa particolare attività cellulare, benché molti punti restino aperti, e nuovi interrogativi nascano man mano che le indagini si fanno più approfondite (7). Un importante contributo alla comprensione dei meccanismi dell'apoptosi è venuto dagli studi sul nematode *Caenorhabditis elegans*, in cui sono stati inizialmente identificati nove geni Ced implicati nell'apoptosi e nella rimozione dei resti delle cellule morte da parte delle cellule circostanti. Si è presto scoperto che nei mammiferi si trovano gli omologhi di alcuni di questi geni e si è così cominciato a ricostruire le tappe del processo nelle cellule degli animali superiori. Grazie alle ricerche degli ultimi due anni il quadro è oggi dettagliato, anche se largamente incompleto (1), e mostra che l'induzione dell'apoptosi si svolge nelle sue linee generali in modo simile alla risposta cellulare ad altri segnali fisiologici quali i fattori di crescita e gli ormoni. Sono stati individuati recettori di membrana che, attivati dai loro ligandi, interagiscono con proteine citoplasmatiche (spesso dotate di particolari domini detti *death domains*) trasduttrici del segnale verso una serie di proteasi effettori dell'apoptosi. Infatti mentre i segnali di crescita operano largamente attraverso catene di fosforilazione, quelli che inducono la morte cellulare operano attraverso una cascata di proteasi. Tali proteasi sono imparentate con quella codificata dal gene Ced-3 di *Caenorhabditis*. La prima individuata fu quella che converte il precursore dell'interleuchina 1ß nel prodotto maturo, chiamato ICE (*Interleukin-Converting Enzyme*). Queste proteasi sono definite cistein-proteasi, perché la loro attività enzimatica dipende dalla presenza di una specifica cisteina nel sito catalitico (5). Altra caratteristica comune è che esse tagliano i loro substrati in corrispondenza di un residuo di aspartato. Esse sono presenti nel citoplasma come precursori inattivi e la loro attivazione avviene attraverso un taglio proteolitico in corrispondenza

di un aspartato. Si pensa quindi che esse possano autoattivarsi e che possano agire in maniera gerarchica dando luogo ad una catena di attivazioni. Date le loro diverse strutture esse possono avere specificità diversa per diversi substrati ed essere responsabili delle diverse vie che portano alla morte cellulare. Il controllo dell'apoptosi nella cellule è strettamente legato a quello del ciclo cellulare (3). È noto che le cellule che subiscono dei danni o si trovano in condizioni di *stress* bloccano la progressione del ciclo cellulare prima di entrare in S o in mitosi, per riprenderla quando i danni sono stati riparati o le condizioni ambientali sono tornate favorevoli. Questo arresto è in parte dovuto all'azione della proteina p53 (2). In situazioni estreme, o in caso di danni molto estesi, p53 può indurre apoptosi, attraverso un meccanismo ancora non chiarito nei dettagli. Si sa però che p53, che ha funzioni di fattore di trascrizione, è in grado di attivare o reprimere la trascrizione di alcuni geni che controllano l'apoptosi o che vi partecipano direttamente. Sono noti anche geni che inibiscono l'apoptosi, quali Bcl-2, o che la regolano interferendo con il funzionamento dei geni inibitori (quali per es. il gene *ces*-2 recentemente scoperto in *Caenorhabditis* (6), o un gene umano che codifica per un fattore di trascrizione, HLF (4), alterato a causa di una traslocazione cromosomica nella leucemia linfoblastica acuta).

L'apoptosi è un fenomeno cellulare di grande interesse, sia dal punto di vista della comprensione di un attività complessa e finemente regolata, sia per le sue possibili e oggi appena intuite relazioni con diverse condizioni patologiche, sia perché la sua presenza nel repertorio delle attività geneticamente controllate nella cellula rappresenta un potenziale bersaglio di agenti genotossici e citotossici. Quest'ultimo aspetto va tenuto in considerazione quando si voglia valutare il rischio dell'esposizione a tali agenti.

BIBLIOGRAFIA

1) BARINAGA M. (1996) *Forging the path to cell death.* Science, 273, 735-737.
2) CHERNOVA O.B. *et al.* (1995) *Rhe role of p53 in regulating genomic stability when DNA and RNA synthesis are inhibited.* Trends Biochem. Sci., 20, 431-434.
3) ENOCH T. and NORBURY C. (1995) *Cellular responses to DNA damage: cell cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM.* Trends Biochem. Sci., 20, 426-430.
4) INABA T. *et al.* (1996) *Reversal of apoptosis by the leukemia-associated E2A-HLF chimaeric transcription factor.* Nature, 382-544.
5) KUMAR S. (1995) *ICE-like proteases in apoptosis.* Trends Biochem. Sci., 20, 198-202
6) METZSTEIN M.M. *et al.* (1966). *Trascriptional regulator of programmed cell death encoded by Caenorhabditis elegans gene ces-2.* Nature, 382, 545-547.
7) VAUX D.L. and STRASSER A. (1996) *The molecular biology of apoptosis.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 93, 2239-2244.

Finito di stampare
da La Nuova Cartografica S.p.A. Brescia
nel marzo 1997