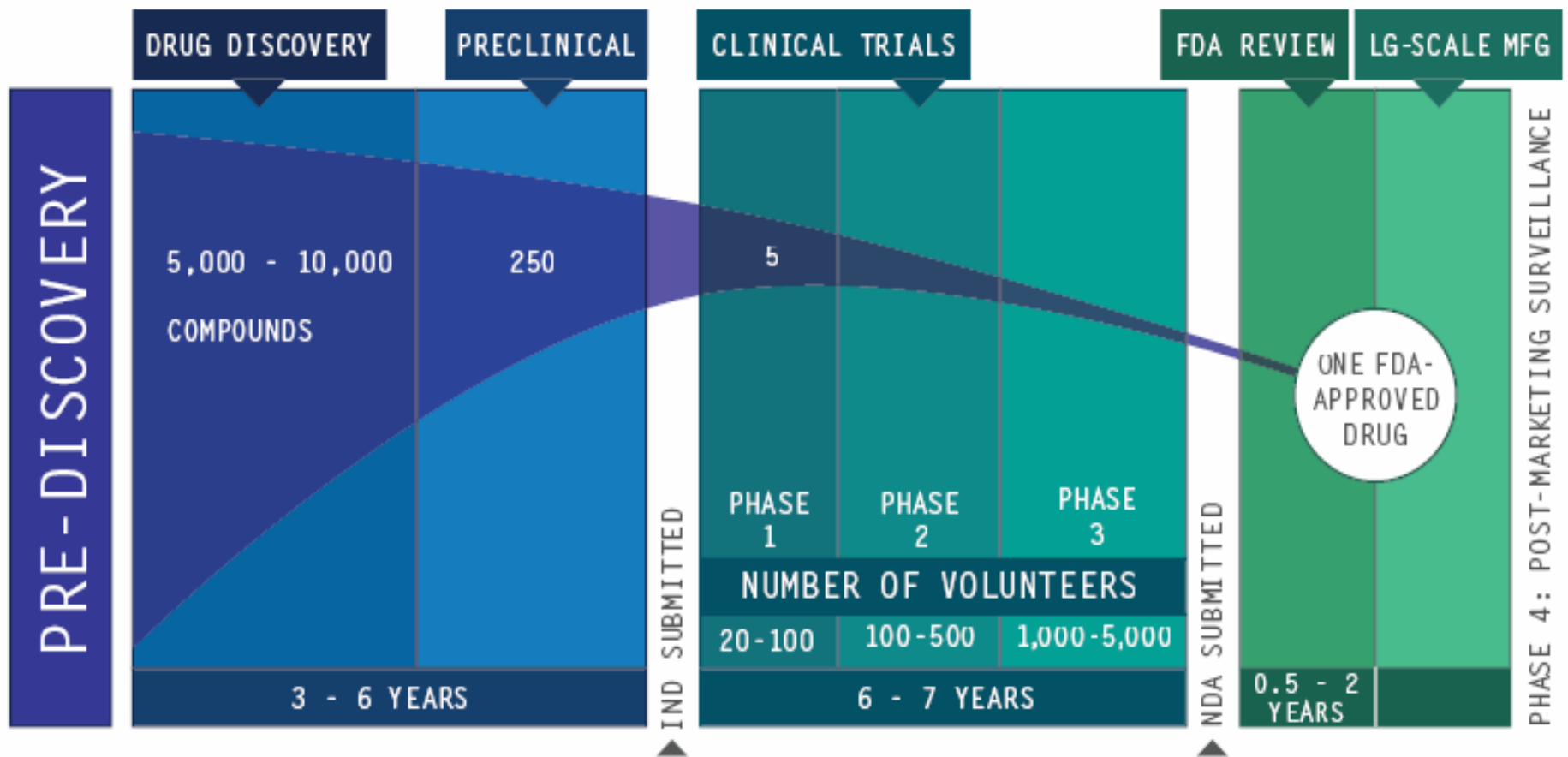


Sperimentazione preclinica



Studi in fase preclinica

- Studio delle caratteristiche chimico-fisiche (struttura, stabilità nel solvente, liposolubilità, ecc.).
- Studio delle proprietà farmacocinetiche (assorbimento, distribuzione, eliminazione, analisi dei metaboliti).
- Studio delle proprietà farmacodinamiche (effetti, meccanismo d'azione, relazione dose-effetto e tempo-effetto, calcolo del margine terapeutico).
- Studio tossicologico (tossicità acuta, cronica. Azione sulla fertilità, studi di teratogenesi, mutagenesi, cancerogenesi).

Sperimentazione preclinica: finalità

- Verificare se la molecola identificata possiede le proprietà terapeutiche che le sono state attribuite teoricamente (EFFICACIA)
- Modificare eventualmente la molecola per aumentarne l'efficacia
- Valutazione della tossicità e della formulazione ottimale

SPERIMENTAZIONE PRECLINICA è il banco di prova del farmaco, superato il quale si può procedere alla sperimentazione sull'uomo

SPERIMENTAZIONE PRECLINICA

Durata: 2-3 anni

Indispensabile prima di procedere alla sperimentazione sull'uomo

Va eseguita attenendosi a norme speciali emanate dalle istituzioni pubbliche

Prevede l'impiego degli animali per la sperimentazione dei farmaci

Consente di isolare dalle migliaia di sostanze sottoposte al primo screening di base farmacologico e biochimico, 20-30 composti

Nel corso della sperimentazione preclinica vengono identificate le strutture chimiche correlate ad una certa azione farmacologica

Sperimentazione preclinica: impatto delle nuove tecnologie

Biologia molecolare: Identificazione di targets farmacologici

Chimica combinatoriale: Generazione di grandi librerie da screenare

Genomica e Proteomica: definizione delle basi genetico-molecolari di varie patologie e simulazione della patologia in modelli sperimentali

Tecnologia 'in silico': drug modelling, librerie chimiche virtuali, valutazione della sicurezza di un farmaco

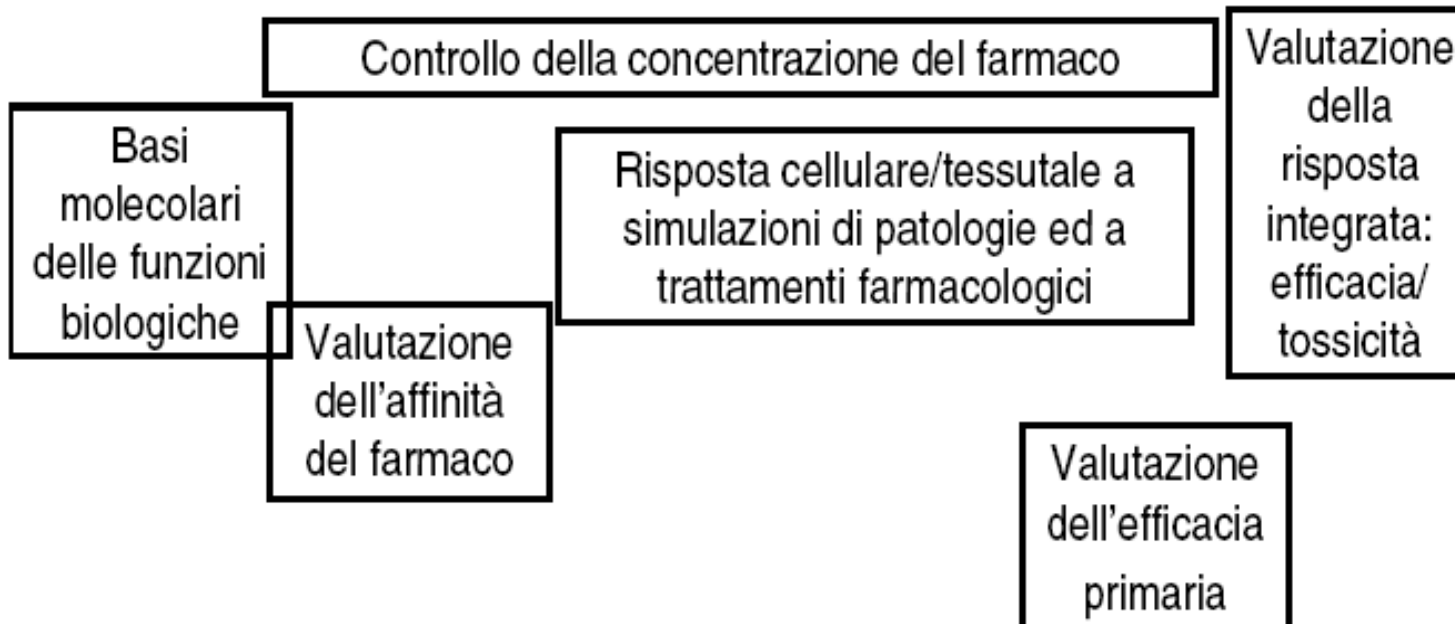


Early Drug Discovery

COMPLESSITA' DEL SISTEMA

VANTAGGI E SVANTAGGI DEI DIVERSI MEZZI DI INDAGINE FARMACOLOGICA

Biologia subcellulare	Frammenti di membrane	Singole cellule	Colture cellulari	Tessuti isolati	In vivo (intatto)
-----------------------	-----------------------	-----------------	-------------------	-----------------	-------------------



Sperimentazione preclinica

Modelli *in vitro* - *ex vivo*

- Livello molecolare: legame recettoriale, attività enzimatica, biotrasformazioni
- Colture cellulari
- Organi isolati



Modelli *in vivo*

Animali sani o animali che riproducono la malattia

Sperimentazione *in vitro*

Vantaggi

- Facilità di reperibilità dei dati, minima variabilità biologica
- Uniformità genetica (elevata riproducibilità)
- Possibilità di manipolazione genetica
- Predittività dei meccanismi d'azione a livello molecolare
- Possibilità di impiego di materiale umano

Svantaggi

- Impossibilità di studiare processi biologici complessi
- Difficoltà di estrapolare i risultati *in vivo*
- Non perfetta coincidenza tra le cellule 'immortalizzate' (anche umane) rispetto a quelle differenziate

Obiettivi che non possono essere raggiunti da studi *in vitro*

- valutazione di effetti tossici secondari
- determinazione dell'indice terapeutico
- determinazione dei parametri farmacocinetici
- indicazione sull'appropriato range di dosaggi
- comprensione dell'importanza relativa di differenti processi e mediatori



NECESSITA' DI STUDI IN VIVO

Sperimentazione *in vitro*: le colture cellulari

Con il termine di colture cellulari si intende la tecnica di coltivazione delle cellule *in vitro*.

TIPI DI COLTURE CELLULARI

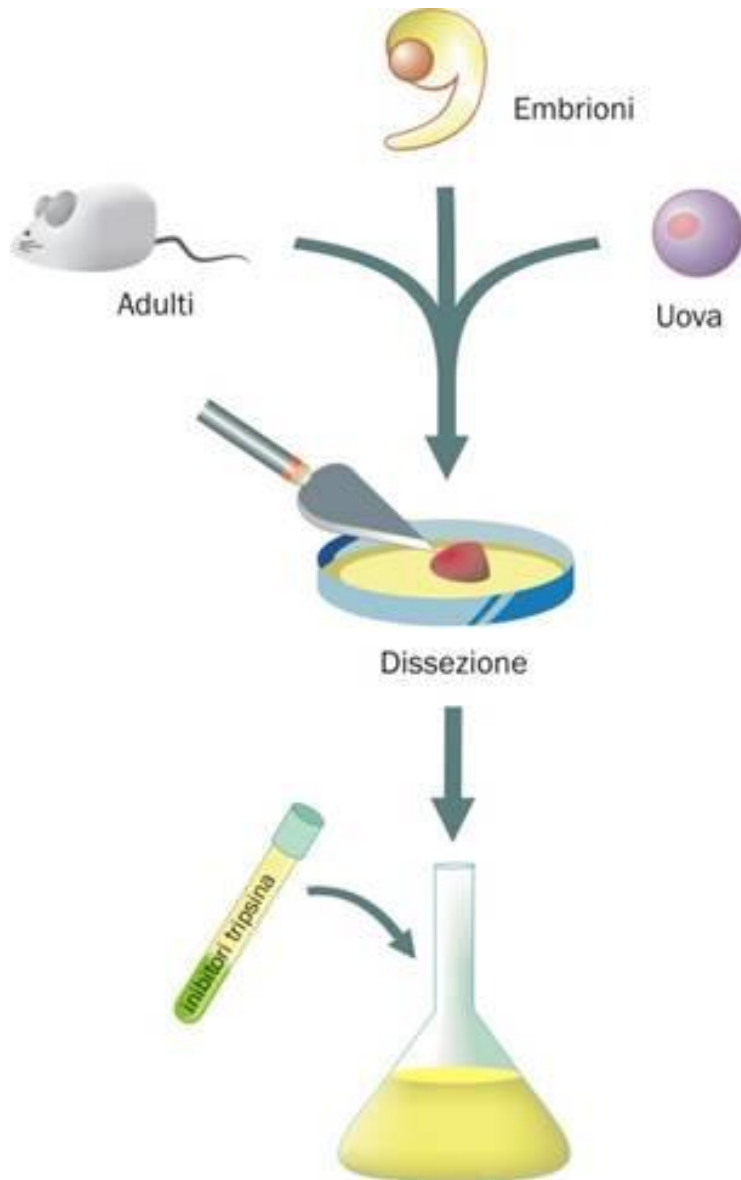
COLTURE PRIMARIE

Derivano dai tessuti freschi animali/umani che devono essere sottoposti a digestione enzimatica (es. tripsina, collagenasi) per ottenere una sospensione cellulare

Coltivabili *in vitro* per un periodo di tempo limitato, dopodiché vanno incontro a degenerazione e morte. Tale fenomeno avviene indipendentemente dalla presenza di metaboliti appropriati per la crescita e si indica come senescenza.

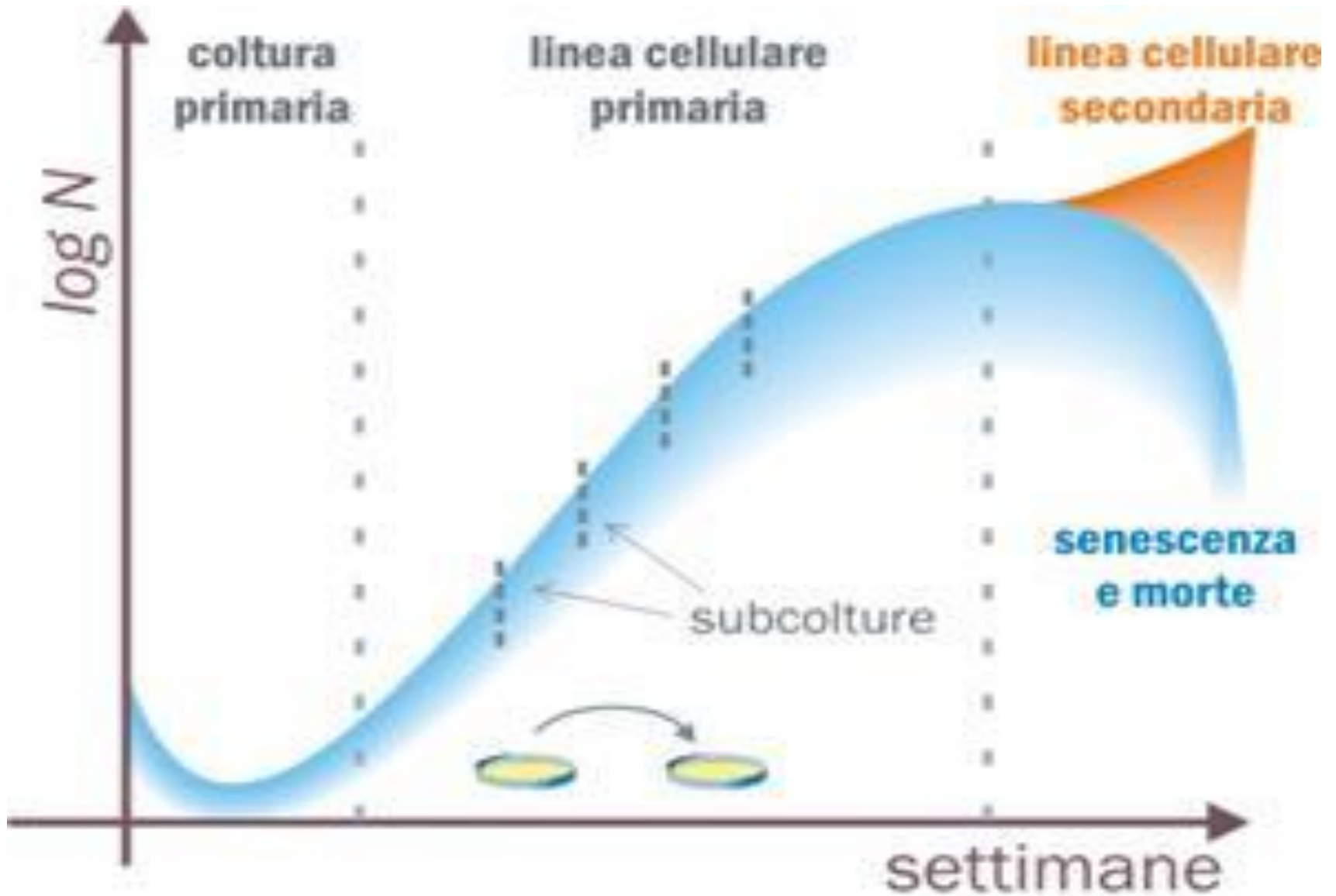
Mantengono la maggior parte delle caratteristiche delle cellule in vivo

Principali tappe per ottenere una coltura primaria



1. Prelievo delle cellule da un campione, quale organo di un adulto, embrioni o uova
2. Dalla biopsia si esegue una **dissezione** meccanica.
3. Trattamento con **tripsina** (eliminazione dei contatti proteici delle cellule con la matrice) e con **EDTA**, un chelante del calcio. Quest'ultimo trattamento serve a disgregare i contatti fra cellule.
4. Si blocca la digestione enzimatica con un inibitore (lo stesso siero animale, addizionato al terreno di coltura, contiene alcuni inibitori).
5. Si centrifuga la **sospensione cellulare**, e le cellule vengono risospese.

EVOLUZIONE DI UNA COLTURA CELLULARE PRIMARIA



COLTURE SECONDARIE

Derivano da singole cellule in cui mutazioni spontanee o indotte hanno annullato il programma genetico della senescenza.

Possono essere propagate per un numero illimitato di divisioni, si dicono perciò immortali: proliferano in modo continuo in presenza degli opportuni metaboliti.

Sono generalmente omogenee, costituite cioè da un solo tipo cellulare

Non sempre mantengono le stesse caratteristiche delle cellule in vivo

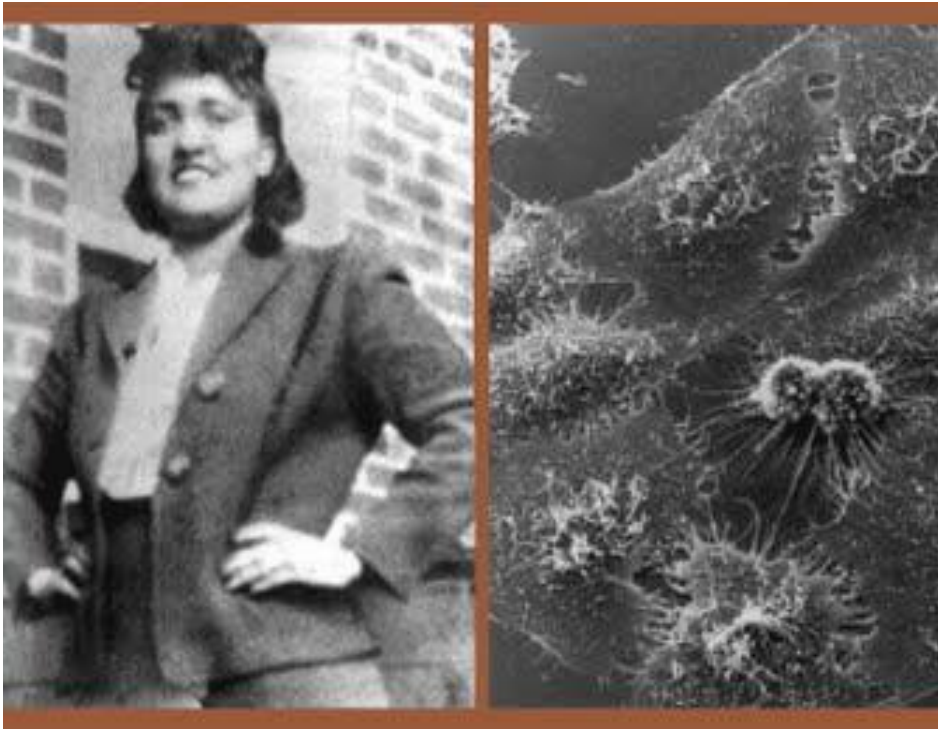
COLTURE TRASFORMATE

Presentano caratteristiche simili alle cellule cancerose

Sono immortali, proliferano in vitro fino a raggiungere una densità maggiore delle cellule normali e, spesso, crescono in sospensione senza legarsi ad alcuna superficie.

Possono essere rappresentate da cellule neoplastiche oppure da cellule normali che vengono "immortalizzate" attraverso la trasformazione con virus oncogeni o altre procedure

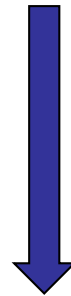
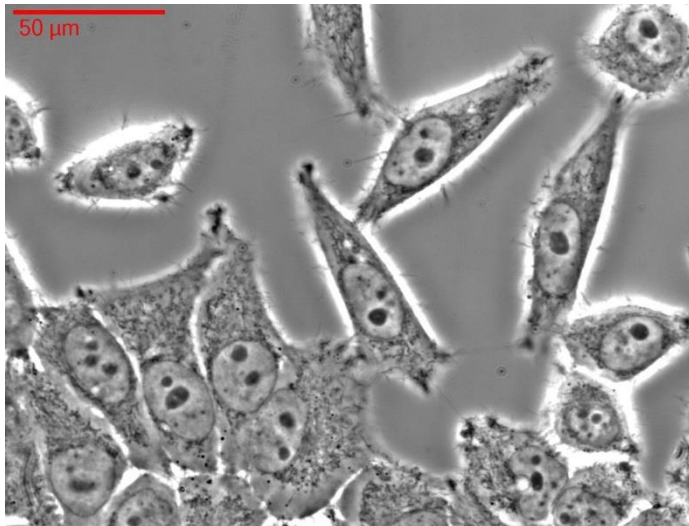
Henrietta Lacks, la donna dalle cellule immortali



C'è una foto sulla mia parete di una donna che non ho mai conosciuto, l'angolo sinistro dell'immagine è strappato e tenuto insieme con il nastro adesivo. Lei guarda radiosa verso la macchina fotografica e sorride. Le mani sui fianchi, il vestito perfettamente stirato, le labbra di un rosso vermiglio. E' il 1940 inoltrato e lei non ha ancora compiuto i 30 anni. La sua luminosa pelle scura è liscia e i suoi occhi ancora giovani e ridenti, inconsapevole che un tumore stava crescendo dentro di lei - un tumore che avrebbe lasciato i suoi cinque figli senza madre e che avrebbe cambiato il futuro della medicina. Sotto la foto, una scritta riporta il suo nome: "Henrietta Lacks"

Tratto da "La vita immortale di Henrietta Lacks" Rebecca Skloot

Henrietta si spense nel 1951 nell'ospedale di Baltimora, a causa di un tumore alla cervice uterina. Prima che morisse, un chirurgo asportò, senza avvisare la paziente, così si usava allora, un campione del suo tessuto tumorale e lo analizzò in laboratorio. Capì subito che si trattava di cellule straordinarie. Gli scienziati, infatti, avevano provato per decenni a mettere cellule umane in coltura senza successo: morivano tutte. Le cellule di Henrietta erano differenti: riproducevano un'intera generazione ogni 24h e non si fermavano mai.



Cellule HeLa

Cellule HeLa

Le HeLa sono cellule trasformate immortalizzate e utilizzate come cellule tumorali in laboratori di tutto il mondo per fini scientifici

Le HeLa posseggono infatti 82 cromosomi, oltre il normale corredo umano (46 cromosomi), presentano quattro copie del cromosoma 12 e tre copie dei cromosomi 6, 8, e 17.

Tale differenza nel corredo cromosomico è dovuta ad una mutazione orizzontale indotta dal Papillomavirus, che è responsabile di quasi la totalità dei carcinomi cervicali.

CLASSIFICAZIONE DELLE COLTURE CELLULARI

Le colture cellulari possono essere classificate secondo diversi parametri:

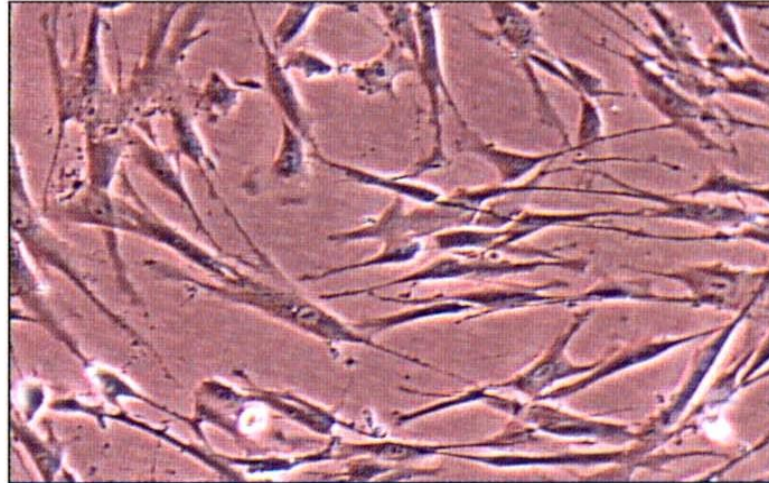
Colture a breve/lungo termine: nel primo caso il numero di cicli cellulari cui vanno incontro le cellule è ridotto, mentre per le colture a lungo termine le cellule si dividono molte volte, o addirittura illimitatamente nel caso delle linee cellulari stabilizzate.

Colture in monostrato/colture in sospensione: generalmente le cellule quando crescono tendono ad aderire alla superficie del recipiente di coltura. In alcuni casi la adesione è richiesta come segnale di sopravvivenza. Le colture in sospensione contengono cellule che possono proliferare senza una superficie di adesione. Questa capacità è un indice di tumorigenicità, e può essere usata *in vitro* come test per riconoscere sostanze cancerogene. Poiché le cellule in sospensione riescono a crescere ad un'elevata concentrazione, questo tipo cellulare è indicato quando occorrono quantità elevate di cellule. Per ottenere elevate quantità di cellule che richiedono adesione alla superficie, si possono usare i microcarriers, piccole sferette di materiale plastico (\varnothing 100-200 μm), su cui le cellule crescono come fossero in monostrato, ma con una densità cellulare simile alle colture in sospensione.

COLTURA CELLULARI ADERENTI

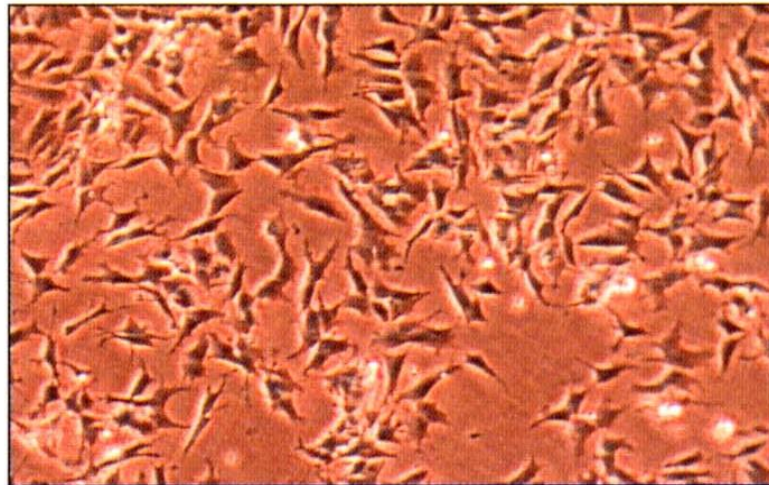
MRC-5 - fibroblast

(Prod. No. 84101801-1v1)



SH-SY5Y - neuronal

(Prod. No. 94030304-1v1)



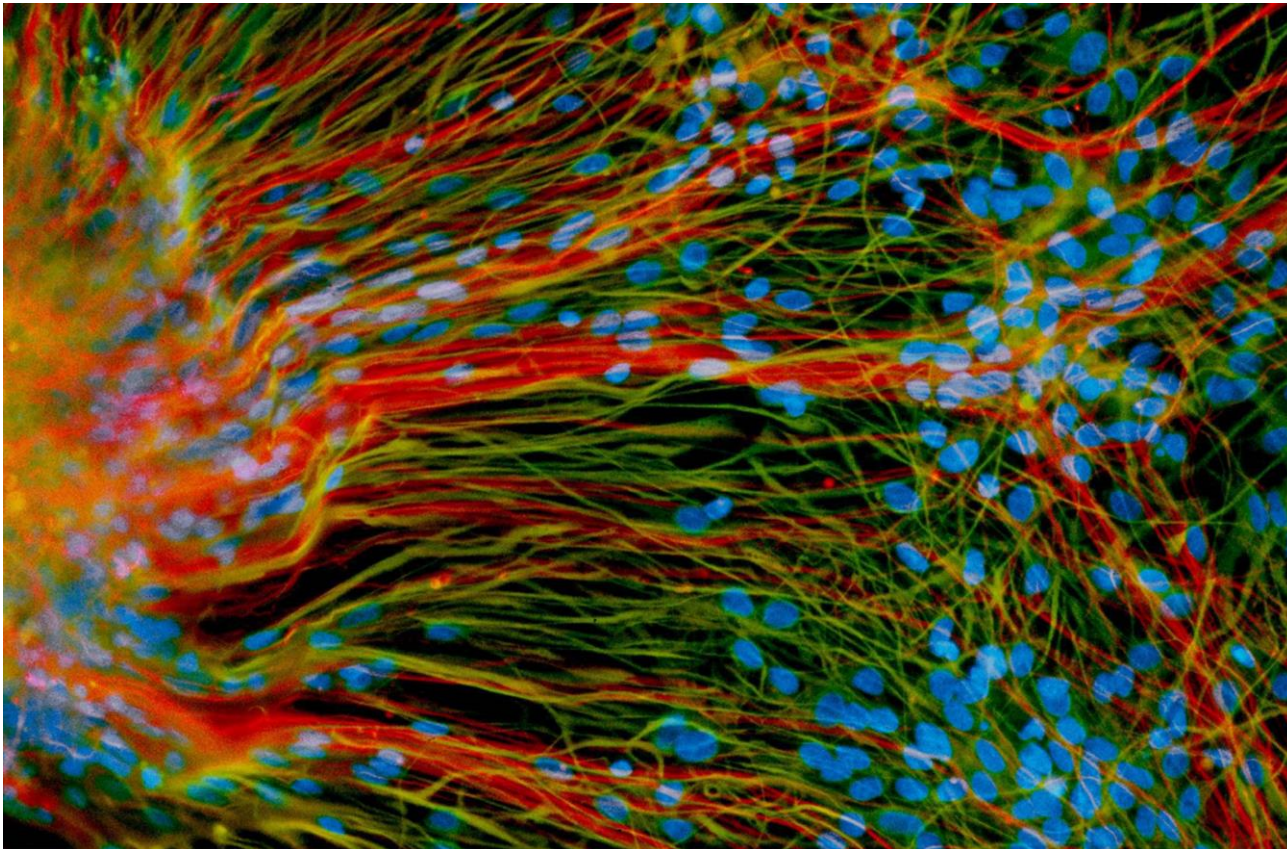
(magnification x400)

CLASSIFICAZIONE DELLE COLTURE CELLULARI

Colture clonali: in questi tipi di coltura le cellule vengono diluite prima della semina in modo tale da avere ogni cellula separata dalle altre, che prolifera formando una colonia singola.

Co-colture: in questo caso si coltivano nello stesso recipiente cellule di tipo diverso, per permettere di ricostruire un semplice sistema tissutale.

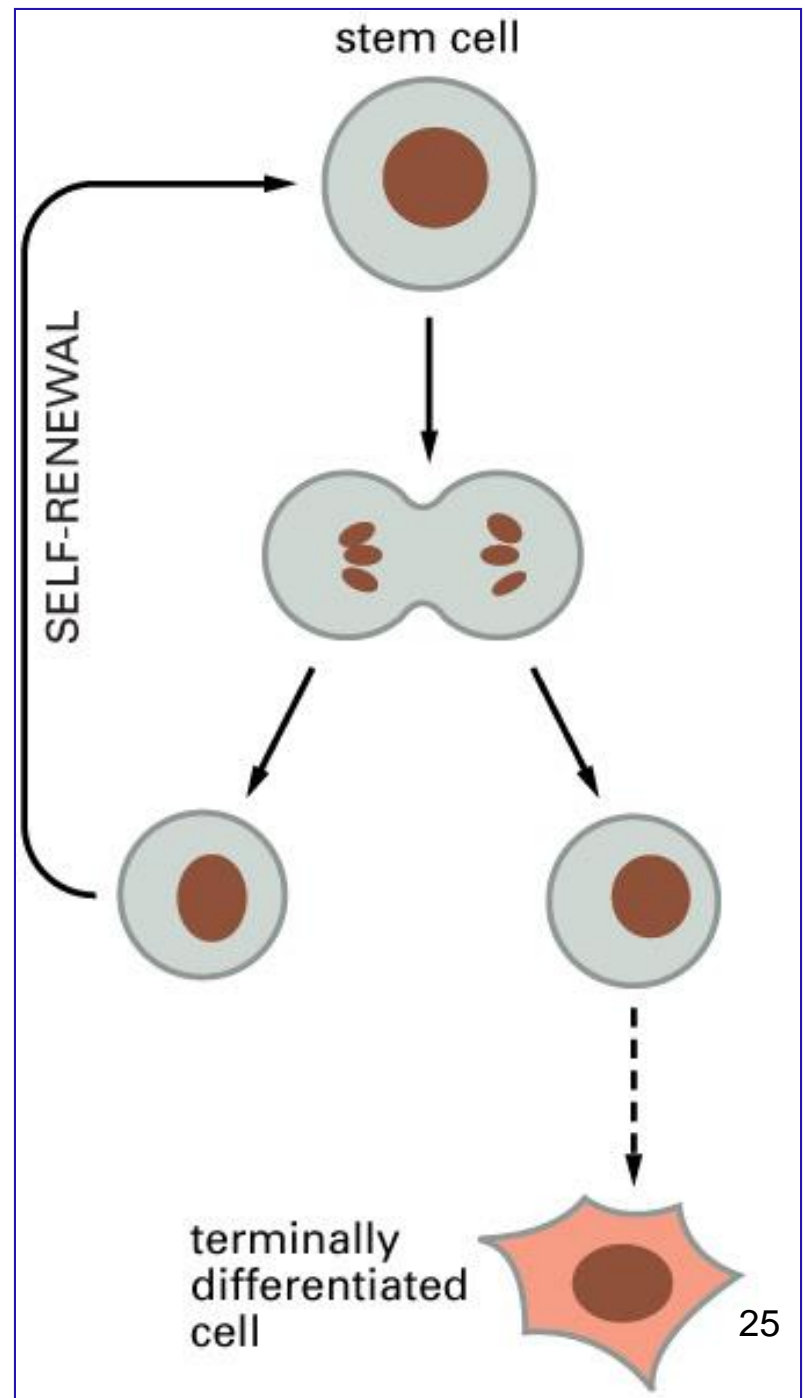
LE CELLULE STAMINALI



Cellula staminale

- Una cellula staminale è una cellula che può essere isolata **dall'embrione, o da un organismo adulto** con le caratteristiche di riprodursi per lunghi periodi di tempo.
- Ha inoltre la capacità di **differenziarsi** per dare luogo a tessuti ed organi specifici.

The Stem Cell Concept



“potenza” di una cellula staminale

- Esistono 4 tipi di cellule:
 - **Totipotente**: può dare luogo ad un intero organismo (tessuti embrionali + extraembrionali)
 - **Pluripotente**: può svilupparsi fino ai tessuti
 - **Multipotente**: si specializza unicamente in alcuni tipi di cellule
 - **Unipotente**: generano un solo tipo di cellula specializzata

Dove si trovano le cellule staminali

- **Cellule embrionali**

Sono cellule che compaiono nei primissimi giorni di vita dell'embrione ma spariscono dopo le prime 2 settimane.

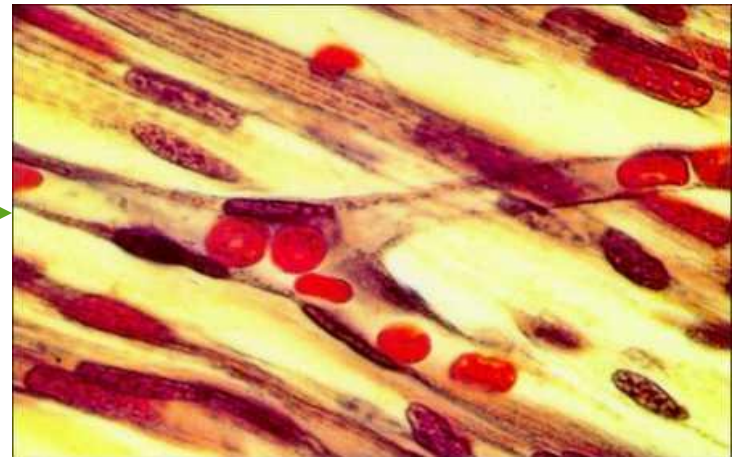


- **Cellule adulte**

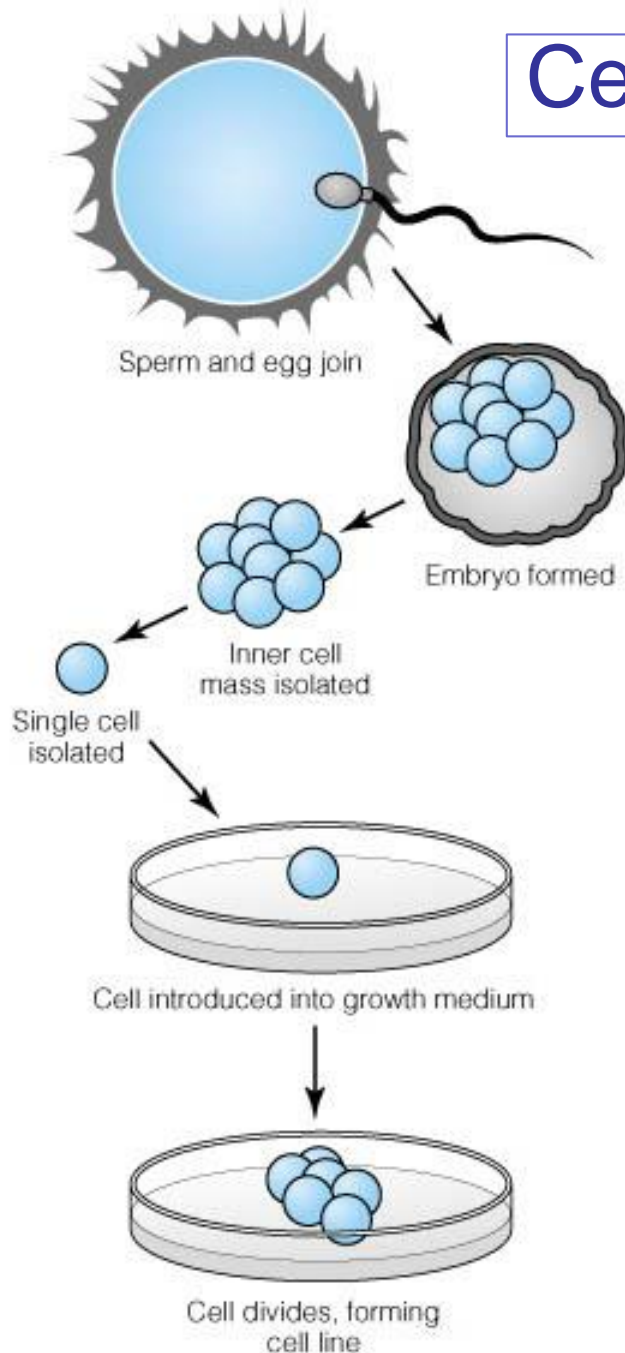
Sono cellule non specializzate reperibili tra cellule specializzate di un tessuto specifico

Sono dette più propriamente somatiche perchè non provengono necessariamente da adulti

Sono prevalentemente multipotenti



Creation of a stem cell line
from an embryo



Cellule staminali embrionali

FIGURE 10.10

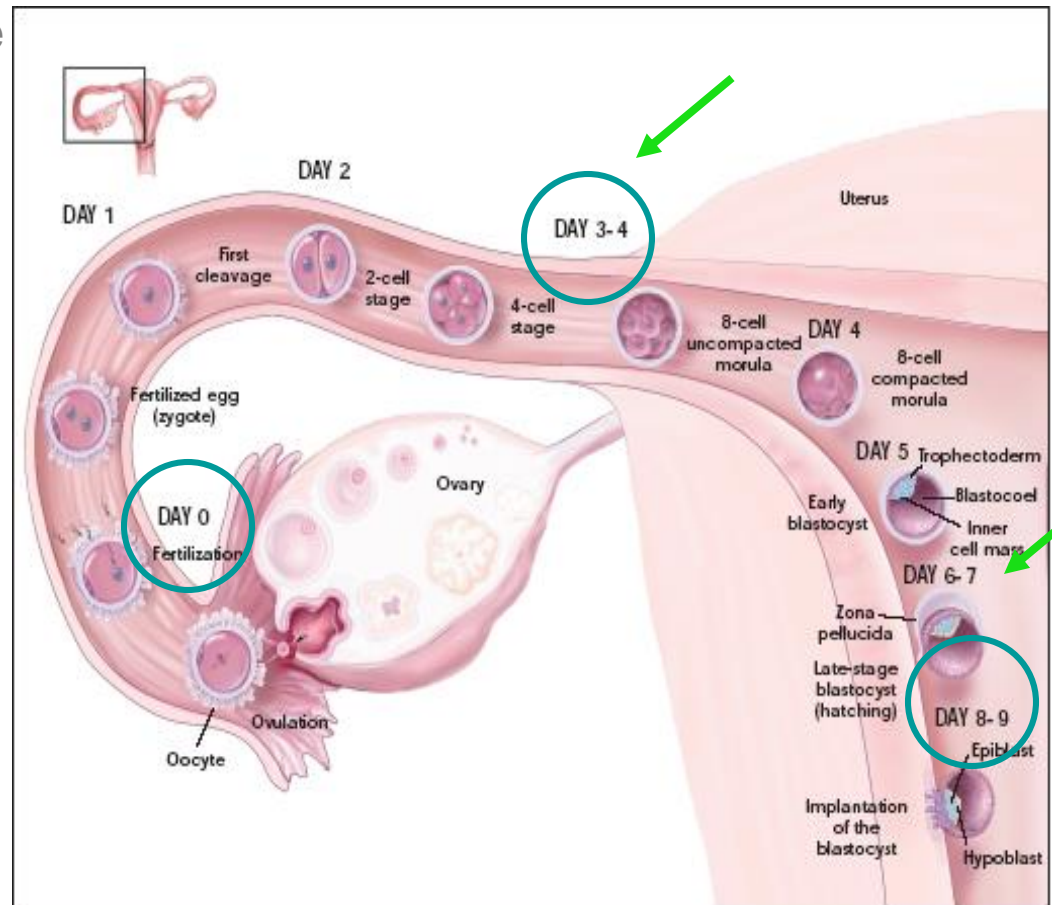
Embryonic stem cells are obtained from a blastocyst or embryo.

Cells of the inner cell mass are placed in culture where they divide to form an embryonic stem cell line.

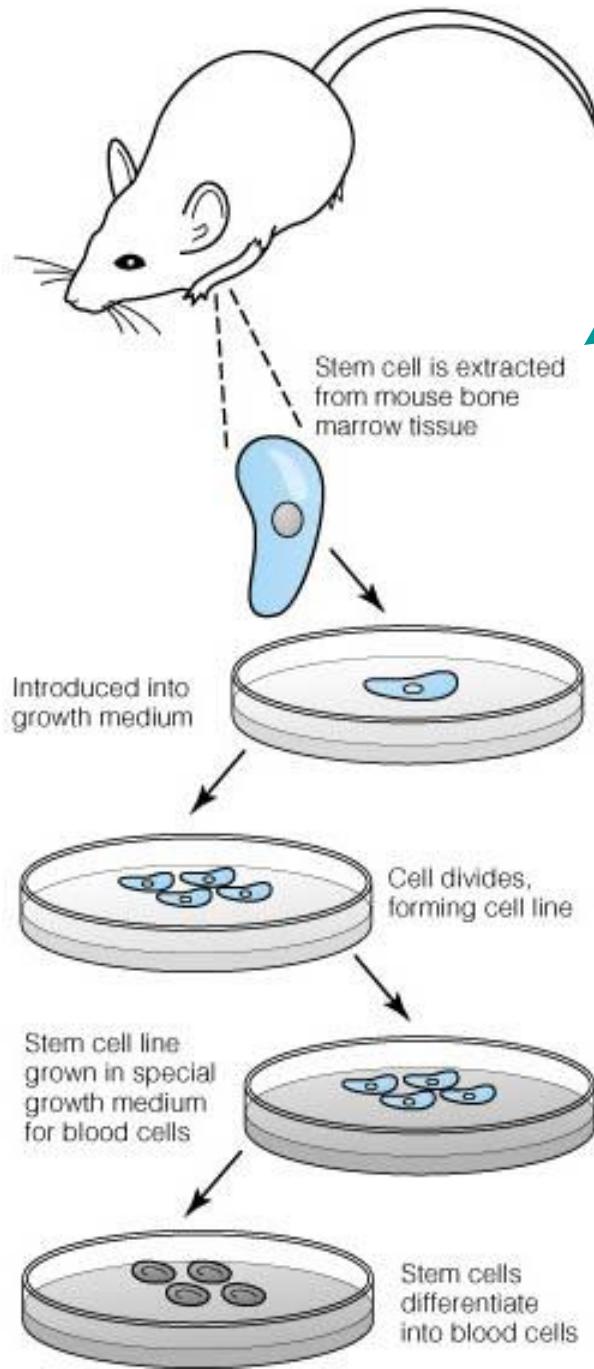
(From <http://gslc.genetics.utah.edu/units/stemcells/sccreate>.)

Early development in humans

- Day 0: Fertilization of the oocyte in the oviduct.
- Zygote – **totipotent**
- Day 4-5: (16 cells) – morula, solid mass of cells
- Day 6-7: Blastocyst formation - **pluripotent**
- 3rd week: Gastrulation, i.e formation of the three germ layers.



Creation of stem cell line
from adult tissue



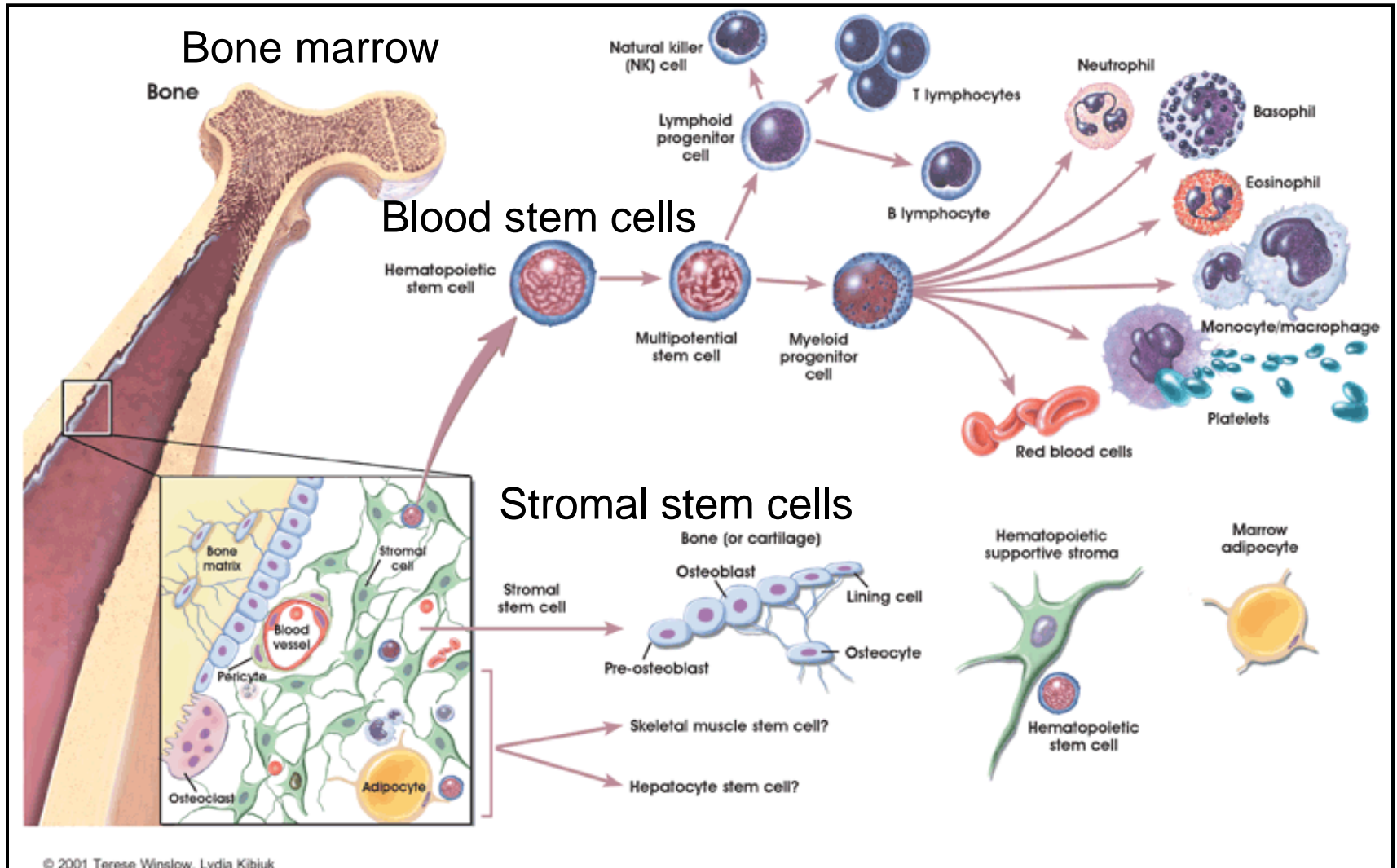
Cellule staminali adulte

FIGURE 10.9

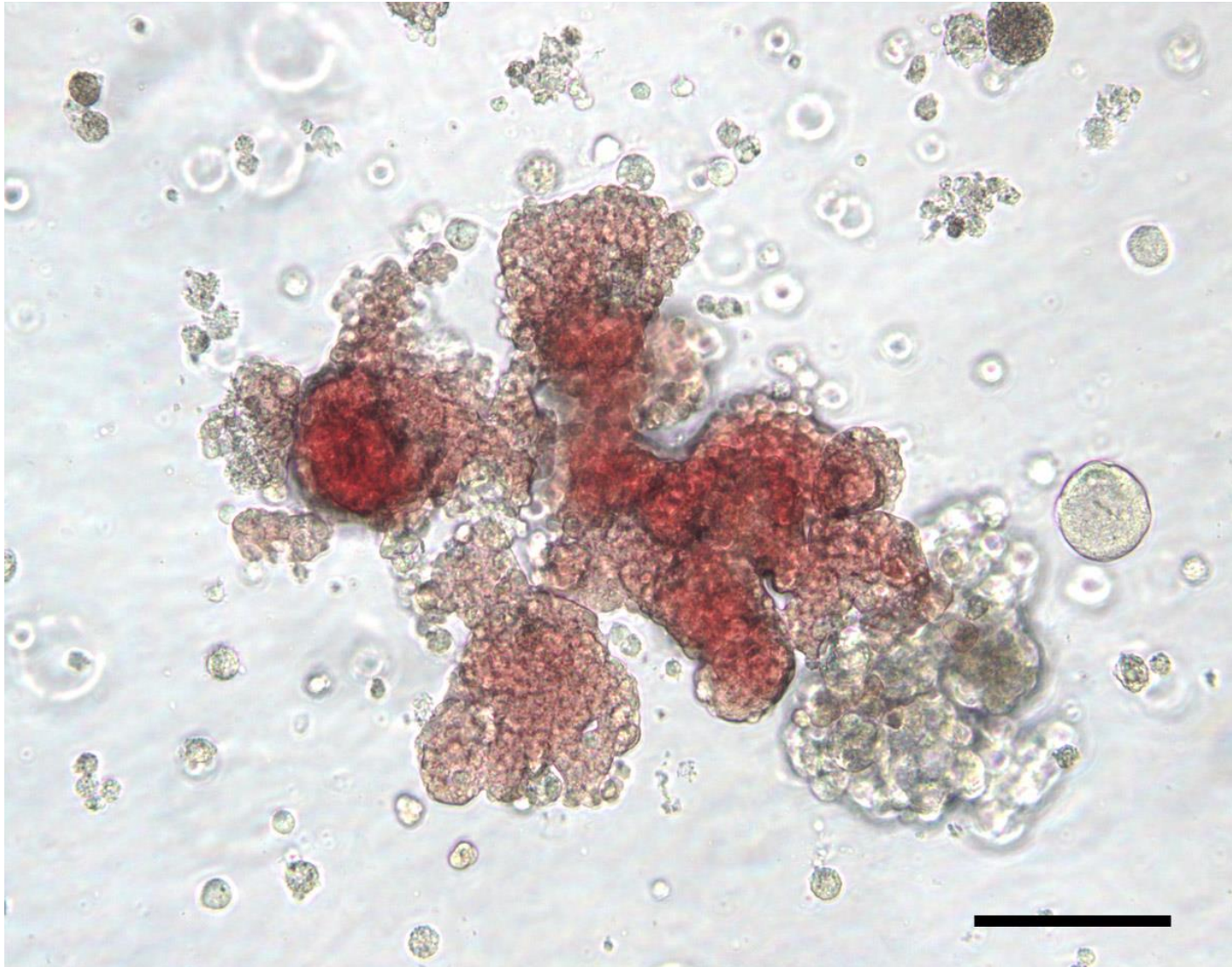
Stem cells obtained from bone marrow can be cultured and induced to differentiate into blood cells.

(From <http://gslc.genetics.utah.edu/units/stemcells/sccreate>.)

Cellule staminali adulte: multipotenti



Blood cells (red) derived from human embryonic stem cells



Staminali adulte

Da midollo osseo degli adulti

Queste cellule producono normalmente tutti i tipi di cellule ematopoietiche (globuli rossi, globuli bianchi, piastrine).

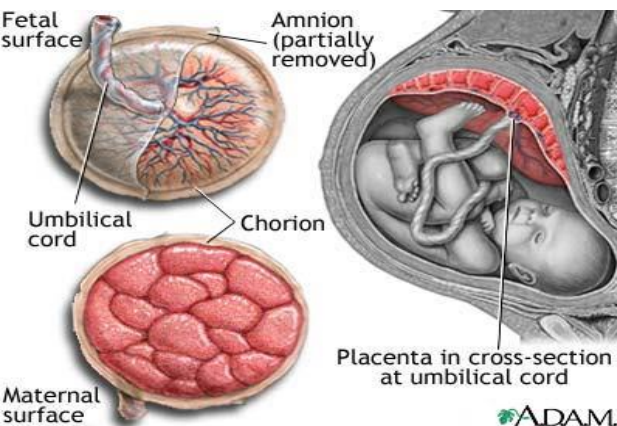
Dal cordone ombelicale,

il cui sangue è ricco di cellule staminali. Le cellule staminali così raccolte potranno essere utilizzate per curare disordini ematologici. In futuro, il sangue del cordone ombelicale potrebbe rappresentare una fonte di cellule staminali importantissima per curare le lesioni vascolari o cerebrali, il diabete, il morbo di Parkinson e la distrofia muscolare.

Le cellule staminali adulte sono reperibili anche in altre zone dell'organismo umano adulto: si possono trovare in zone specifiche del sistema nervoso, in alcuni tessuti muscolari, nei tessuti adiposi, epiteliali, connettivi....

Da feti abortiti in modo spontaneo

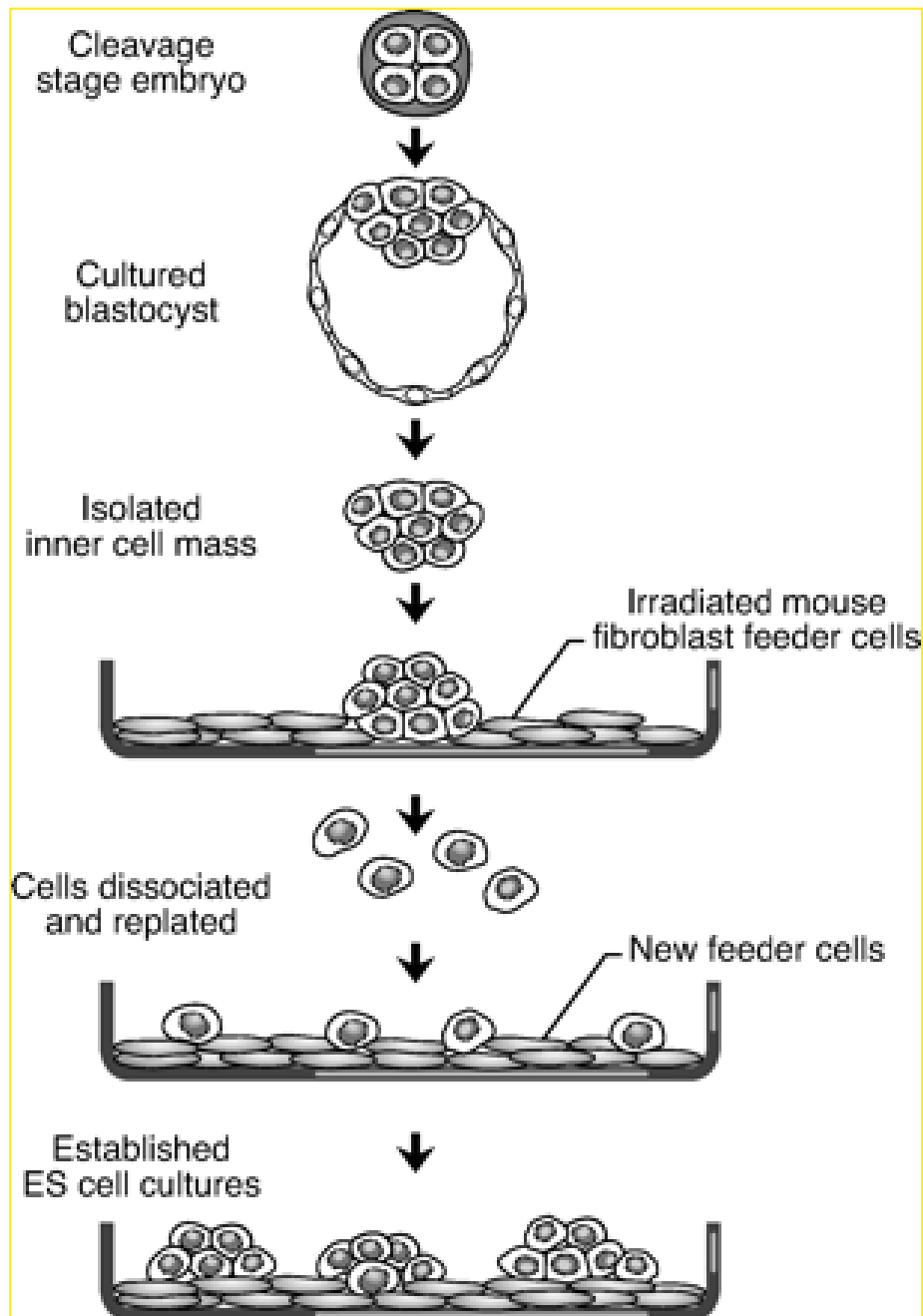
I feti, spontaneamente abortiti, racchiudono una riserva enorme di cellule staminali già differenziate (Committed) ma nello stesso tempo ad alta potenzialità genica e altamente prolifiche



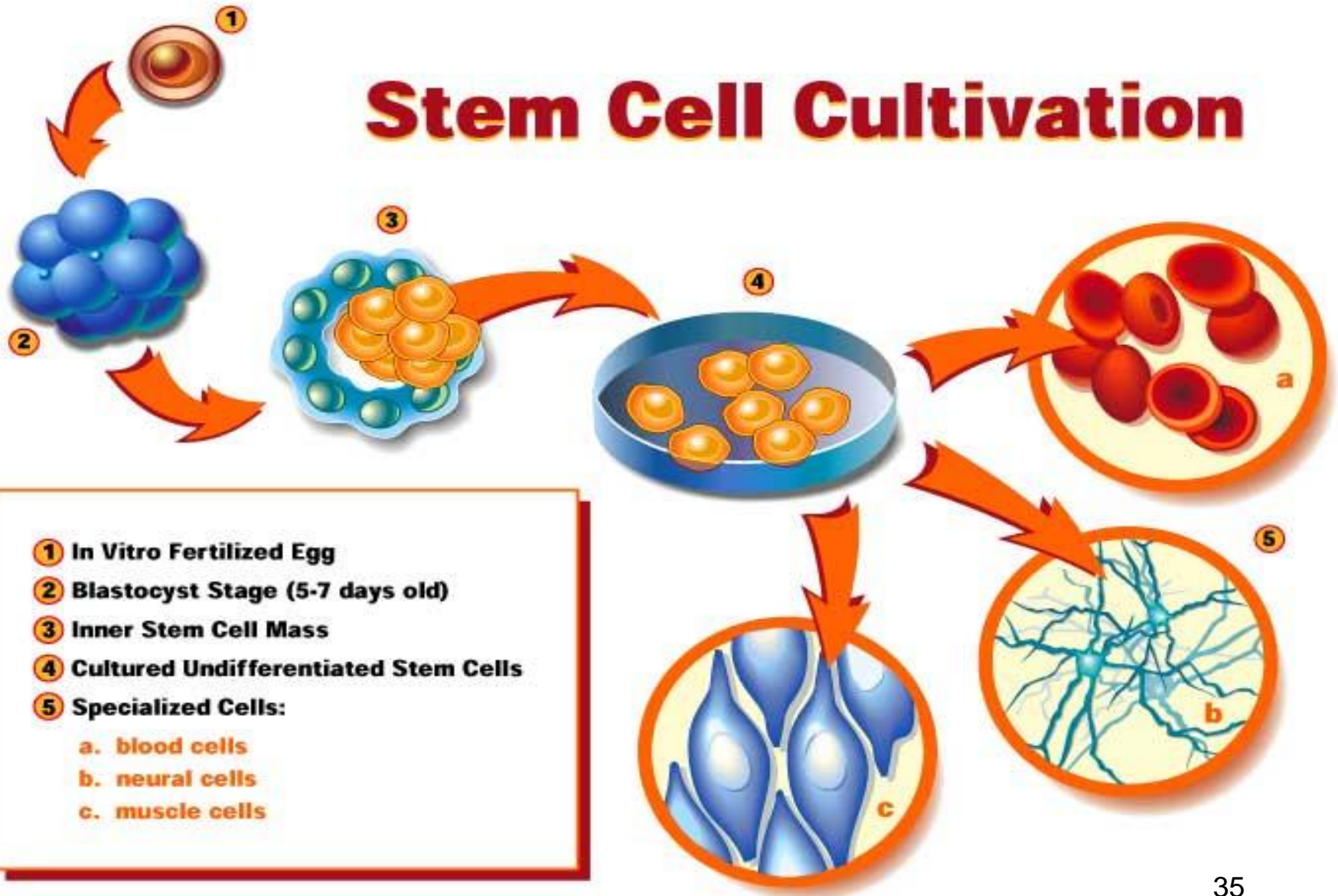
Coltivazione *in vitro* delle cellule staminali



Necessità di un
FEEDER



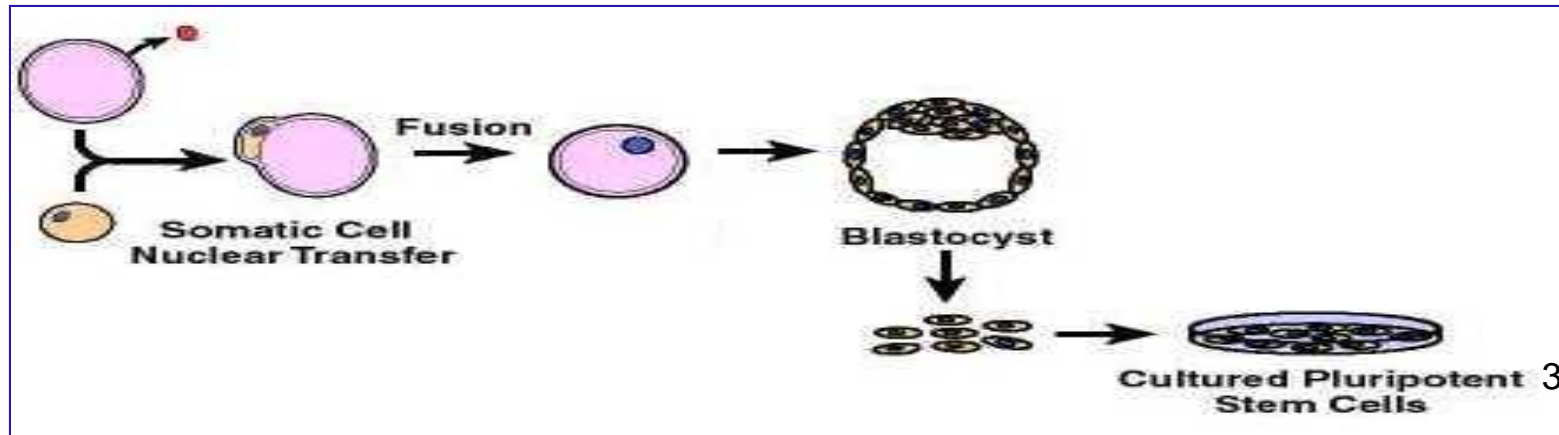
Stem Cell Cultivation



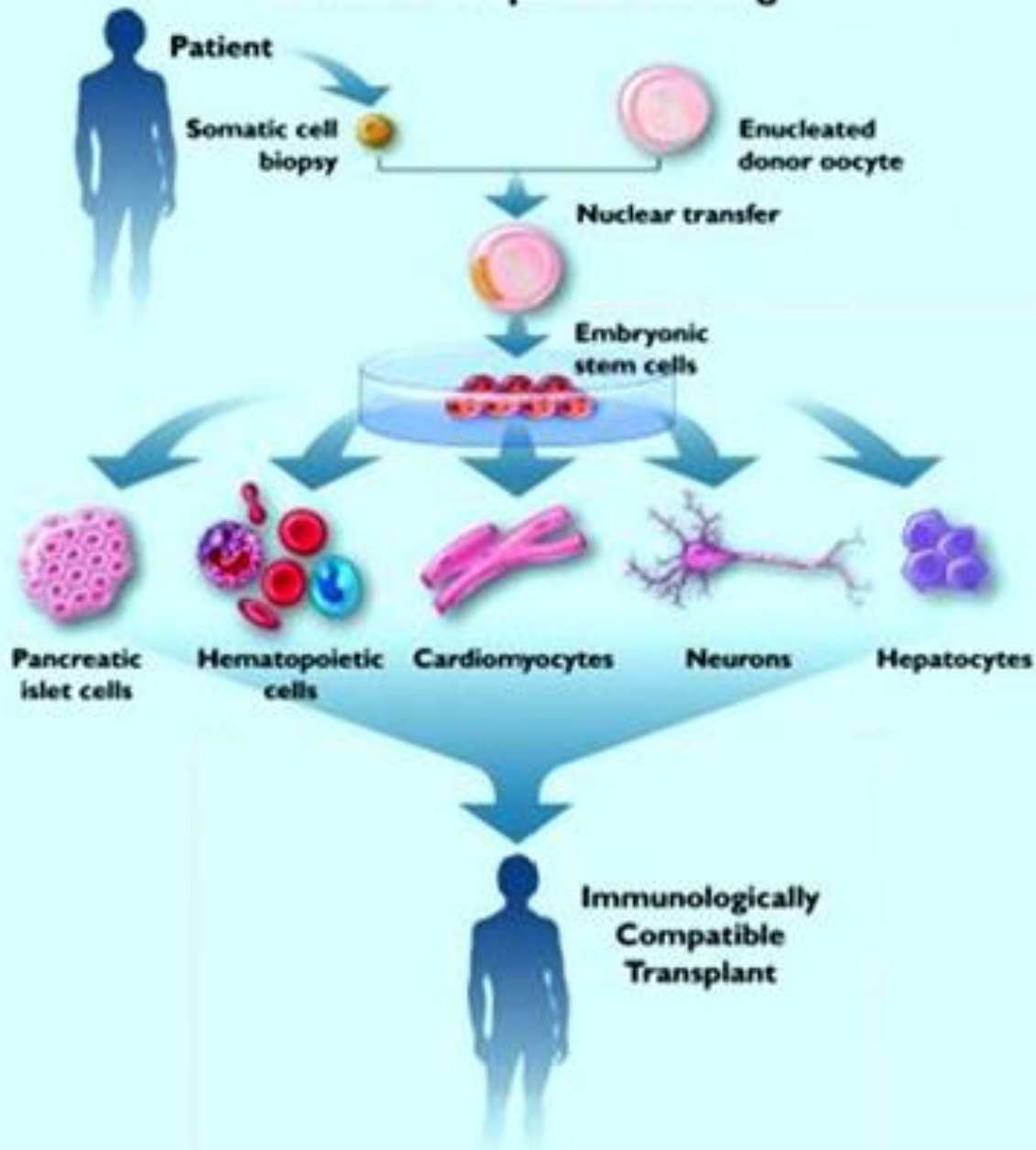
Clonaggio terapeutico

somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology

- **Trasferimento** del nucleo di una cellula somatica all'interno di una cellula uovo non fecondata enucleata.
- Il **nucleo** della cellula somatica **fornisce le informazioni genetiche**, mentre **la cellula uovo come citoplasma** provvede ai nutrienti ed ai costituenti per la formazione dell'embrione.
- Una volta avvenuta **la fusione** si formerà **la blastocisti** dalla quale **potranno essere isolate** le cellule staminali che potranno essere coltivate in vitro e differenziate.



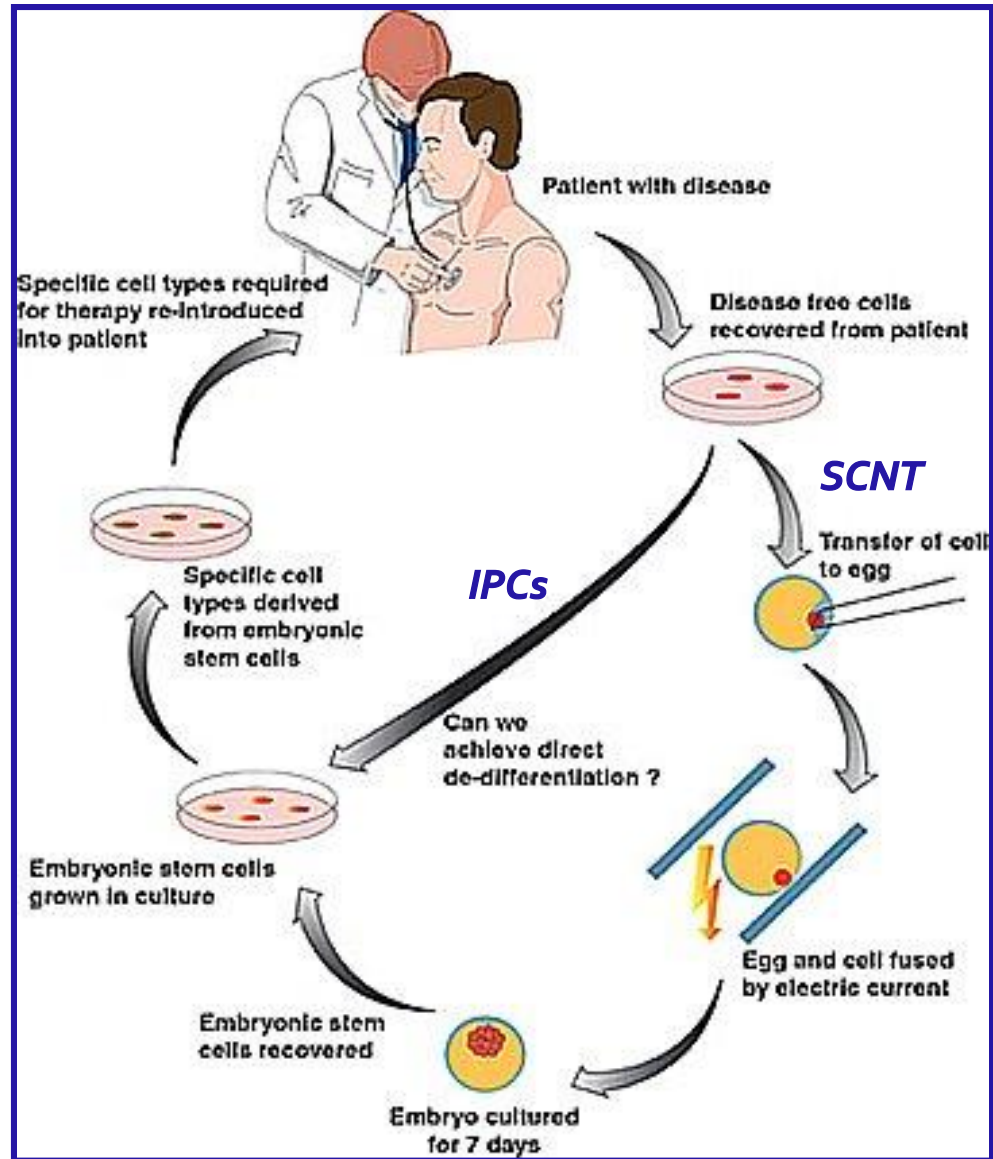
Human Therapeutic Cloning



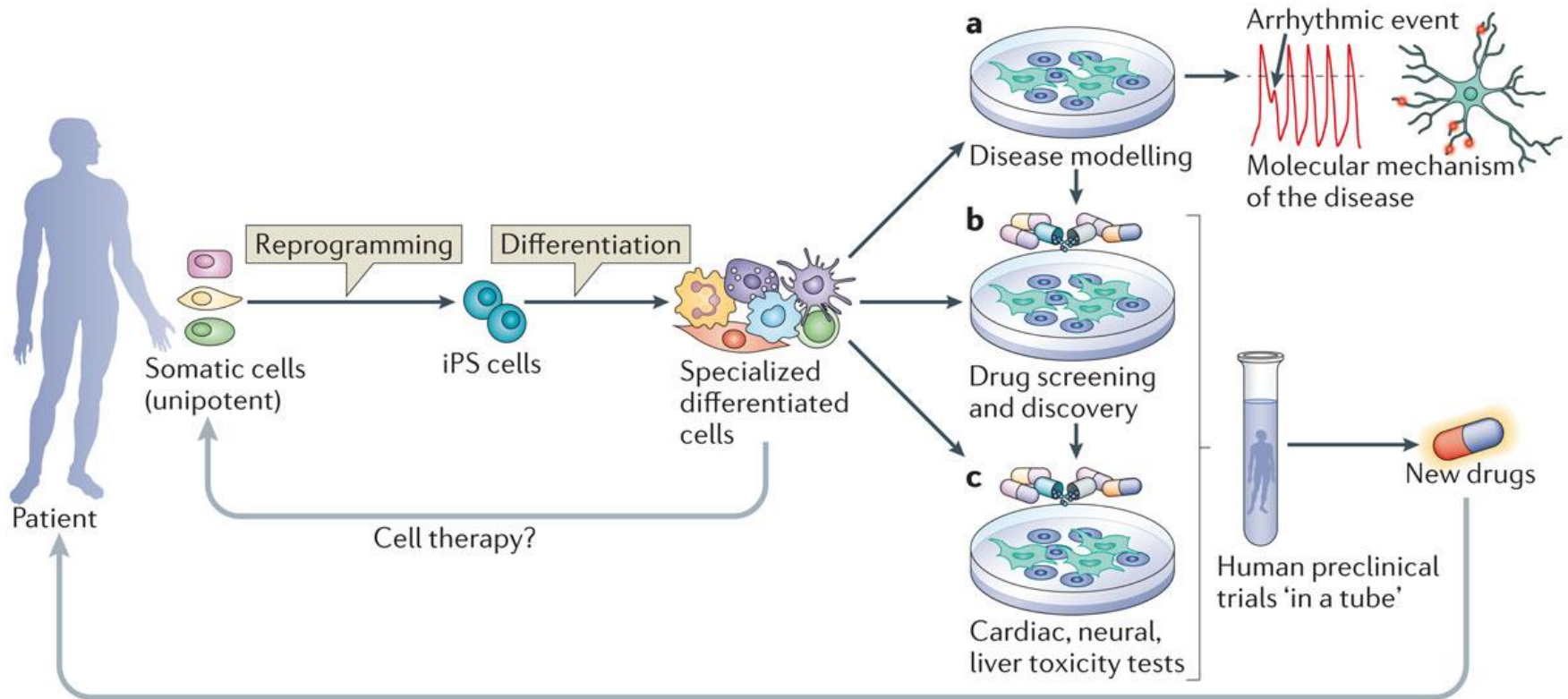
Therapeutic Cloning

1. Induce cells to develop into specific cell type that patient needs

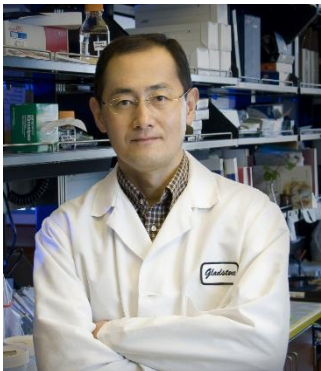
2. Make embryonic stem cell line from patient



Induced pluripotent stem (iPS) cells

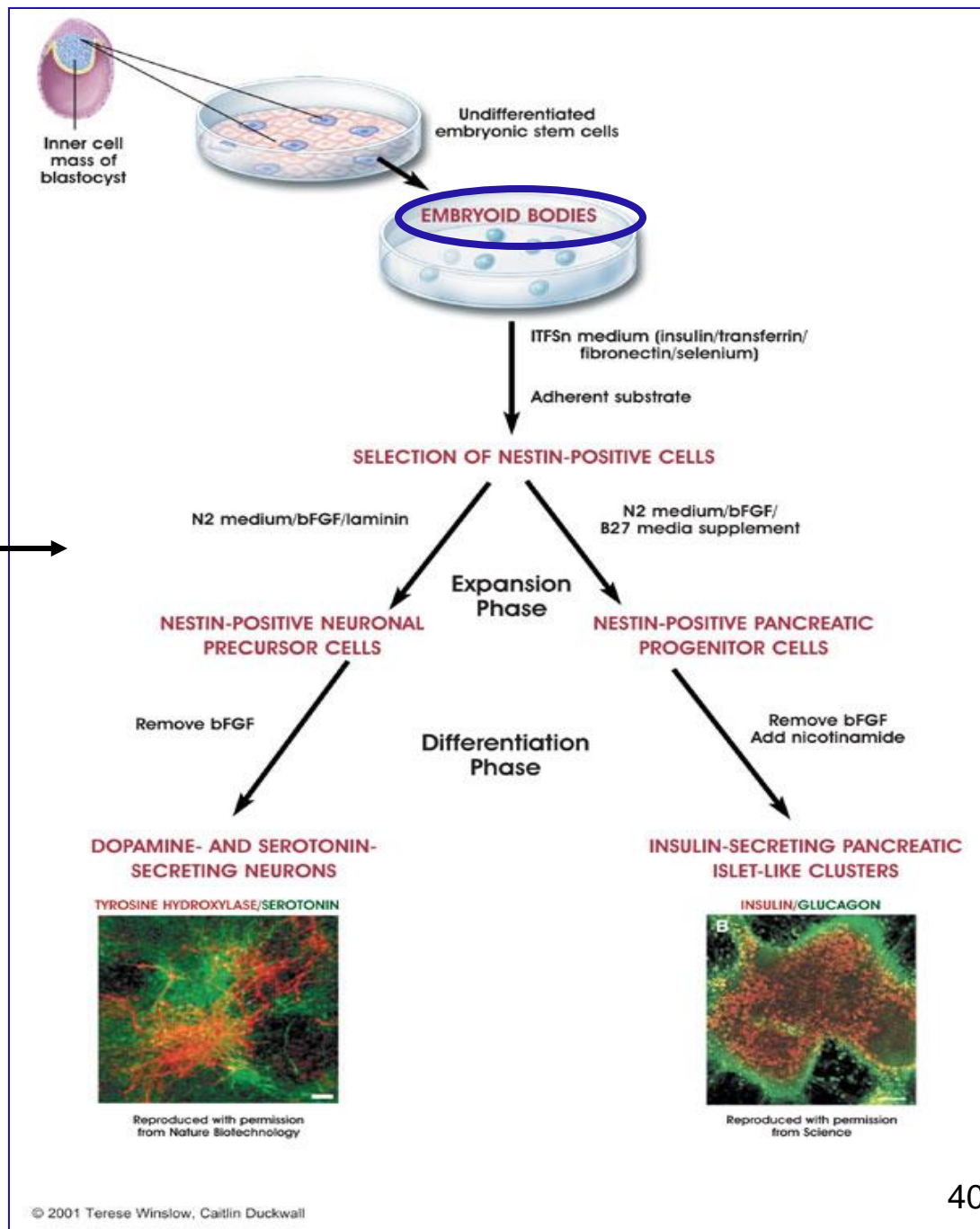


Nature Reviews | [Molecular Cell Biology](#)



Shinya Yamanaka, MD, PhD, a professor of anatomy at University of California San Francisco
2012 Nobel Prize in Physiology and Medicine “for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent.”

Trattamento di patologie come il morbo di Parkinson o il diabete.



L'importanza delle cellule staminali

L'applicazione più importante delle cellule staminali per il futuro risiede nel campo della **Medicina Rigenerativa**. Con questa branca s'intende la produzione di una grande quantità di cellule da utilizzare nelle terapie che **permettono la ricostruzione dei tessuti danneggiati** per es. nei malati di Parkinson e nell'Alzheimer, nelle ustioni, nell'infarto, nel diabete, nelle osteoartriti e nelle artriti reumatoidi o nei danni alla colonna vertebrale.

Altri USI:

- **Biotecnologie** (drug discovery & development)
- Utili per testare nuovi farmaci:
 - **Test di tossicità** di nuovi farmaci
 - **Test della funzione** di nuovi farmaci
 - **Modelli di patologie**



Possibilità di ridurre i test a livello degli animali.

STEM CELL THERAPY MARKET

Table 1 | **Stem cell therapies: selected late-stage pipeline**

Company	Product or process	Indication	Development stage
Aastrom Biosciences	Ixmyelocel-T (patient-specific autologous multicellular therapy)	Critical limb ischaemia	Phase III
Gamida Cell	StemEx (umbilical cord blood stem and progenitor cells expanded <i>ex vivo</i>)	HSCT in haematological malignancies	Phase II/III
Mesoblast	'Off-the-shelf' mesenchymal precursors	HSCT in haematological malignancies	Phase III
Osiris Therapeutics	Prochymal (adult human mesenchymal stem cells)	Crohn's disease	Phase III (three trials)
Osiris Therapeutics	Prochymal (adult human mesenchymal stem cells)	Graft versus host disease	Phase III (two trials)
Baxter Healthcare	Auto-CD34 ⁺ cells (adult autologous CD34 ⁺ cells)	Chronic myocardial ischaemia	Phase III
TiGenix	Cx601 (adipose-derived allogeneic stem cell suspension)	Complex perianal fistula	Phase III
Bioheart	MyoCell (autologous myoblasts)	Congestive heart failure	Phase II/III
Cytori Therapeutics	Adipose-derived stem and regenerative cells (two dosages)	Acute myocardial infarction	Phase II/III
Stempeutics Research	Stempeucel (adult mesenchymal stem cells)	Critical leg ischaemia	Phase II/III
Cardio3 Sciences (Belgium)	C-Cure (BM-derived stem cells treated with cardiopoietic cocktail)	Congestive heart failure	Phase III

BM, bone marrow; HSCT, haematopoietic stem cell transplantation.

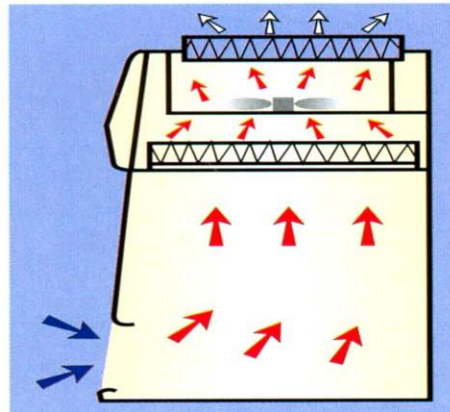
ATTREZZATURA DI UN LABORATORIO PER COLTURE CELLULARI

1

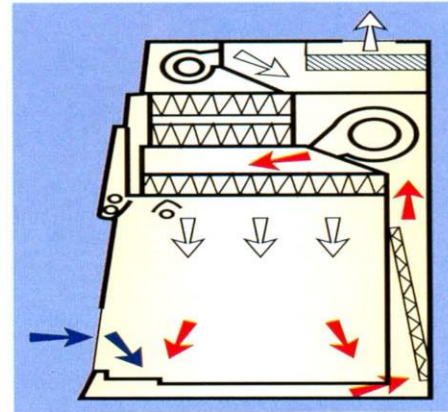
Cappa a flusso laminare



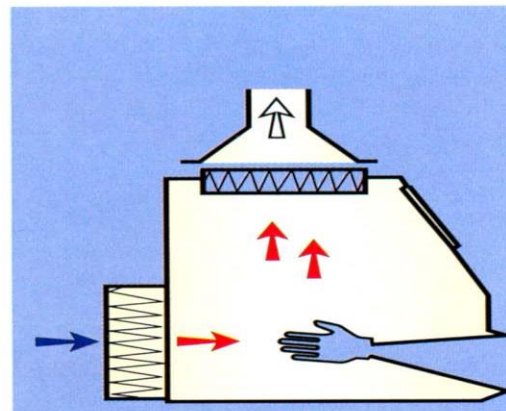
- sterilità
- riduzione del rischio per l'operatore



Class I



Class II



Class III



ESEMPIO DI CAPPA A FLUSSO LAMINARE



2

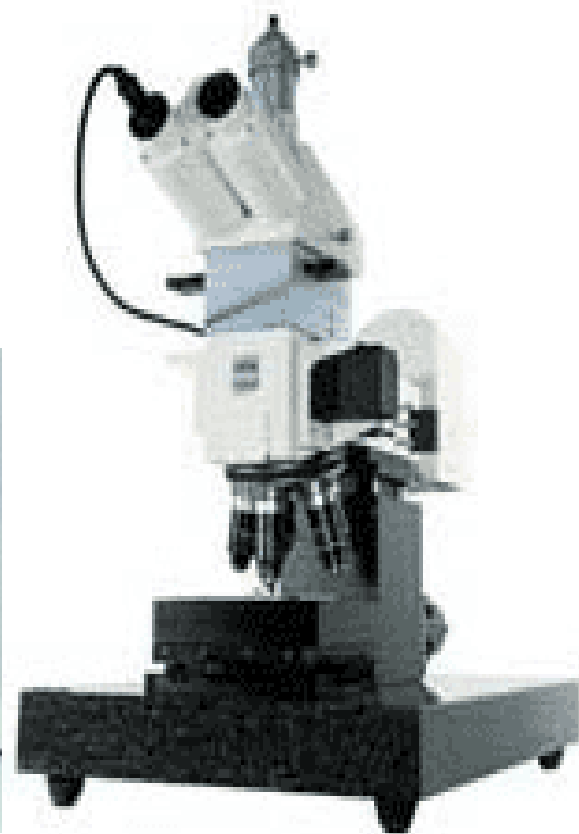
Incubatore per colture cellulari: -generalmente 37° C
- 5-10% CO₂
- appropriato livello di umidità



3

Microscopi:

- microscopio ottico rovesciato per l'osservazione della coltura senza necessità di prelievo
- Microscopio ottico bioculare per la conta cellulare e la valutazione della vitalità



4 Centrifuga per separare le cellule da un mezzo liquido



5702



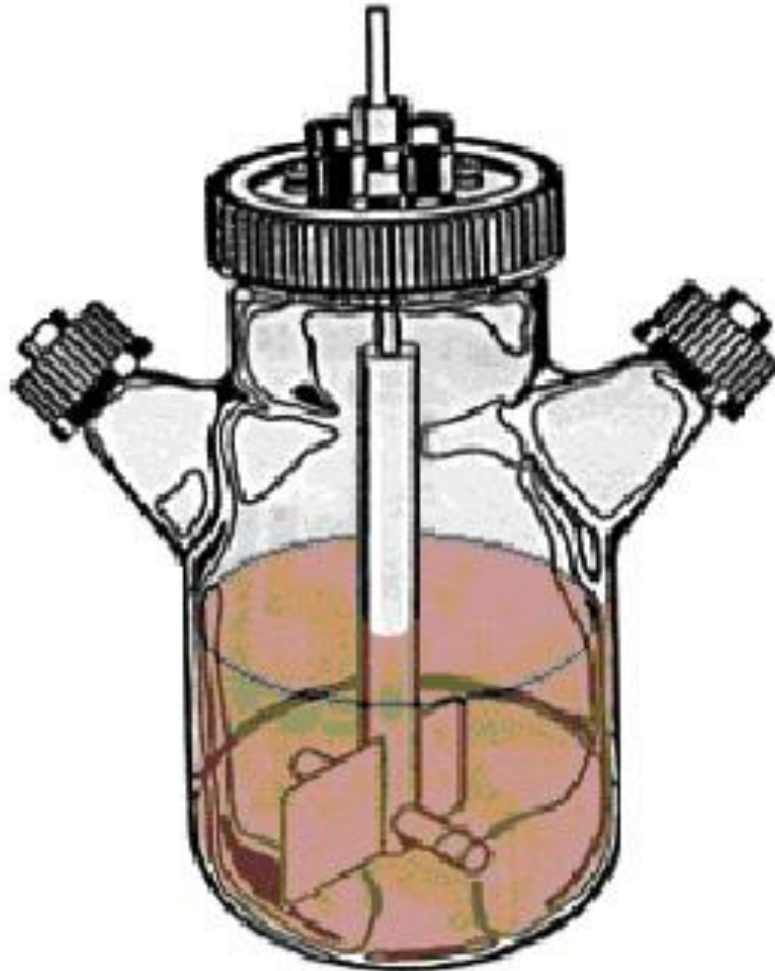
5702 R

5

Plasticheeria monouso sterile: -fiasche, piastre
-pipette, filtri, provette



BOTTIGLIE ROTANTI PER COLTURA SU LARGA SCALA DI CELLULE





Il Biostat Q è un dispositivo dotato di quattro vessel indipendenti del volume di lavoro di 800 ml, per effettuare contemporaneamente fino a quattro processi batch monitorando tutti i parametri di processo (pH, temperatura, ossigeno disciolto).

Tale dispositivo è dotato inoltre di una unità di controllo programmabile.

TERRENI (O MEDIUM) DI COLTURA CELLULARE

Rappresentano il mezzo in cui le cellule crescono *in vitro*.

COSTITUENTI PRINCIPALI:

- **Terreno base** (es. RPMI, DMEM, ISCOVE, MEM, ecc.)

I vari terreni base differiscono tra loro per il contenuto in aminoacidi e sali, e per la concentrazione di glucosio. La composizione esatta dei singoli terreni ed il tipo di terreno adatto per una data linea cellulare viene di solito specificato dalla ditta produttrice.

- **Sistema tampone**

Per la crescita, le cellule richiedono un valore di pH del mezzo compreso tra 7.2 e 7.4. Per mantenere costante tale valore di pH, si ricorre a sistemi tampone come bicarbonato/acido carbonico o ad HEPES (*N*-2-Hydroxyethylpiperazine - *N'*- 2- ethansulfonic acid), una molecola sintetica.

• **Indicatore di pH**

Il pH del medium viene monitorato aggiungendo un indicatore al mezzo di coltura, quale il rosso-fenolo (giallo a pH acido e viola a pH basici)

• **Aminoacidi vari** (es. glutamina, asparagina, arginina, ecc.)

Alcuni aminoacidi vengono aggiunti al terreno base al momento dell'uso, per evitare una possibile degradazione

• **Antibiotici** (es. streptomina, penicillina)

Gli antibiotici vengono aggiunti al terreno base per preservare la sua sterilità ed evitare contaminazioni da parte di microrganismi

• **Siero**

Normalmente il terreno base è addizionato di una percentuale (5-10%) di siero. Si preferisce utilizzare il siero fetale, perché contiene meno anticorpi che potrebbero risultare tossici per le cellule in coltura. Il siero deve essere scomplementato a 56° C.

CONTAMINAZIONE DELLE COLTURE CELLULARI

Pur operando in condizioni di sterilità, lavorando con le colture cellulari c'è sempre rischio di contaminazione da parte di:

- batteri
- funghi
- micoplasmi
- virus

Mentre la contaminazione da batteri e miceti è facilmente identificabile (provoca un intorbidimento del terreno), quella da virus e da micoplasmi è più difficile da identificare (tranne che si riscontri un effetto citopatico).

PRECAUZIONI PER LA PREVENZIONE DI CONTAMINAZIONI

- 1) I terreni e le soluzioni che si usano devono essere tutti sterili
- 2) Aggiungere penicillina-streptomina per scongiurare il pericolo di contaminazioni da batteri; anfotericina B (se non tossica per le cellule) contro i miceti
- 3) Destinare il laboratorio solo alle colture cellulari
- 4) Operare sempre sotto cappa a flusso laminare
- 5) Utilizzare solo materiale sterile (di vetro o di plastica)
- 6) Utilizzare sempre pipettatori elettrici
- 7) Pulire bene la cappa a inizio e fine lavoro
- 8) Controllare periodicamente i filtri della cappa
- 9) Mantenere con attenzione ben pulito l'incubatore a 37° C (pericolo miceti)

CONSERVAZIONE DELLE CELLULE IN AZOTO LIQUIDO

E' un metodo di conservazione delle cellule per evitare di mantenere in coltura molte linee cellulari allo stesso tempo, allo scopo di ridurre:

- Rischio di contaminazioni microbiche
- Rischio di cross-contaminazione
- Rischio di variazioni genetiche e morfologiche
- I costi



CONSERVAZIONE IN AZOTO LIQUIDO (-196° C)

Il congelamento in azoto liquido mantiene le cellule vive in completa quiescenza per anni. Tramite congelamento, quindi, si può costituire uno stock di cellule che mantengono le caratteristiche fisiologiche e biochimiche delle cellule di partenza.

CONGELAMENTO DI COLTURE CELLULARI

• ACCORGIMENTI :

- ✓ Le colture devono avere una vitalità >90%
- ✓ Le colture devono essere in fase log di crescita
- ✓ Contaminazione microbica assente
- ✓ Utilizzo di un crioprotettore (es. DMSO) che protegge la cellula da un'eventuale rottura causata dalla formazione di cristalli di ghiaccio

CONGELAMENTO IN BANCA D'AZOTO

CONGELAMENTO GRADUALE

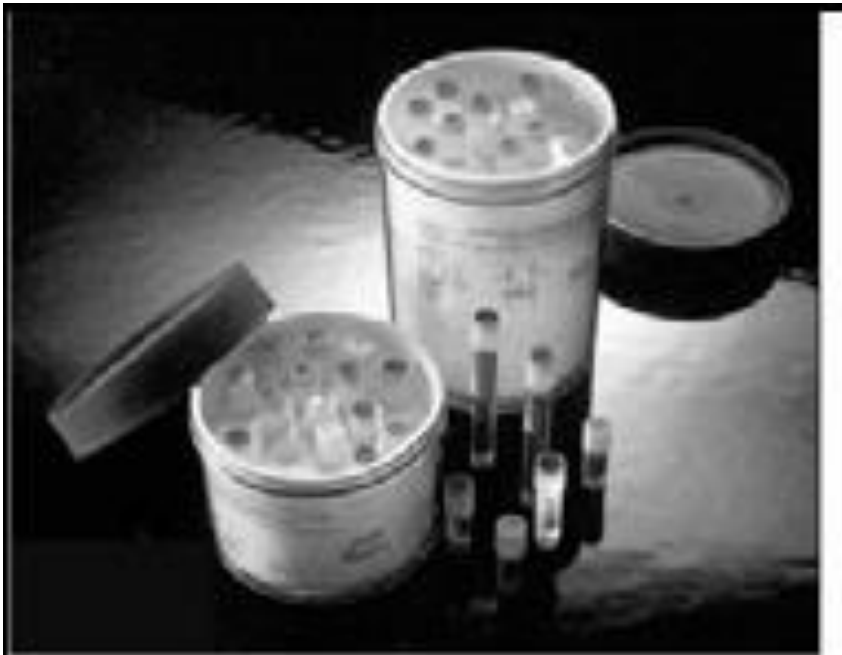


Fig. 1- Contenitore pieno di alcool isopropilico per il congelamento graduale delle cellule. (International pbi).



CAMPI DI APPLICAZIONE DELLE COLTURE CELLULARI

- Test di citotossicità
- Produzione di proteine ricombinanti (ormoni, fattori di crescita) e di anticorpi monoclonali.
- Caratterizzazione di tumori
- Diagnosi cliniche (anche prenatali) cariologiche
- Analisi dei mutanti, mappaggio, trasfezione con DNA esogeno.
- Analisi dell'espressione genica
- Controllo della crescita e del metabolismo, analisi del differenziamento

Sperimentazione *ex vivo*: gli organi isolati

Isolamento dell'organo

- Da animali da laboratorio sani o da animali con patologie spontanee o indotte chirurgicamente o farmacologicamente
- Dall'uomo come "by products" di procedure chirurgiche o mediante la rapida acquisizione post-mortem

Vantaggi

- Eliminazione delle variazioni delle influenze circolatorie ed ormonali.
- Mantenimento della divisione fisiologica in compartimenti del tessuto (il vascolare, l'interstiziale, l'intracellulare).

Applicazioni

- Identificazione del tipo e dell'ordine di grandezza di risposta che si ha per una sostanza sconosciuta
- Quantificazione dell'effetto farmacologico di una sostanza
- Previsione di un possibile effetto terapeutico

Cosa serve nella sperimentazione su organi isolati

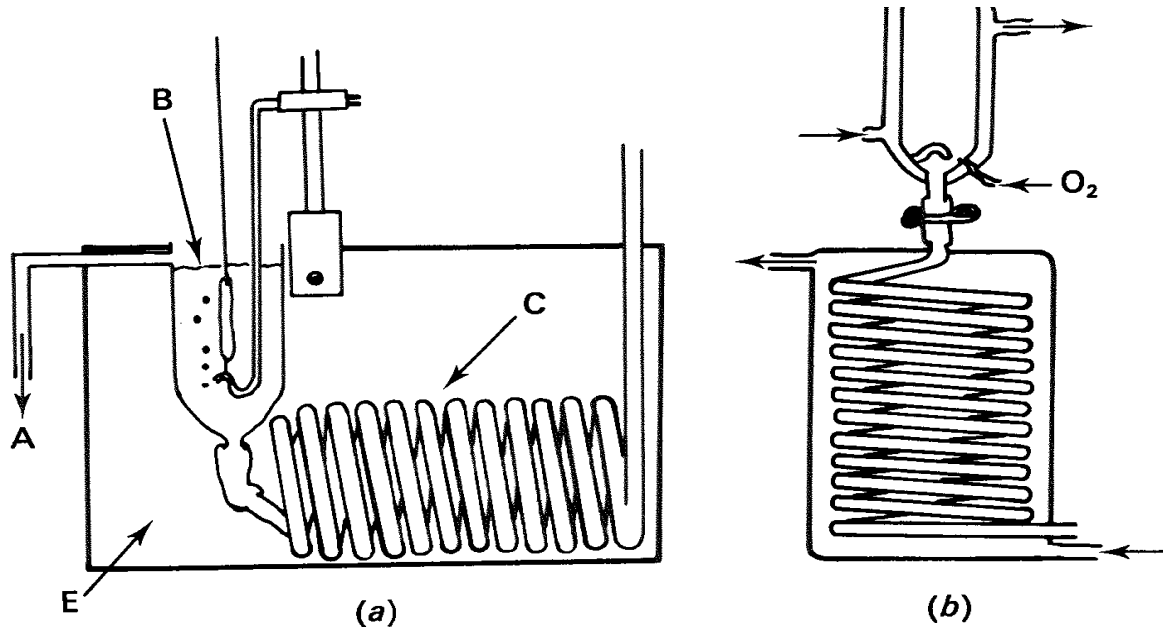
Soluzioni saline fisiologiche: soluzioni a diversa composizione ionica contenenti una fonte energetica (glucosio, lattato, ecc), tamponi (bicarbonato, fosfati), sostanze osmolari (destrano, BSA, sangue completo). Es: Soluzione di Krebs, di Tyrode, di Reiter, di De Jalon.

TABELLA 2. Composizione delle soluzioni fisiologiche menzionate nel testo

Peso molecolare	Sostanze	Ringer-rana g/l	Krebs-bicarbonato		Tyrode		Ringer-Locke g/l	De Jalon g/l	
			g/l	millimolare	g/l	millimolare			
58,45	NaCl	6	6,9	118	8	136,8	9	9	
74,56	KCl	0,3	0,35	4,75	0,2	2,95	0,42	0,42	
110,99	CaCl ₂	0,12	0,28	2,50	0,2	1,80	0,24	0,03	
246,49	MgSO ₄ · 7H ₂ O	—	0,29	1,19	0,26	1,05	—	—	
119,98	NaH ₂ PO ₄	—	—	—	0,05	0,41	—	—	
136,09	KH ₂ PO ₄	—	0,16	1,19	—	—	—	—	
84,01	NaHCO ₃	0,4	2,1	25	1	11,9	0,5	0,5	
180,15	Glucosio	1	2,08	11,5	1	5,5	2	0,5	
Ossigenazione		aria	O ₂ + CO ₂	5%	O ₂		O ₂	O ₂	
		Tessuti di anfibi	Arterie di ratto, coniglio; atri e cuore alla Langendorff		Intestino di cavia; ratto, coniglio		Atri di cavia, ratto, coniglio; cuore alla Langendorff		Utero di ratto

Temperatura: è una variabile fisiologica ed influenza notevolmente sia la risposta basale del tessuto sia la responsività ai farmaci.

Es. l'utero di ratta a $37^{\circ} C$ presenta delle contrazioni spontanee irregolari e perciò non può essere utilizzato a questa temperatura ma abbassando la temperatura le contrazioni scompaiono. Gli organi di animali a sangue freddo (rana) non hanno bisogno di termostato.



Aereazione: Generalmente per ossigenare l'organo si usa una miscela di gas che viene indicata con il termine carbogeno (95% di O₂ + 5% di CO₂). Non può essere usato O₂ al 100% in quanto è tossico per i tessuti.

Apparato di registrazione: Il tessuto nel bagnetto è collegato ad un apparecchio leva che viene chiamato TRASDUTTORE. Tramite il trasduttore si rileva la reattività del tessuto. Esistono trasduttori isotonici e isometrici.

TRASDUTTORI ISOTONICI

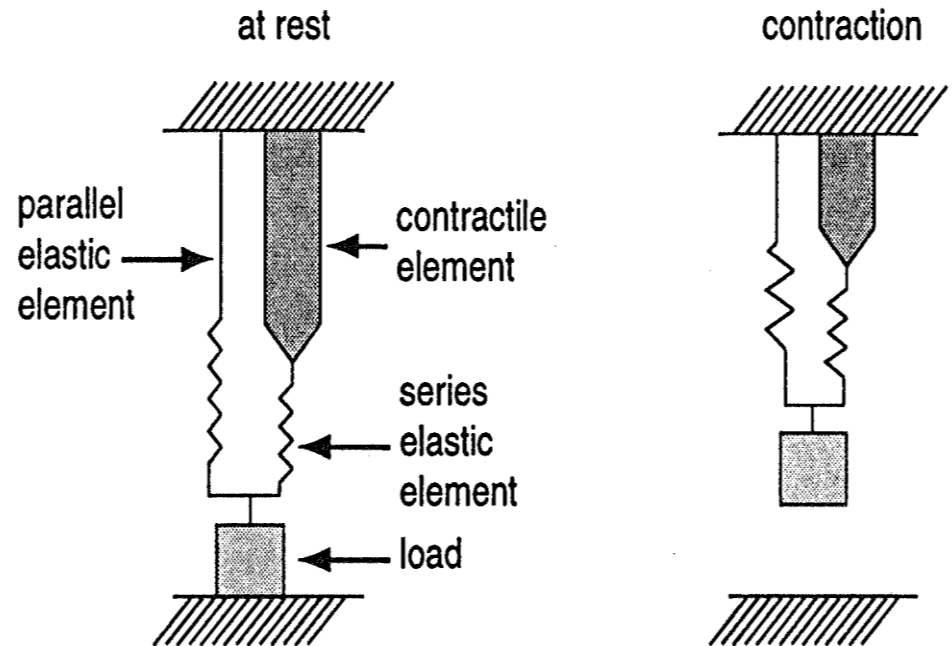
TRASDUTTORI ISOMETRICI



TRASDUTTORE ISOTONICO

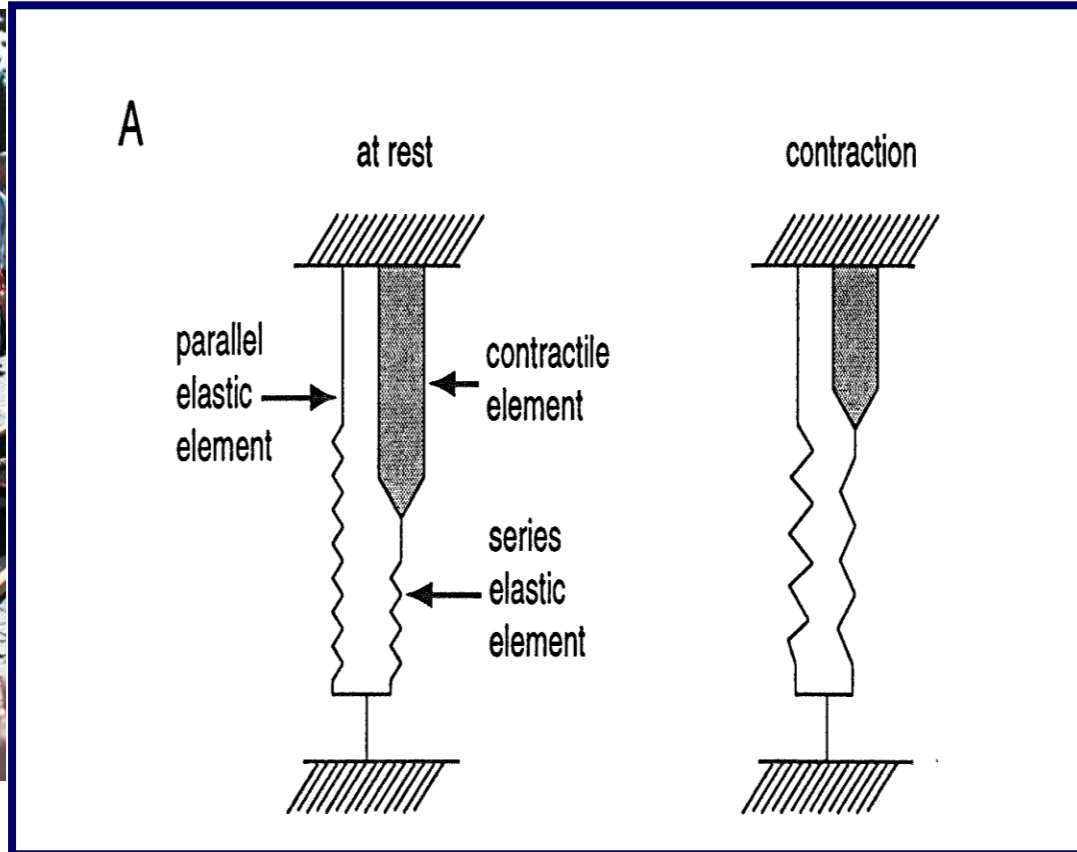
Costituito da una leva mobile che trasmette al registratore uno spostamento la cui ampiezza è proporzionale alla contrazione del tessuto.

B



TRASDUTTORE ISOMETRICO

Costituito da una leva imperniata alla quale è fissato l'organo, che non varia di misura o di lunghezza. La leva trasmette al registratore la forza che esercita il tessuto quando giunge lo stimolo.



PREPARATI DI MUSCOLATURA LISCIA

Muscolatura liscia intestinale

Tessuto ricco di recettori che rispondono a diversi neurotrasmettitori.

Ileo di cavia: recettori per ACh, 5-HT, oppioidi.

Digiuno di coniglio: spontanea contrazione basale a causa della liberazione di molti neurotrasmettitori, utilizzato per lo studio di farmaci antispasmodici.

Colon di ratto

Muscolatura liscia vascolare

Per preparazioni vascolari l'animale va sempre dissanguato.

Striscia di aorta di coniglio: utilizzato per lo studio di farmaci vasodilatatori o vasocostrittori.

Altri preparati di muscolatura liscia

Striscia del fondo di stomaco di ratto

Utero di ratto: questo tessuto è molto sensibile alla contrazione da Ach e da bradichinina

Anelli di trachea di cavia: utilizzato per saggiare sostanze broncodilatatrici, previa broncocostrizione con Hist, Ach, LTD4.

Dotto deferente di cavia

PREPARATI DI MUSCOLATURA SCHELETRICA

Diaframma nervo frenico di ratto: il diaframma è un muscolo striato volontario che si alza e si abbassa per mezzo del nervo frenico, durante la respirazione. Utilizzato per scoprire l'azione dell' α -tubercolina come bloccante dei recettori H_2 a livello della placca neuromotrice.

Muscolo addominale retto di rana: utilizzato per testare sostanze Ach simili

Muscolo dorsale di sanguisuga: è il preparato biologico in assoluto più sensibile all'Ach. Si possono dosare quantità piccole di Ach, dell'ordine di ng o pg.

PREPARAZIONI DI MUSCOLATURA CARDIACA

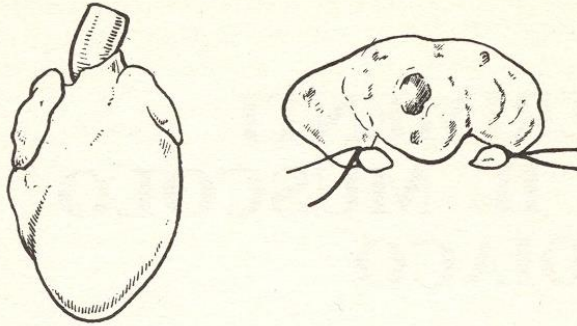
1. Preparati che utilizzano il cuore *in toto*

Cuore isolato e perfuso alla Langendorff: utilizzato per lo studio di sostanze cardiotoniche e coronarodilatatrici

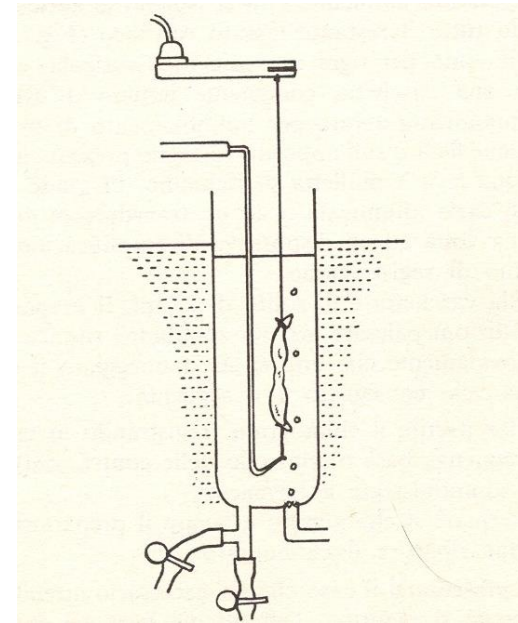
2. Preparati che utilizzano porzioni di muscolo cardiaco: utilizzati per saggiare farmaci antiaritmici

- a) atri
- b) strips di ventricolo
- c) muscolo papillare

ATRI DI CAVIA ISOLATI



Il cuore viene asportato dopo di che si taglia via quanto più possibile la componente ventricolare. Si pongono quindi le auricole in una capsula di Petri contenente liquido di Ringer-Locke a temperatura ambiente. Sulle due estremità delle auricole si fissano due fili. (In questo momento il tessuto non dovrebbe contrarsi per cui l'operazione sarà anche abbastanza facile). Si trasporta quindi il preparato nel suo alloggiamento definitivo nella vaschetta di sospensione dove esso riprenderà a contrarsi spontaneamente.



MUSCOLO PAPILLARE

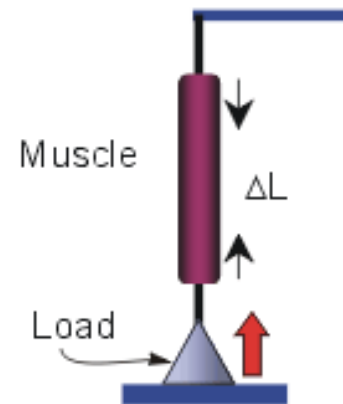
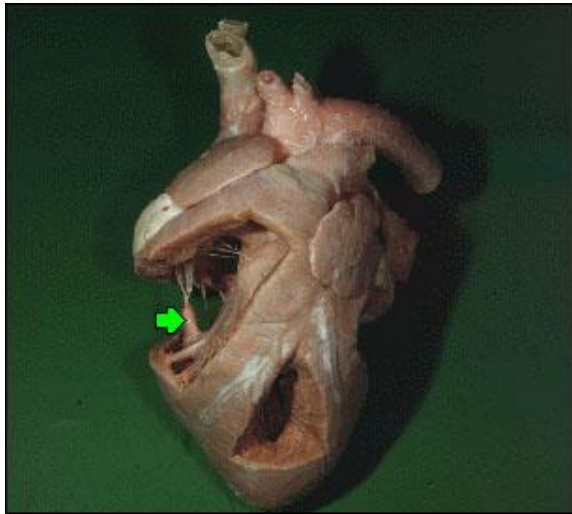


Figure 1. In vitro measurement of isotonic contractions.