



I test *in vitro* nella tossicologia ambientale

Maria Carrara

**Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia
Università degli Studi di Padova**

**Incenerimento e Qualità dell'aria
Bolzano 24 ottobre 2011**

Health effects of pollution

Air pollution



Headache
Fatigue

Water pollution



Respiratory
illness

Bacteria
Parasites
Chemicals

Soil contamination



CO
Particulate matter
Ozone
SO₂
NO_x
Volatile organic compounds
Nerve damage
Lead

Cardio-vascular
illness

Gastroenteritis

Pesticides

Cancer risk

Nausea

Skin irritation

Tratto respiratorio



Caratteristiche chimico-fisiche



**Molto solubili: SO_x; ammoniaca
formaldeide**

Bassa solubilità: NO₂; ozono

Insolubili: CO

Caratteristiche chimico-fisiche



PM10



$5 \mu\text{m} < \text{diametro} < 10 \mu\text{m}$

$1 \mu\text{m} < \text{diametro} < 5 \mu\text{m}$

$\text{diametro} < 1 \mu\text{m}$

Valutazione della tossicità inalatoria

Modelli animali

Linee guida

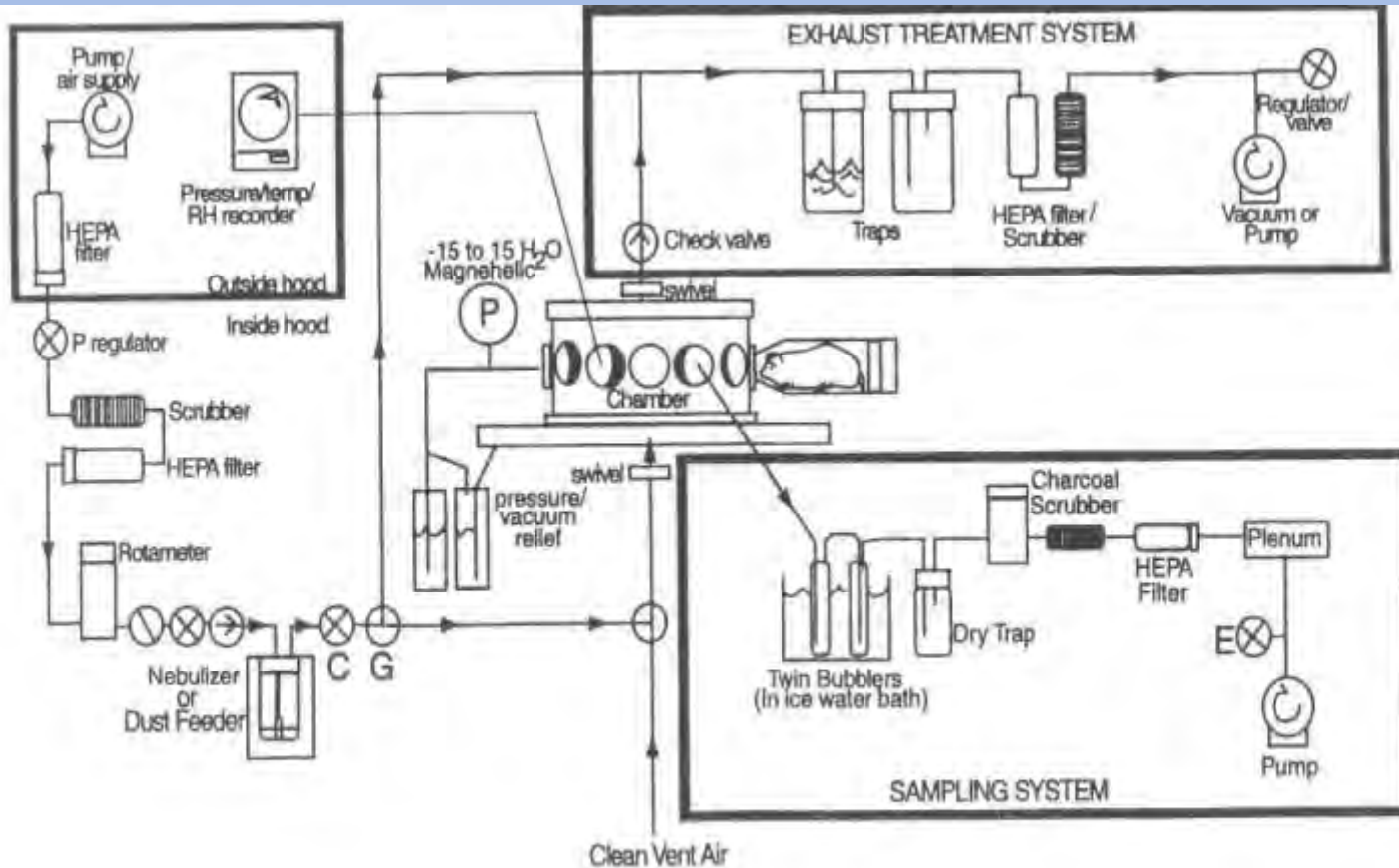
- per tossicità acuta (OECD 403)
- per tossicità ripetute (OECD 412)
- per tossicità sub cronica (OECD 413)



Numerose criticità

1. Scelta dell'animale
2. Produzione e mantenimento di elevati volumi
3. Sistemi di esposizione particolarmente complessi
4. Necessità di ridurre il numero di animali

Sistema di esposizione



TOSSICOLOGIA *IN VITRO*

Test in vitro

European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)

Prima fase

- 1. valutazione delle caratteristiche fisico-chimiche**
- 2. test in vitro preliminare**

Seconda fase

- Valutazione su:**
- 1. cellule dell'epitelio olfattorio;**
 - 2. cellule dell'epitelio respiratorio**
 - 3. cellule di tipo II**
 - 4. macrofagi alveolari**
 - 5. cellule dell'endotelio vascolare**
 - 6. fibroblasti e cellule mesoteliali**

**Endpoints: sempre vitalità cellulare;
almeno due tipi di cellule**

Tecniche *in vitro* per studiare la tossicità delle sostanze presenti nell'aria

Tecniche di esposizione indiretta

Tecniche di esposizione diretta

- immersione**
- intermittente**
- continua**

Tecniche *in vitro* per studiare la tossicità delle sostanze presenti nell'aria

Tecniche di esposizione indiretta

alla sostanza chimica
come tale

cellule esposte alla
sostanza solubilizzata
o sospesa nel medium

campione di aria

cellule esposte a
campioni raccolti
per filtrazione

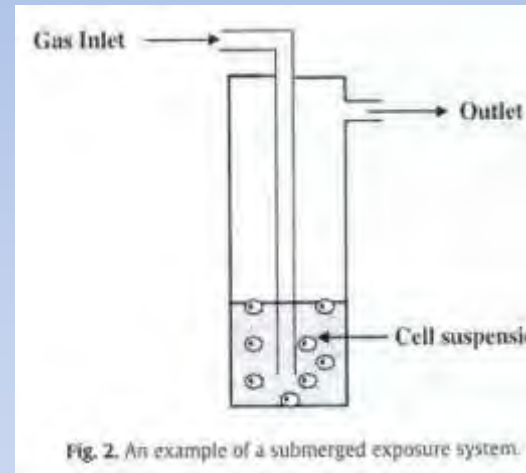
Svantaggi

- Materiale insolubile
- Dimensione delle particelle

Tecniche *in vitro* per studiare la tossicità delle sostanze presenti nell'aria

Tecniche di esposizione diretta

Esposizione per immersione



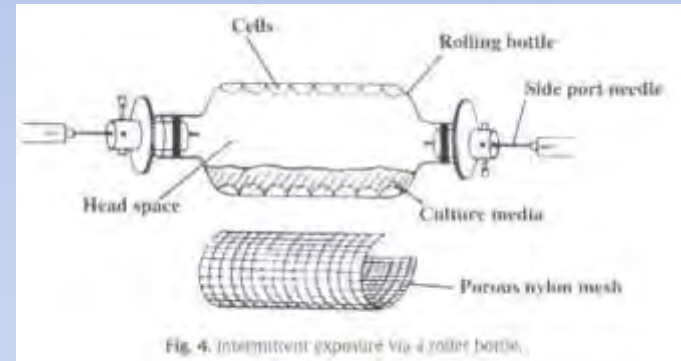
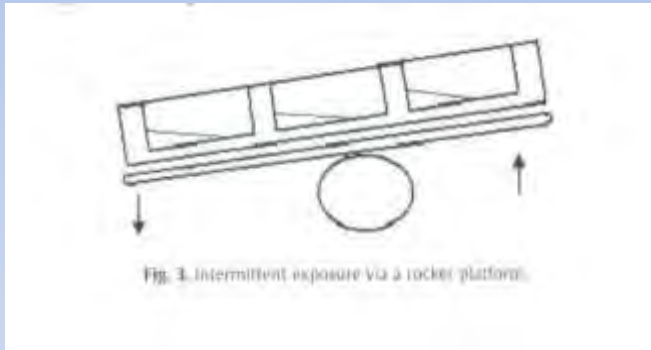
Svantaggi

- Scarsi contatti cellule-gas

Tecniche *in vitro* per studiare la tossicità delle sostanze presenti nell'aria

Tecniche di esposizione diretta

Esposizione intermittente



Vantaggi

- ampio contatto cellule-gas

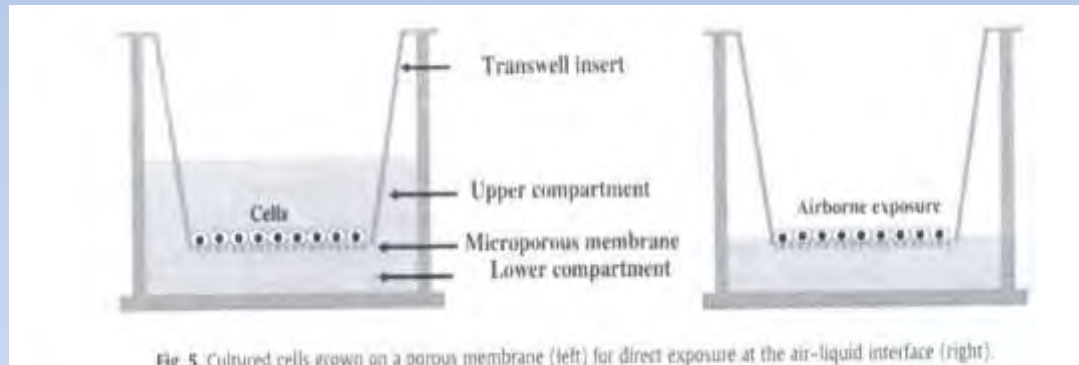
Svantaggi

- movimenti del medium possono influenzare accuratezza e riproducibilità

Tecniche *in vitro* per studiare la tossicità delle sostanze presenti nell'aria

Tecniche di esposizione diretta

Esposizione continua



Vantaggi

- esposizione continua

Svantaggi

- scarso contatto cellule gas

«**MucilAir™** tissues can be kept in culture for more than 12 months, allowing long-term and/or repeat toxicity and efficacy studies *in vitro*»

Epithelix has developed, provides and sells unique and robust 3D Human Airway Epithelia reconstituted *in vitro* (**MucilAir™**) :

- Made of **primary human respiratory cells**
- Cultured at **air-liquid interface**
- **Mimics the *in vivo* tissue** of the human respiratory epithelium :
 - Basal, goblet, ciliated cells, mucus
 - Cilia beating
 - Tight junctions
 - Active ion transport
 - Metabolic activity / detoxification (CYP450)
 - Cytokine / chemokine / metalloproteinase release, etc.
- Remains fully differentiated and functional for **more than one year**
- **Several pathologies available** (Asthma, COPD, Smoker, Allergic Rhinitis, CF, etc.)
- Very high batch to batch **reproducibility**
- **Ready and easy to use**
- **Worldwide shipping** (EU / US / Asia-Pacific)
- **Quality control** performed on every tissue produced
- **No delivery delay** - Continuous Production

Others Respiratory Products available :

- Low Passage Primary Human Cells of Nasal or Bronchial Origin
- Culture Media
- Cells & Tissues Extracts (RNA, Mucin, Protein Lysate)
- etc...

Advantage of MucilAir™

1. They are composed of basal cells, ciliated cells and mucus cells. The proportion of these various cell types is preserved compared to what one observes *in vivo*. Moreover, contrary to the majority of the other models developed and used to date, the reconstituted epithelia are started from de-differentiated cells. The cells undergo a progressive differentiation with time. The first ciliated cells are visible after 20 days of interface with the air. The epithelia are completely differentiated after 1.5 months of culture (Figure 1).



1.5 month of culturing

- Appearing of ciliated, mucus and basal cells
- Establishment of absorption / secretion properties
- Stabilisation of electrophysiological properties



Mucil Air™ with several pathologies are available:

- ✓ Normal
- ✓ Smoker
- ✓ Allergic Rhinitis
- ✓ Asthma
- ✓ COPD
- ✓ Cystic Fibrosis

Conclusioni

Sviluppo, standardizzazione e validazione di test *in vitro* riproducibili possono:

- **giocare un ruolo significativo nella valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche**
- **contribuire a meglio comprendere le interazioni tra esposizione ed effetto tossico a livello cellulare.**



supporti per la valutazione del rischio di esposizione per inalazione