



UNIVERSITA' POLITECNICO DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL' AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

La spettroscopia vibrazionale come strumento per studiare l'interazione farmaco-cellula: un nuovo approccio per lo sviluppo di farmaci innovativi

Vibrational spectroscopy as a tool for studying drug-cell interaction: Could high throughput vibrational spectroscopic screening improve drug development?

Tesi di laurea di
Ilaria Magrini Alunno

Docente referente
Chiar.mo Prof.
Elisabetta Giorgini

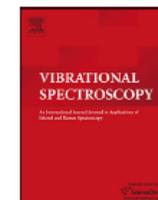
Sessione Straordinaria Febbraio 2020
A. A. 2018/2019



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Vibrational Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vibspec



Vibrational spectroscopy as a tool for studying drug-cell interaction:
Could high throughput vibrational spectroscopic screening improve
drug development?



Lauren E. Jamieson^{a,*}, Hugh J. Byrne^b

^a Centre for Molecular Nanometrology, WestCHEM, Department of Pure and Applied Chemistry, Technology and Innovation Centre, University of Strathclyde,
99 George Street, Glasgow, G1 1RD, United Kingdom

^b FOCAS Research Institute, Dublin Institute of Technology, Kevin Street, Dublin 8, Ireland

Abstract

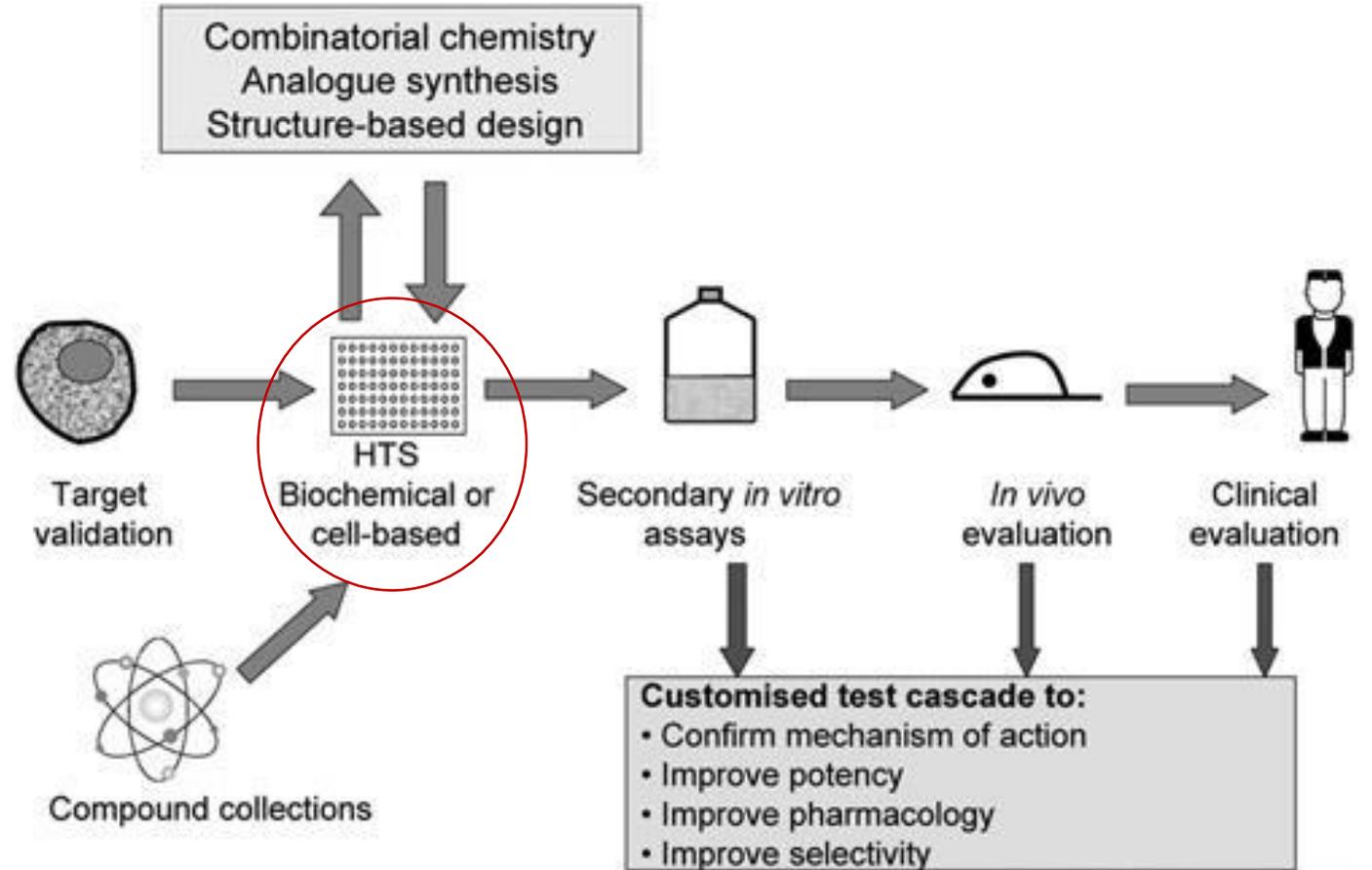
Nell'articolo preso in esame è proposto un impiego della spettroscopia vibrazionale nello studio della interazione farmaco-cellula, sfruttando la capacità di questa tecnica di rilevare cambiamenti biochimici all'interno della cellula in risposta alla azione di farmaci. In particolar modo la spettroscopia vibrazionale a infrarossi e la spettroscopia Raman trovano impiego nel processo di screening ad alta velocità (HTS) con la capacità di fornire informazioni aggiuntive oltre l'interazione farmaco - cellula, riguardante la possibile modalità d'azione, effetti collaterali e citotossici.

Nello specifico verranno messe a confronto le tecniche attuali di HTS basate su saggi a fluorescenza con le tecniche di spettroscopia vibrazionale infrarossa e Raman, sottolineandone i limiti ma anche gli aspetti innovativi che queste metodologie possono apportare, al fine di velocizzare i tempi di scoperta e produzione farmaceutica.

Introduzione

Le parole chiavi delle tecniche di HTS sono:

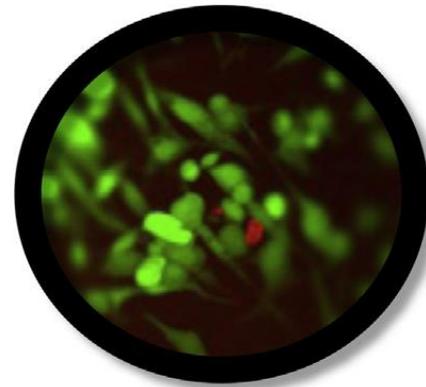
1. Efficacia
2. Velocità
3. Semplicità
4. Economicità



Screening a alta velocità attuali

Prevede l'uso di tecniche basate sulla **fluorescenza**, con saggi sviluppati per individuare specifici legami, pathways o fenotipi.

Limiti



Fluorescence

'ON'/'OFF'

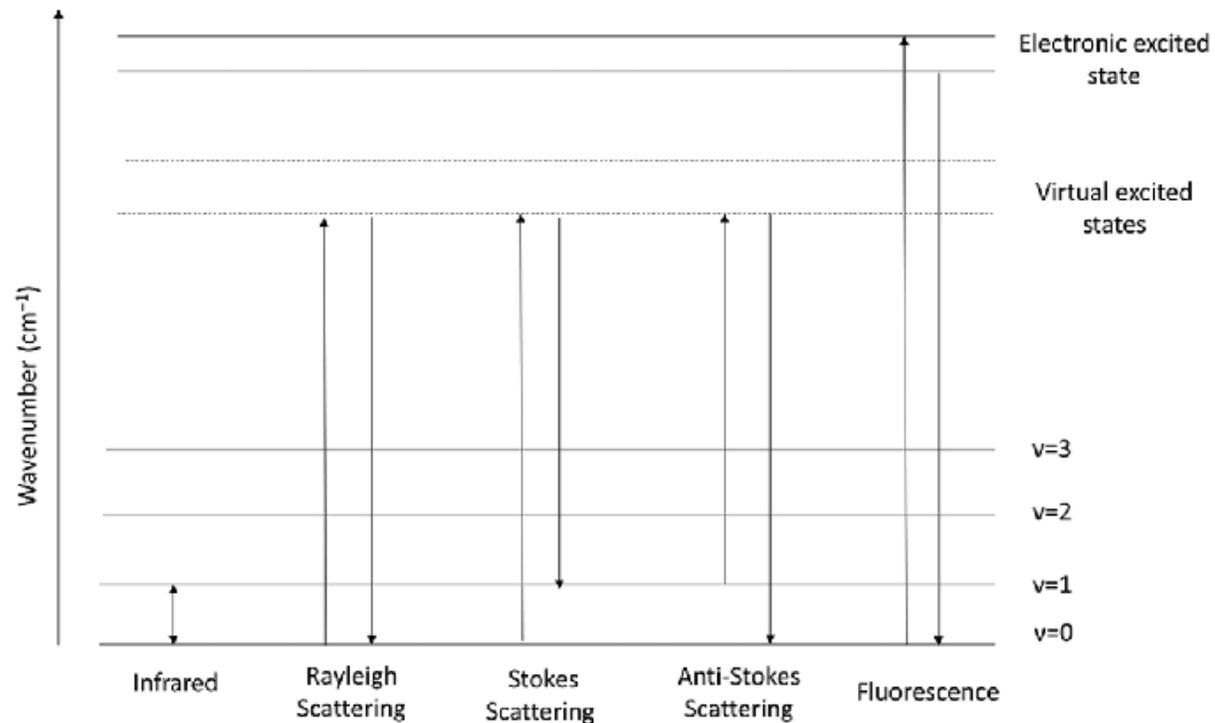
Univariate

Photobleaching

Invasive

Single interaction probed

Analisi vibrazionale

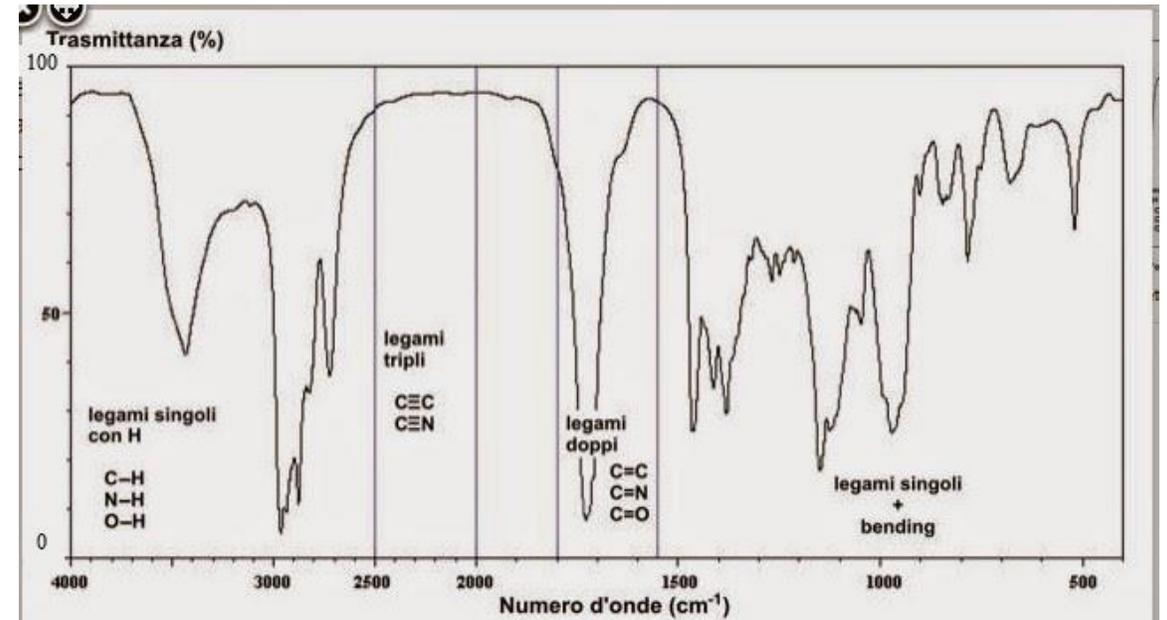


Prevede l'acquisizione di **spettri IR e Raman** di campioni trattati con molecole biologicamente attive. Permette di **valutare la composizione biochimica** delle cellule anche a livello dei singoli compartimenti a seguito del trattamento citotossico.

Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIR)

E' una tecnica vibrazionale che analizza l'interazione della radiazione elettromagnetica nel campo dell'infrarosso con i legami chimici. Permette quindi di **individuare i gruppi funzionali** presenti in un composto.

Nel caso di colture cellulari sottoposte a trattamenti farmacologici, fornisce in una sola acquisizione, informazioni specifiche sulla **cinetica e sul meccanismo di azione** del farmaco, e sui **pathways metabolici attivati**.



Tipologia di analisi

- *In Trasmissione*

PROBLEMA:
costo dei
substrati ottici

SOLUZIONE:
Impiego di substrati
riutilizzabili

- *Transflettanza*

PROBLEMA:
Mie scattering

SOLUZIONE:
Algoritmi di correzione

- *Riflettanza totale attenuata (ATR)*

è la tecnica con il
miglior rapporto
segnale/rumore e la
più rapida

Limiti della spettroscopia FTIR nello studio della interazione farmaco - cellula

- Interferenza dell'acqua
- Mie scattering
- Richiede una minima preparazione del campione
- Complessa procedura di analisi dei dati

Interferenza dell'acqua

Uno dei principali problemi della spettroscopia vibrazionale infrarossa è che l'acqua ha una elevata assorbanza



Quindi lo spettro della molecola d'acqua copre quello del campione



problema per i campioni biologici acquosi

Soluzione:

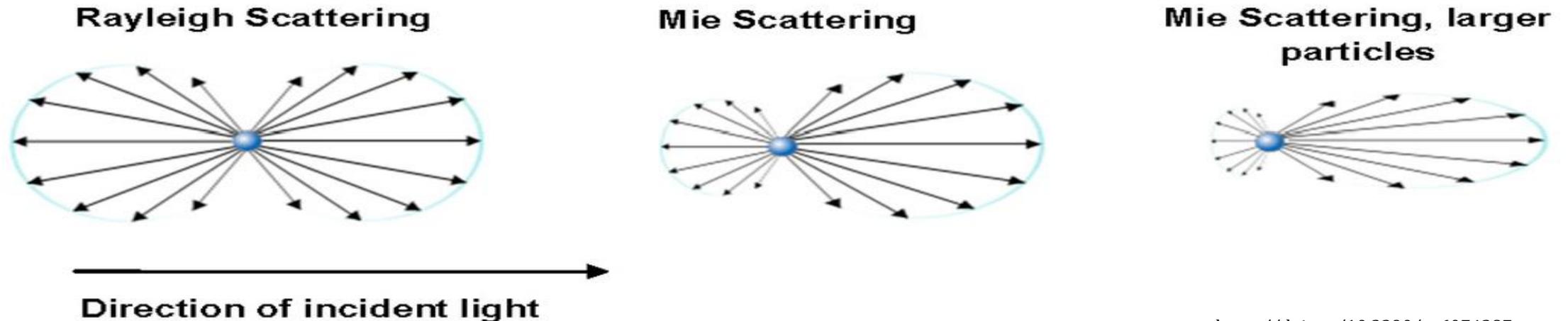
- Utilizzo di microfluidic device
- Utilizzo di algoritmi di correzione

Mie scattering

È un fenomeno di scattering che si verifica quando l'onda vibrazionale della luce è vicina alle dimensioni del campione.

Crea distorsioni a livello dello spettro che a loro volta:

- I. Possono provocare problemi durante l'analisi del campione
- II. Possono fornire informazioni sulle caratteristiche morfologiche della cellula



I. Provocare problemi durante l'analisi del campione

Effetto importante quando si sta considerando una eventuale risposta chimica all'azione di un farmaco candidato.

I farmaci agiscono spesso modificando la morfologia oppure la chimica della cellula

i cambiamenti morfologici potrebbero comportare cambiamenti nel contributo dello Mie scattering

quest'ultimo potrebbe essere la causa degli effettivi cambiamenti nello spettro

Soluzione: utilizzo di algoritmi di correzione

II. Può fornire informazioni sulle caratteristiche morfologiche della cellula potenzialmente impiegabili nella spettroscopia discriminativa.

A livello del nucleo si ha il maggior effetto di scattering di Mie



I farmaci possono agire inducendo l'apoptosi cellulare



causa forti cambiamenti morfologici del nucleo



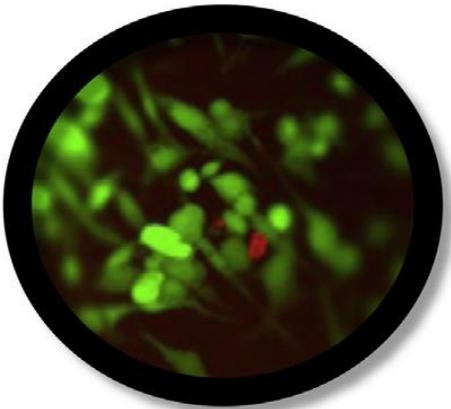
possono avere un effetto significativo sul contributo del Mie scattering.



potenzialmente impiegabile nella spettroscopia discriminativa.

Vantaggi della spettroscopia FTIR

nello studio della interazione farmaco - cellula



Fluorescence

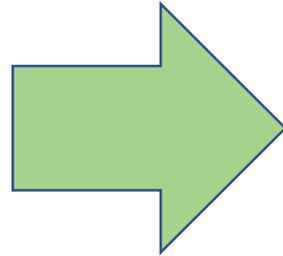
'ON'/'OFF'

Univariate

Photobleaching

Invasive

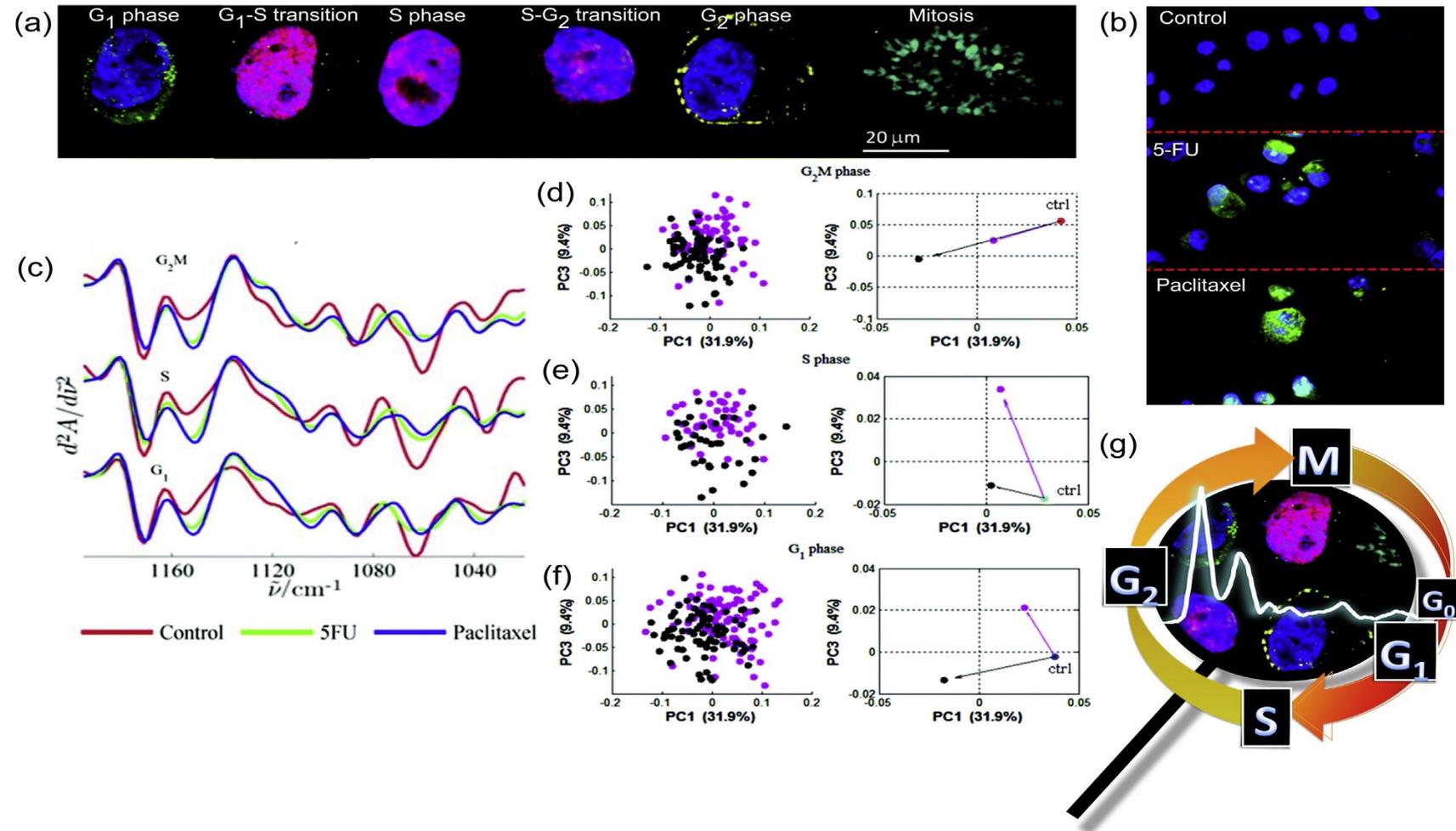
Single interaction probed



- Permette di ottenere informazioni sul meccanismo di azione
- Analisi multivariata
- Metodica label free
- Capacità di distinguere il ciclo cellulare in coniugazione con la risposta al composto farmacologico

Capacità di distinguere il ciclo cellulare in coniugazione con la risposta al composto farmacologico

Studio di Derenne et al. sugli effetti del ciclo cellulare sulle cellule PC-3 del cancro alla prostata in risposta ad un farmaco anticancro.

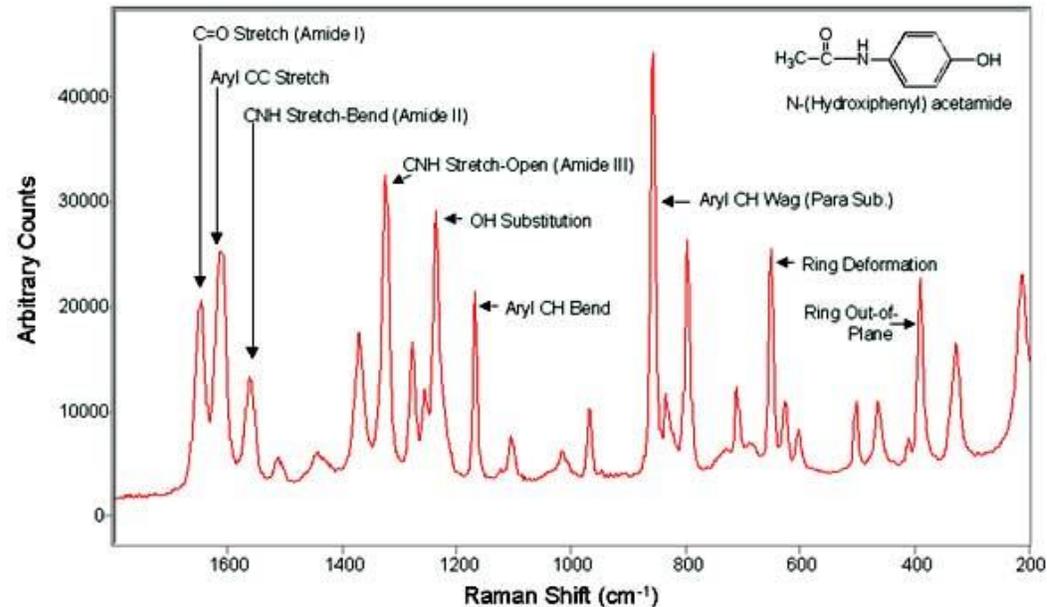


Spettroscopia Raman

per lo studio dell'interazione farmaco - cellula

Tecnica di analisi dei materiali basata **sul fenomeno di scattering** di una radiazione elettromagnetica monocromatica da parte del campione analizzato.

In particolare la radiazione risente della nuvola elettronica polarizzabile e per tanto permette **l'individuazione di legami apolari**.



Limiti della spettroscopia Raman

nello studio della interazione farmaco - cellula

- **Bassa intensità** di segnale con tempi di acquisizione molto lunghi
- **Suscettibilità** al foto danneggiamento e fluorescenza da parte di cromatofori alle radiazioni UV

Suscettibilità al foto danneggiamento e fluorescenza da parte di cromatofori alle radiazioni UV

La spettroscopia Raman consente una elevata risoluzione spaziale in una microscopica geometria confocale



Permette l'utilizzo di radiazione UV, del visibile e IR



Incrementa il photodamage e la fluorescenza da parte di cromatofori cellulare

Soluzione: utilizzo di radiazioni NIR

I vantaggi della spettroscopia Raman

nello studio della interazione farmaco - cellula



Fluorescence

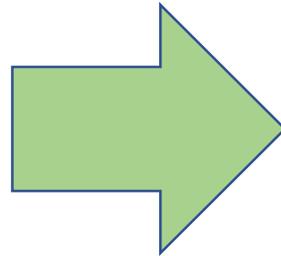
'ON'/'OFF'

Univariate

Photobleaching

Invasive

Single interaction probed



- Alta risoluzione
- Analisi multivariata
- Metodica label free
- Non richiede algoritmi di correzione per Mie scattering o acqua
- Materiali utilizzabili come substrati

L'Alta risoluzione

Permette di ottenere **informazioni biochimiche più dettagliate** che non si limitano solo alla interazione farmaco - cellula



Ma anche il percorso intracellulare con la possibilità di sapere:



La **localizzazione** subcellulare

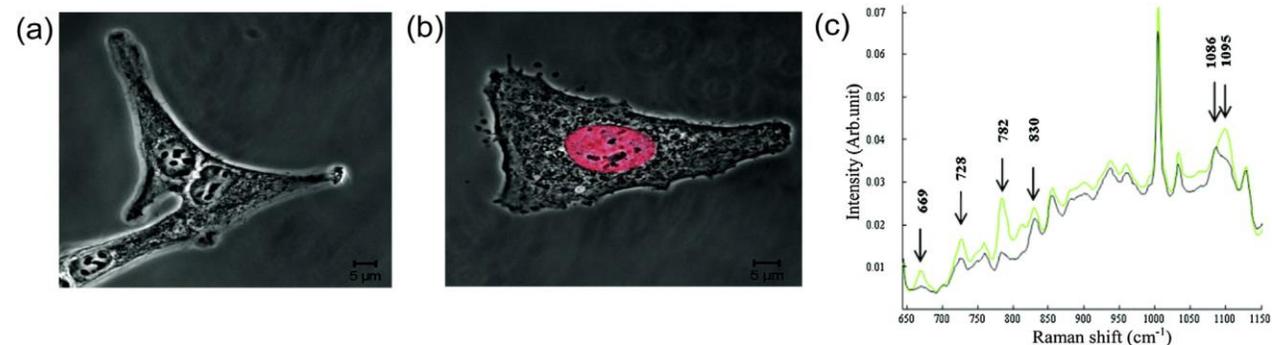


Gli **effetti** sulla cellula



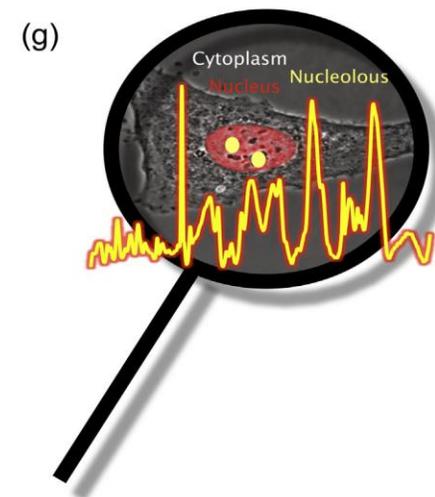
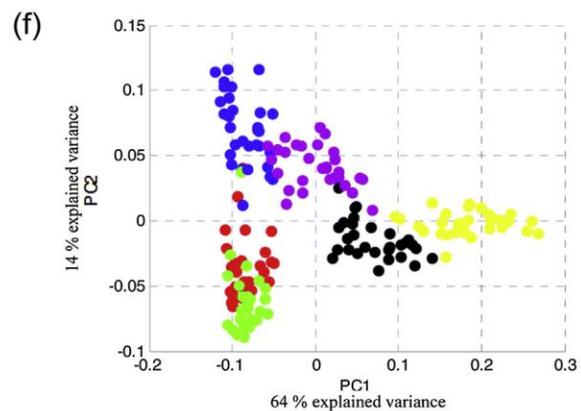
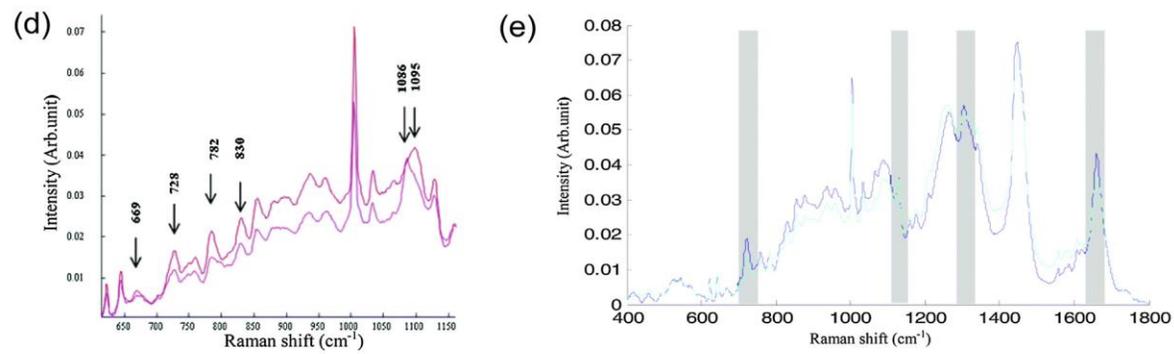
Modalità di azione

Determinazione della localizzazione subcellulare e possibile modalità di azione del farmaco



Studio di Farhane et al.

Indagine sull'assorbimento e sulla diffusione della dexorubicina nelle cellule di un adenocarcinoma del polmone.



Analisi dei dati

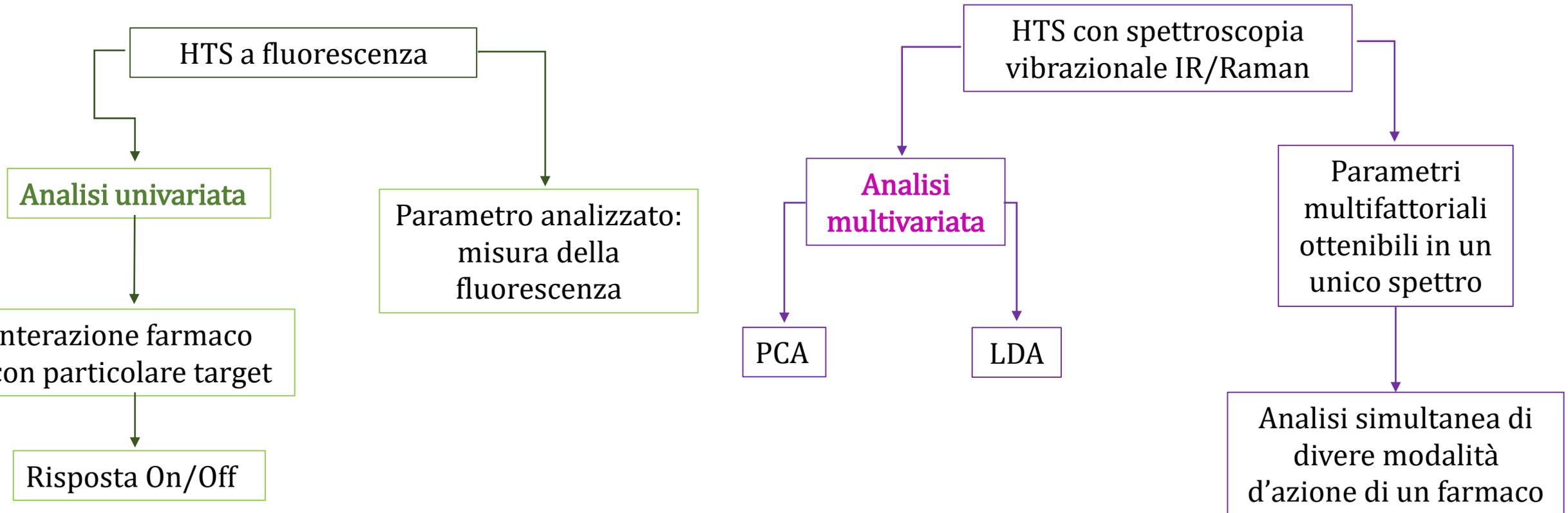
Univariata

Multivariata

L'analisi dei dati si suddividono in due fasi:

Pre-processo: eliminazione dei contributi di background dovuti ad effetti fisici, del campione e del substrato.

Post-processo: richiede sistemi di analisi per analizzare i dati e le informazioni ricavati dalla interazione farmaco - cellula.

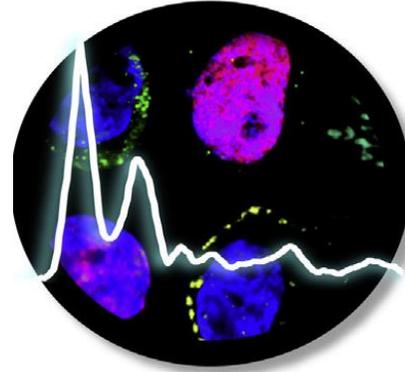


Conclusioni

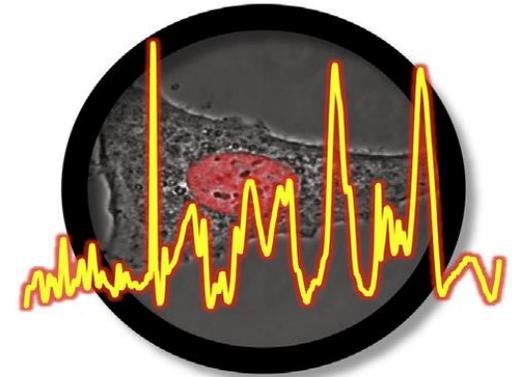
Alla luce di quanto dettosi può pertanto rispondere affermativamente alla domanda sulla possibile innovazione e sui possibili miglioramenti che la spettroscopia vibrazionale può apportare nell'ambito dei processi HTS, rispetto alle metodiche attuali basate sulla fluorescenza. Infatti sia la spettroscopia vibrazionale Raman che infrarossa, pur considerando i limiti che le due tecniche comprendono, permettono di ottenere informazioni più dettagliate e aggiuntive sulla interazione farmaco-cellula, anche grazie a metodi di analisi che se pur più complessi permettono una visione più completa dell'interazione.



Fluorescence
'ON'/'OFF'
Univariate
Photobleaching
Invasive
Single interaction probed



FTIR Spectroscopy
Multivariate
Label free
'Mode of action'
Complex data processing
Water and Mie scattering
corrections required



Raman Spectroscopy
Multivariate
Label free
'Mode of action'
Subcellular information
Drug tracking
Complex data processing