
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

VITTORIO CAPRARO, ARNALDO VECLI, AMALIA BIANCHI

**Contributo allo studio del meccanismo del passaggio
volumetrico netto di soluzione attraverso la pelle di
Rana isolata in assenza di un apparente gradiente
osmotico**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.2, p. 248–252.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_2_248_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Fisiologia. — *Contributo allo studio del meccanismo del passaggio volumetrico netto di soluzione attraverso la pelle di Rana isolata in assenza di un apparente gradiente osmotico.* Nota di VITTORIO CAPRARO, ARNALDO VECLI e AMALIA BIANCHI^(*), presentata^(**) dal Socio R. MARGARIA.

È stato più volte osservato in passato e anche di recente confermato [1, 2, 3] che attraverso la pelle di Rana, sia *in situ* che isolata, si può osservare un assorbimento di liquido dall'ambiente esterno, a contatto con l'epidermide, anche in condizioni in cui questo ambiente sia isotonico ed isoionico con l'ambiente interno a contatto col derma. Ciò sembra avvenire senza che si abbia rigonfiamento dello strato epidermico; in altre parole l'assunzione di liquido sarebbe dovuta ad un flusso volumetrico netto che attraversa l'epidermide, del valore di $0,91 \times 10^{-6} \text{ l cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ [3].

Di tale fenomeno è stata data un'interpretazione teorica basata sulla presenza in seno alla barriera cutanea di gradienti osmotici locali corrispondenti a gradienti di concentrazione effettivi, o di gradienti osmotici formali dovuti alla codiffusione del soluto insieme al solvente. Schemi di questo tipo sono stati analizzati teoricamente e realizzati in modelli artificiali [4, 5, 6, 7, 8].

In questo lavoro si è voluto controllare se nella pelle di Rana il passaggio netto di acqua prima ricordato potesse in parte ricondursi all'accumulo nel tessuto epidermico di una soluzione iperosmotica. Ciò poteva essere suggerito anche dal fatto che la quantità di sali di sodio che attraversa la pelle è molto maggiore di quanto sarebbe giustificato dal passaggio di una soluzione isotonica [2].

Un preparato microscopico di pelle di Rana (fig. 1) presenta tre strati ben delimitati: al di sotto dell'epidermide, che costituisce lo strato più esterno, esiste uno strato di connettivo lasso contenente i vasi sanguigni e i fondi ciechi delle ghiandole cutanee e questo è limitato verso l'interno da uno strato di connettivo più compatto con caratteristiche del tutto diverse. Dalle misure fatte al microscopio lo spessore della pelle intera e lo spessore della fascia connettivale compatta sono rispettivamente di $3 \times 10^{-2} \text{ cm}$ e di $1,9 \times 10^{-2} \text{ cm}$.

Richiamandosi a quanto prima detto, si poteva allora prospettare l'ipotesi che, a seguito del flusso netto transepidermico di sali di sodio, il liquido contenuto nello strato di connettivo lasso diventasse ipertonico, e che a questo si dovesse attribuire il conseguente richiamo osmotico di acqua dall'ambiente esterno.

Al fine di verificare questa ipotesi si è proceduto nel seguente modo.

(*) Dall'Istituto di Fisiologia Generale di Milano.

(**) Nella seduta del 13 febbraio 1965.

Sono state utilizzate pelli ventrali di *Rana esculenta* isolata dall'animale e gli esperimenti sono stati sempre eseguiti ad una temperatura di $20 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

In un primo gruppo di esperimenti è stato determinato, facendo uso di composti marcati, il flusso netto transcutaneo di sali di sodio; esso è stato calcolato determinando il flusso entrante esterno-interno ed uscente interno-esterno di sodio in gruppi di pelli diverse; dato che il flusso uscente è notevolmente costante in pelli diverse $(0,056 \pm 0,0017) \times 10^{-6} \text{ E cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$; media



Fig. 1. - Sezione trasversale della pelle di *Rana esculenta*.

Colorazione Ematossilina-Eosina. Ingrandimento 200x.

di 5 esperimenti) il flusso netto in ciascuna pelle è stato determinato sottraendo a ciascun flusso entrante il valore medio del flusso uscente.

Questi flussi sono stati determinati su pelli di Rane catturate nei mesi di ottobre e novembre, ponendo la pelle isolata ad incubare per tre ore in liquido di Ringer aereato e così costituito: NaCl 110 mM/l, KCl 2 mM/l, CaCl₂ 2,5 mM/l, NaH₂PO₄ 1,7 mM/l, Na₂HPO₄ 3,7 mM/l.

Dopo tale periodo la pelle è stata montata a separare due camere in plexiglas della capacità di 40 ml e riempite dello stesso Ringer aereato. L'apparecchio è quello stesso illustrato da V. Capraro e F. Marro [3].

All'inizio dell'esperimento la camera costituente l'ambiente esterno era caricata con Na²⁴Cl ad alta attività e dopo un periodo di un'ora, al fine di ottenere un flusso isotopico stazionario, veniva misurata la radioattività emergente durante il successivo periodo di un'ora dal lato opposto.

La radioattività era misurata mediante un contatore a scintillazione (SELO - Milano). Dalla radioattività, per calcolo, si risaliva al flusso unidire-

reazionale di sodio entrante. Altri esperimenti sono stati condotti in modo analogo al fine di misurare il flusso uscente di sodio.

In un secondo gruppo di esperimenti si è isolata la fascia connettivale compatta della pelle; per preparare questa fascia, la pelle è stata dapprima trattata con una soluzione di Ringer contenente 0,2 g/l di etilendiaminotetracetato di sodio per 15 minuti; si sono poi allontanati lo strato epidermico e lo strato connettivale lasso sotto epidermico mediante raschiamento; si è infine lavata la fascia residua in Ringer normale per più ore. Il controllo istologico ha dimostrato che la lamina residua costituisce uno strato completamente privo di epidermide e di connettivo lasso (fig. 2).

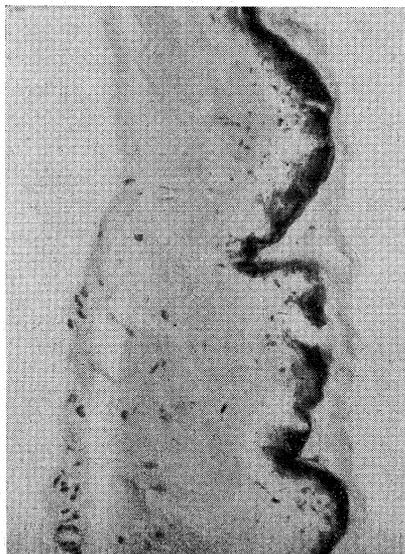


Fig. 2. - Sezione trasversale della lamina connettivale isolata.

Colorazione Ematossilina-Eosina. Ingrandimento 200x.

Queste lamine sono state ottenute da pelli di Rane catturate nel periodo settembre-ottobre.

Con esse, utilizzate a modo di membrana, con un apparecchio simile a quello precedentemente descritto, si è determinato il flusso diffusionale unidirezionale di NaCl che le attraversa. Il tracciante impiegato in questo caso è stato il Na^{22}Cl ; come rivelatore si è adoperato lo stesso apparecchio usato per il precedente gruppo di esperimenti. Per le altre modalità e per il calcolo si è proceduto come sopra.

Conoscendo il flusso unidirezionale e translaminare di $\text{NaCl}(\dot{N}_{\text{Na}})$ è stato calcolato il valore di « ω » dello strato di connettivo compatto sotto epidermico, secondo la formula [9]:

$$\dot{N}_{\text{Na}} = \omega RT \Delta N_{\text{Na}}$$

dove ΔN_{Na} è uguale a 0,119 E l⁻¹.

Esso è risultato uguale a $(2,27 \pm 0,07) \times 10^{-6}$ E Atm⁻¹ cm⁻² h⁻¹ (media di 14 esperimenti).

Lo spessore della pelle intera e quello della lamina isolata sono stati determinati per pesata, dopo prosciugamento con carta bibula, e il loro valore medio è risultato $1,66 \times 10^{-2}$ g/cm² (media di 40 valori) rispettivamente $0,51 \times 10^{-2}$ g/cm² (media di 14 valori).

Come si vede il rapporto di spessore fra i due substrati, supponendo che tali lamine abbiano densità unitaria, è molto diverso da quello ottenibile dai dati microscopici; ciò dipende presumibilmente dal fatto che nelle determinazioni a fresco la pelle intera e ancor più la lamina connettivale compatta vengono stirate prima delle misurazioni.

Il valore di « ω » dovrebbe quindi essere corretto in funzione dello spessore tenendo presente che a noi interessa il valore della lamina *in situ*; è infatti ragionevole supporre che esista una correlazione tra il valore di ω e lo spessore. L'entità di tale correzione non è esattamente precisabile a causa del diverso contenuto d'acqua intercellulare nei due tessuti. Operando comunque sul rapporto tra i due substrati quale risulta dai dati microscopici e sul valore di spessore della pelle intera quale risulta dai valori di pesata, il che porta ad una correzione massima, si ottiene un valore corretto di:

$$\omega' = 1,10 \times 10^{-6} \text{ E Atm}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$$

Dal primo gruppo di esperimenti è stato ottenuto un flusso netto trans-epiteliale di sodio di $(0,39 \pm 0,05) \times 10^{-6}$ E cm⁻² h⁻¹ (media di 15 esperimenti).

In condizioni di stazionarietà questo deve essere il flusso netto che attraversa anche la fascia connettivale compatta che limita all'interno la pelle di Rana.

Supponendo che il coefficiente « ω » di quest'ultimo strato abbia un valore vicino a quello determinato per il NaCl nel secondo gruppo di esperimenti, si può calcolare quale deve essere il valore di differenza di concentrazione tra lo strato sottoepiteliale e l'ambiente interno che permette il flusso netto transcutaneo di sali di sodio prima ricordato. Infatti si può utilizzare la formula [9]:

$$\dot{N}_{\text{Na}} = \omega' RT \Delta N_{\text{Na}} + \dot{V} (1 - \sigma) \bar{N}_{\text{Na}}$$

dove ΔN_{Na} è la differenza di concentrazione ricercata, \dot{V} è l'eventuale flusso volumetrico netto attraversante la fascia connettivale, σ è il coefficiente di riflessione dei sali di sodio attraverso detto strato e \bar{N}_{Na} è la concentrazione media di sodio sempre nello spessore dello stesso strato.

Come si vede dalla formula, ΔN_{Na} dipende anche da un flusso in massa sostenuto dal trascinarsi dovuto a \dot{V} .

Se noi poi assumiamo che \dot{V} sia stazionario e abbia un valore pari a quello transepidermico e cioè sia di $0,91 \times 10^{-6}$ l cm⁻² h⁻¹ [3] e se contemporaneamente ammettiamo che sia $\sigma \simeq 0$, ipotesi questa che, prescindendo dal suo

significato, tende a rendere massimo il contributo correttivo del secondo addendo nella suddetta equazione, e $\bar{N}_{Na} \simeq 119 \times 10^{-3} \text{ E l}^{-1}$, possiamo ricavare un valore di $\Delta N_{Na} \simeq 10,6 \times 10^{-3} \text{ E l}^{-1}$. Possiamo, per contro, assumere di non conoscere né l'entità né il verso di \dot{V} e andare a calcolare il valore di ΔN_{Na} in corrispondenza dei valori di \dot{V} compresi tra $-1 \times 10^{-6} \text{ l cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e $+1 \times 10^{-1} \text{ l cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. In corrispondenza, ΔN_{Na} varia linearmente tra $19,3 \times 10^{-3} \text{ E l}^{-1}$ e $10,3 \times 10^{-3} \text{ E l}^{-1}$.

In un lavoro precedente [3], e sullo stesso tipo di substrato, è stato sperimentalmente determinato il valore di contropressione osmotica necessaria ad abolire l'assorbimento di liquido dalla superficie esterna della epidermide. Ciò avviene quando al Ringer esterno si aggiunge saccarosio in concentrazione media pari a $60 \times 10^{-3} \text{ M l}^{-1}$ equivalente a $30 \times 10^{-3} \text{ E l}^{-1}$ di cloruro di sodio.

Come è facile constatare, questo valore è nettamente superiore ai valori di ΔN_{Na} prima calcolati, e se i presupposti non sono errati, permette di concludere che c'è, almeno nella pelle di Rana, la reale possibilità che un gradiente di concentrazione che si istituisce nello spazio sotto epidermico, contribuisca al flusso netto di acqua transepidermico.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] V. CAPRARO, «Atti Acc. Naz. Lincei, Cl. Sc. fis. mat. e nat.», 9, 2° sem., fasc. 3-4 (1950).
- [2] V. CAPRARO e M. L. GARAMPI, «Memoirs of the Soc. for Endocrinol.», 5, 60 (1955).
- [3] V. CAPRARO e F. MARRO, «Arch. Ital. Biol.», 101, 161 (1963).
- [4] F. MARRO e L. PESENTE, «Nuovo Cimento», N° 1 Suppl. al vol. 1, serie I (1963). p. 65.
- [5] P. F. CURRAN e J. R. MCINTOSH, «Nature», 193, 347 (1962).
- [6] J. T. OLGIVIE, J. R. MCINTOSH e P. F. CURRAN, «Biochim. Biophys. Acta», 66, 441 (1963).
- [7] C. R. HOUSE, «Biophysic. J.», 4, 401 (1964).
- [8] C. S. PATLAK, D. A. GOLDSTEIN e J. F. HOFFMAN, «J. Theor. Biol.», 5, 426 (1963).
- [9] O. KEDEM e A. KATCHALSKI, «Biochim. Biophys. Acta», 27, 229 (1958).