
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO SPOSITO, BRUNO BERTOLINI, MARIO
BUONGIORNO-NARDELLI, GIORGIO HASSAN, GIOVANNI
MARINUCCI, ROBERTO PICARDI

Studio autoradiografico della distribuzione della bilirubina-3 H in ratti normali o con il coledoco legato

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 54 (1973), n.6, p. 985–990.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_54_6_985_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/>

Biologia. — *Studio autoradiografico della distribuzione della bilirubina-3 H in ratti normali o con il coledoco legato* (*). Nota di MARIO SPOSITO, BRUNO BERTOLINI, MARIO BUONGIORNO-NARDELLI, GIORGIO HASSAN, GIOVANNI MARINUCCI e ROBERTO PICARDI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The histological study of intracellular transport and storage of bilirubin was carried out using the autoradiographic technique. ^3H -Bilirubin, prepared according to Grodsky's procedure, was injected into normal and obstructed rats. Percent of isotope loss in fixation and dehydration media was calculated and was found low enough on the whole not to impair the significance of the autoradiographic results. Autoradiographs of normal liver showed no definitive intracellular isotope polarization; in the liver of obstructed rats an accumulation of isotope in Kupffer cells was observed. In the kidney of obstructed rats a high concentration of ^3H -Bilirubin was observed in the epithelial cells of second order tubules.

Lo studio istologico del trasporto e dell'accumulo intracellulare della bilirubina presenta dei problemi complessi, in gran parte non ancora risolti. Di fatto, le tecniche istochimiche a nostra disposizione [4, 13, 5] non sono sufficientemente sensibili.

Alcuni Autori hanno suggerito di recente che le ordinarie tecniche istologiche possano asportare la bilirubina presente nei tessuti [11]. Questa Nota espone alcuni dei risultati ottenuti con la tecnica autoradiografica, dopo l'iniezione in ratti di bilirubina marcata con tritio. È stato possibile dimostrare che la maggior parte della bilirubina radioattiva viene conservata nei tessuti, nel corso dei processi di fissazione ed inclusione, e si sono potuti raccogliere alcuni dati sulla localizzazione della bilirubina in differenti tessuti od organi.

MATERIALI E METODI

Negli esperimenti sono stati usati ratti Wistar, del peso di 100-150 g. Allo scopo di produrre un ittero ostruttivo il coledoco veniva resecato tra due legature, ed i ratti venivano adoperati 6 giorni dopo la ostruzione così ottenuta. Nei ratti normali il coledoco veniva incannulato, in modo da poter raccogliere la bile.

La Bilirubina- ^3H (Sorin, Vercelli; attività specifica 0,150 mCi/mg), preparata, ed equilibrata contro albumina, secondo il metodo di Grodsky

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma in collaborazione con il Centro Studi Malattie del Fegato, Ospedale di S. Giacomo, e con l'Istituto di Clinica Medica II, Università di Roma.

(**) Nella seduta del 19 giugno 1973.

e coll. [7], è stata iniettata nella vena giugulare di ratti normali o con il coledoco interrotto, in dosi di 0,02, 0,34 o 1mg/100 g di peso corporeo. I ratti normali venivano sacrificati 2,5 e 12-15 minuti dopo l'iniezione; quelli con il coledoco interrotto dopo 15 minuti o 6 ore. Tutti gli esperimenti sono stati condotti sotto anestesia da Nembutal.

La radioattività totale del fegato, del rene, del sangue, della bile e dell'orina è stata misurata con un contatore a scintillazione in liquido (Mark-Nuclear Chicago), su campioni pesati e digeriti con Soluene (Packard).

Frammenti di fegato e rene sono stati fissati in glutaraldeide 1,5% in tampone fosfato 0,13 M [9], postfissati in OsO₄ 2% nello stesso tampone, disidratati ed inclusi in Vestopal W. La percentuale di perdita di radioattività nei differenti mezzi usati per la fissazione e la disidratazione è stata calcolata per comparazione tra la radioattività totale di campioni freschi di tessuto e la radioattività di campioni dello stesso peso iniziale e della stessa forma, dopo che la disidratazione era stata completata; è stata misurata anche la radioattività dei mezzi di fissazione e disidratazione (Tabella I).

TABELLA I

*Percentuale di perdita di radioattività del fegato
nei mezzi di fissazione e disidratazione.*

	(Normale)	(Normale)	(Coledoco ostruito)	
	1	2	3	4
Glutaraldeide	9,3	10,3	9,7	5,8
Tampone di lavaggio	3,0	2,8	2,5	2,8
OsO ₄	3,5	2,1	2,2	2,1
Alcool	3,6	2,7	3,1	0,9
TOTALE	19,4	17,9	17,5	11,6

Media 16,6 ± 1,7 E.S.

Per l'autoradiografia, sezioni di 1 µ di fegato e di rene sono state ricoperte con emulsione NTB 2 KODAK, non diluita, lasciate asciugare all'aria e conservate a 4 °C in atmosfera secca. Dopo 2-4 mesi di esposizione, le autoradiografie sono state sviluppate per 2 min a 18 °C con DEKTOL KODAK, fissate con UNIFIX, lavate a lungo e poi colorate con tionina e blu di metilene.

Al fine di assicurarsi che la Bilirubina-3H iniettata non venisse degradata nell'animale vivente, dopo l'iniezione, furono eseguiti i controlli seguenti: 1) determinazione della distribuzione della radioattività, nel fegato,

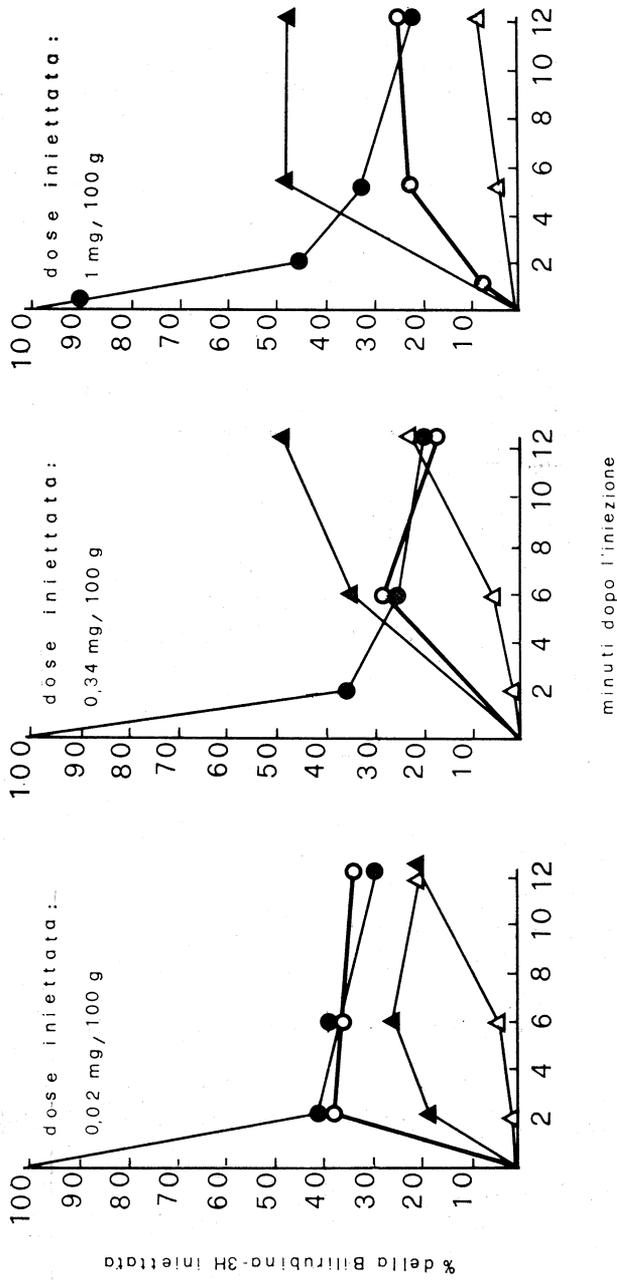


Fig. 1. - Distribuzione della radioattività nel sangue (●), nel fegato (○) e nella bile (△), dopo l'iniezione di differenti dosi di Bilirubina-3H in ratti normali. (▲) indica la radioattività non recuperata nei tre compartimenti sopra menzionati, e calcolata come differenza dalla radioattività totale iniettata.

nel sangue e nella bile, dopo l'iniezione di differenti dosi di Bilirubina-3 H; nei ratti normali (fig. 1) i risultati sono in accordo con quelli riportati da altri Autori [1, 2]; 2) confronto tra radioattività nel sangue e bilirubinemia,

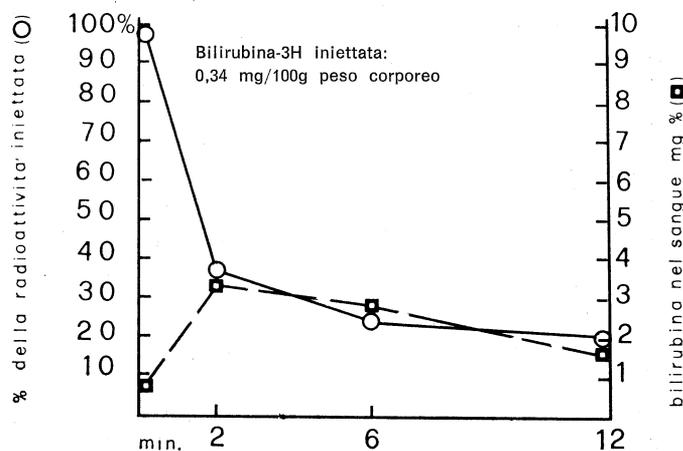


Fig. 2. - Confronto tra radioattività nel sangue, dopo iniezione di Bilirubina-3 H in un ratto normale, e bilirubinemia.

determinata quest'ultima con metodi chimici [6]: in tutti gli esperimenti è stata riscontrata una stretta somiglianza tra le curve della bilirubinemia e della radioattività del sangue (fig. 2).

RISULTATI

Le autoradiografie del fegato normale, dopo l'iniezione di bilirubina tritiata (Tav. I, fig. 1), mostrano una marcatura citoplasmatica diffusa, apparentemente senza alcuna localizzazione intracellulare preferenziale, almeno a livello di microscopia ottica. Qua e là si può osservare la marcatura di cellule di Kupffer o endoteliali.

Nei ratti con il coledoco interrotto, l'osservazione più interessante è l'intensa marcatura citoplasmatica delle cellule di Kupffer, che è già evidente dopo 12 min, e persiste fino a 6 ore dopo l'iniezione, cioè fino al tempo massimo per cui il fenomeno è stato seguito. Anche in questo caso gli epatociti non mostrano siti preferenziali di marcatura intracellulare (Tav. I, fig. 2).

Nel rene dei ratti con ittero ostruttivo è stata osservata costantemente una marcatura dei glomeruli, sia nelle cellule endoteliali che in quelle epiteliali (Tav. II, fig. 1). Una certa marcatura si vede anche, 12 min dopo l'iniezione, nell'orletto a spazzola e nel citoplasma delle cellule dei tubuli contorti di primo ordine (Tav. II, fig. 2).

6 ore dopo l'iniezione si osserva una concentrazione di grani d'argento sul citoplasma delle cellule dei tubuli di secondo ordine; i corpi densi sembrano

il sito preferenziale di accumulo intracellulare dell'isotopo (Tav. III, fig. 1). Nelle arteriole del rene (Tav. III, fig. 1) le lamine elastiche sono la sede di un forte accumulo di radioattività.

DISCUSSIONE

Il parallelismo tra bilirubinemia e radioattività del sangue dopo iniezione di Bilirubina- ^3H ed il ritmo di escrezione della radioattività nella bile indicano che la marcatura con tritio non si dissocia dalla bilirubina, nel corso degli esperimenti, e suggeriscono quindi che la radioattività rimanga effettivamente legata alla bilirubina presente nei tessuti.

Inoltre Brown *e coll.* [2], che, come noi, hanno utilizzato nei loro esperimenti un pigmento isotopico, preparato secondo il metodo di Grosky *e coll.* [7], sono stati in grado di ricristallizzare dalla bile fino al 90 % della radioattività come bilirubina.

La perdita di radioattività del fegato e del rene, durante i procedimenti istologici, è sufficientemente bassa, tanto da non infirmare il significato dei risultati autoradiografici.

Alcune indicazioni preliminari sulla distribuzione cellulare della Bilirubina- ^3H possono essere tratte dagli esperimenti di autoradiografia. Per quel che riguarda il fegato non è stato possibile ottenere dei risultati definiti sul trasporto intraepatocitario del pigmento; è stato però dimostrato un accumulo della bilirubina nelle cellule di Kupffer dei ratti con il coledoco ostruito. Questo fatto indica che bisogna tener conto dell'intervento delle cellule di Kupffer, quando si vuol misurare la capacità di accumulo del fegato.

I nostri risultati sul rene dei ratti con ittero ostruttivo sono in accordo con l'esistenza di un processo di filtrazione glomerulare della bilirubina, e dimostrano inoltre un accumulo della bilirubina nelle cellule dei tubuli. Ciò è in accordo con le osservazioni istologiche sull'uomo e su animali itterici [10], anche se la escrezione urinaria della bilirubina non sembra dipendere da una funzione tubulare [3, 12].

Risulta anche confermata la già nota affinità della bilirubina per le fibre elastiche.

Le tecniche di fissazione e di inclusione adoperate nel presente lavoro sono quelle usuali per la microscopia elettronica. Dovrebbe perciò essere possibile adoperare l'autoradiografia anche al livello di microscopia elettronica, per rivelare la via intracellulare per il trasporto della bilirubina tritiata.

BIBLIOGRAFIA

- [1] I. M. ARIAS, L. JOHNSON e S. WOLFSON, «Am. J. Physiol.», 200, 1091 (1961).
- [2] W. R. BROWN, G. M. GRODSKY e J. V. CARBONE, «Am. J. Physiol.», 207, 1237 (1964).
- [3] J. DE GROOTE, J. FEVERY e K. HEIRWEGH in *Bilirubin Metabolism*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1967.

- [4] V. J. DESMET, A. M. BULLENS e K. P. M. HEIRWEGH, in *Bilirubin Metabolism*, Oxford Blackwell Scientific Publications, 1967.
- [5] V. J. DESMET, A. M. BULLENS, J. DE GROOTE, e K. P. M. HEIRWEGH, « J. Histochem. Cytochem », 16, 419 (1968).
- [6] W. R. EBERLEIN, « Pediatrics », 25, 878 (1960).
- [7] G. M. GRODSKY, J. V. CARBONE, R. FANSKA e C. T. PENG, « Am. J. Physiol. », 203, 532 (1962).
- [8] Q. MAGGIORE, M. CARTER e B. H. BILLING, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 39, 941 (1963).
- [9] G. MILLONING, « J. Appl. Physiol. », 32, 1640 (1961).
- [10] E. NIZET e G. BARAC, « C. R. Soc. Biol. (Paris) », 146, 1282 (1962).
- [11] L. OKOLICSANY, P. MANGENANT e J. FREI, « Lancet », 1173 (1958).
- [12] E. OWENE, in *Bilirubin Metabolism*, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1967.
- [13] RAIA S., *ivi*.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I

- Fig. 1. - Autoradiografia di fegato normale, 12 min dopo l'iniezione di Bilirubina-3 H (1 mg/100 g di peso corporeo). Tempo di esposizione: 45 giorni. I grani non mostrano una distribuzione intracellulare definita.
- Fig. 2. - Autoradiografia del fegato di un ratto con il coledoco ostruito 6 giorni prima dell'iniezione di Bilirubina-3H (1 mg/100 g di peso corporeo) e sacrificato 6 ore dopo l'iniezione. Tempo di esposizione: 45 giorni. Si può notare un evidente accumulo di grani d'argento nel citoplasma delle cellule di Kupffer. Negli epatociti la marcatura non ha una localizzazione definita.

TAVOLA II

- Fig. 1. - Autoradiografia del rene di un ratto con il coledoco ostruito 6 giorni prima dell'iniezione di Bilirubina-3H (1 mg/100 g di peso corporeo) e sacrificato 12 minuti dopo l'iniezione. Tempo di esposizione: 45 giorni. Le cellule del corpuscolo di Malpighi sono marcate, sia quelle endoteliali, che quelle epiteliali. Si osserva qualche grano anche nel lume dei capillari e nella capsula di Bowmann.
- Fig. 2. - Autoradiografia del rene di un ratto con il coledoco ostruito 6 giorni prima dell'iniezione di Bilirubina-3H (1 mg/100 g di peso corporeo) e sacrificato 12 minuti dopo l'iniezione. Tempo di esposizione 45 giorni. I grani d'argento sono distribuiti sull'orletto a spazzola e sul citoplasma delle cellule dei tubuli di primo ordine.

TAVOLA III

- Fig. 1. - Autoradiografia del rene di un ratto con il coledoco ostruito 6 giorni dopo l'iniezione di Bilirubina-3H (1 mg/100 g di peso corporeo) e sacrificato 6 ore dopo l'iniezione. Tempo di esposizione: 45 giorni. Si osserva una forte marcatura delle cellule dei tubuli di secondo ordine, e i corpi densi sembrano essere un sito di localizzazione intracellulare preferenziale dell'isotopo.
- Fig. 2. - Autoradiografia di una piccola arteria dal rene di un ratto con il coledoco ostruito da 6 giorni prima dell'iniezione di Bilirubina-3 H (1 mg/100 g peso corporeo) e sacrificato 12 minuti dopo l'iniezione. Tempo di esposizione: 45 giorni. Le lamine elastiche sono sede di una forte concentrazione dei grani di argento.

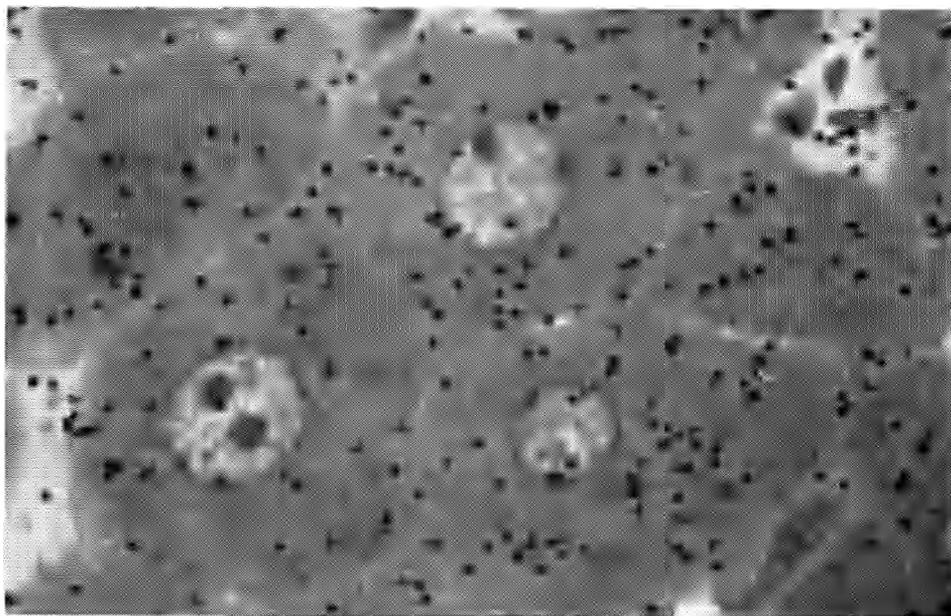


Fig. 1.

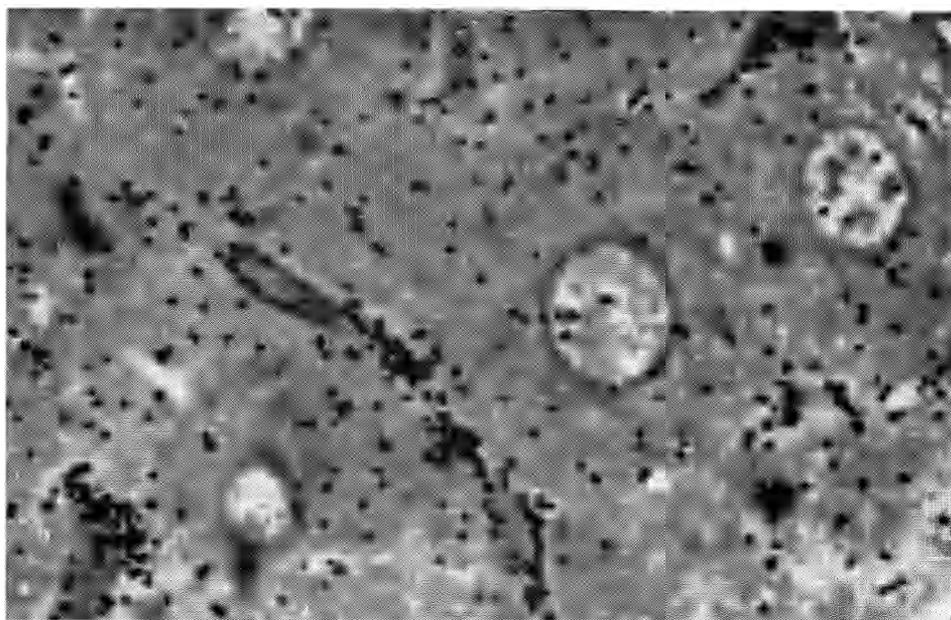


Fig. 2.

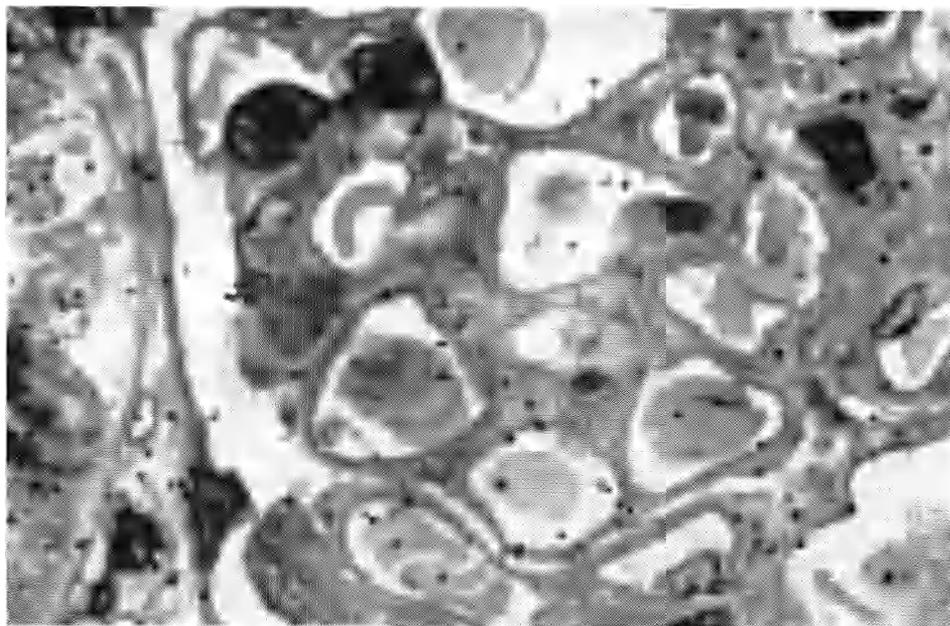


Fig. 1.

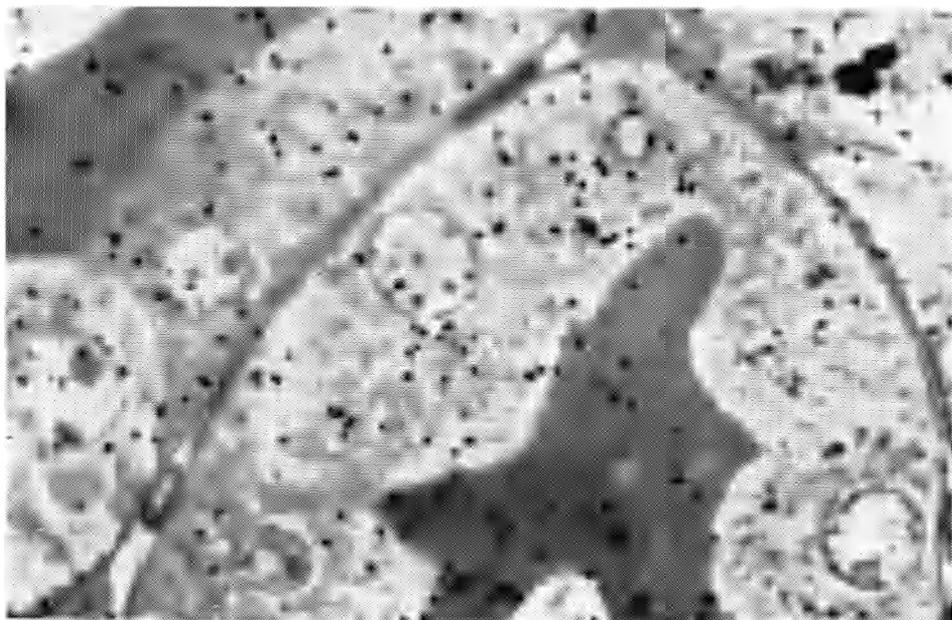


Fig. 2.

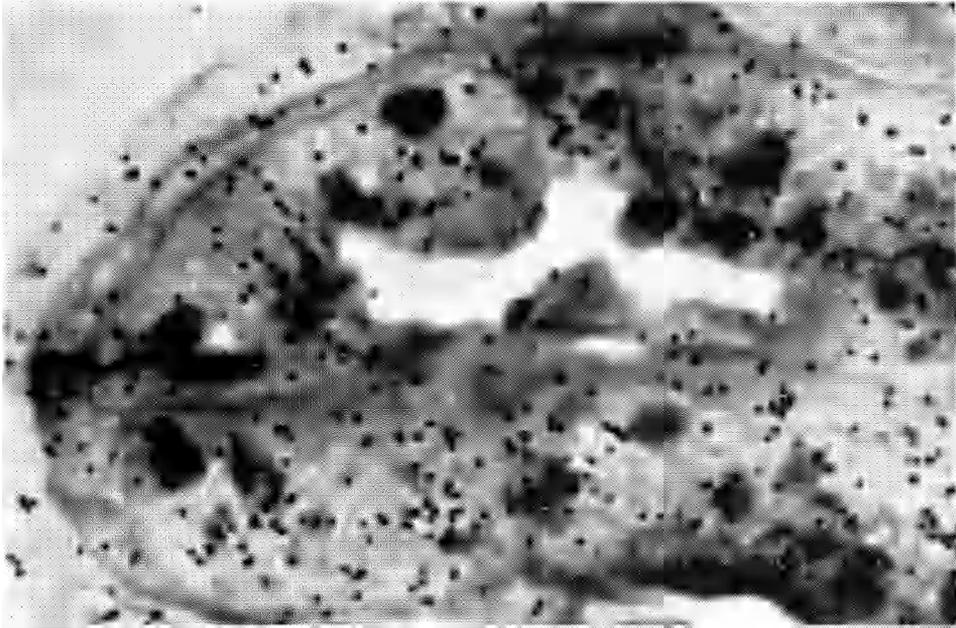


Fig. 1.

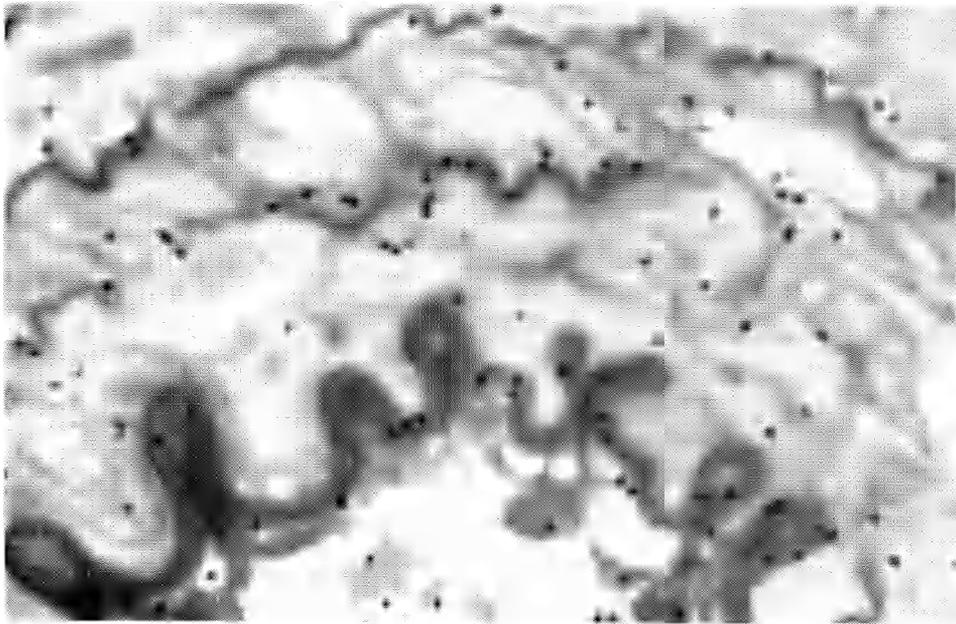


Fig. 2.