
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ROSETTA GUARNERI, FRANCESCO PONTE, FEDERICO
PICCOLI, VINCENZO BONAVITA

Analisi dello spazio inulinico nella retina

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.1-2, p.
132–135.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_1-2_132_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/>

Neurochimica. — *Analisi dello spazio inulinico nella retina* (*).
Nota di ROSETTA GUARNERI, FRANCESCO PONTE, FEDERICO PICCOLI e VINCENZO BONAVIDA, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY. — The study of fluid distribution of intra- and extra-cellular compartments in the retina has been carried out *in vitro*, under two different metabolic conditions.

When oxygen and glucose were omitted in the incubation medium, a slight swelling of the retina could be measured after a long period of incubation. In the presence of glucose and oxygen no swelling occurs in the retina, even after a prolonged incubation.

Under both metabolic conditions, intra- and extra-cellular compartments underwent significant changes.

The increasing of inulin space (extra-cellular space) during incubation seems to be parallel to that described for brain slices.

Lo studio della distribuzione dei liquidi tra i compartimenti extra- ed intra-cellulari è particolarmente rilevante per l'analisi delle funzioni della membrana cellulare [1, 2].

Le variazioni del contenuto idrico durante lo sviluppo e l'effetto dell'incubazione sulla distribuzione dell'acqua nei due compartimenti sono stati oggetto di analisi recenti su fettine di cervello [3, 4]. Precedenti studi [5, 6, 7] hanno dimostrato che le dimensioni degli spazi ed il rigonfiamento del tessuto dipendono largamente dalle condizioni sperimentali, ed in specie dal mezzo di incubazione, dal metodo di preparazione delle fettine e dalle dimensioni della molecola del marcante [1, 8, 9]. Per misurare lo spazio extracellulare sono stati usati, in verità, composti diversi [10, 11, 12]; negli esperimenti descritti in questa Nota e riguardanti la retina, è stata scelta l'inulina, che dà risultati riproducibili e non altera il metabolismo normale del tessuto.

Lo studio della distribuzione dell'acqua negli spazi extra- ed intra-cellulari della retina è apparso indispensabile all'analisi, descritta in altra Nota [13] delle caratteristiche del trasporto di metaboliti in questo tessuto che, pur con essenziali differenziazioni istologiche, può essere considerato un preparato di neuroni senza interferenze gliali [14].

Come è noto, la retina è dotata di un sistema glicolitico di capacità molto elevata, operante nel mantenimento trofico del tessuto; in essa, il metabolismo ossidativo sembra più strettamente correlato ai fenomeni di eccitazione visiva [14]. Proprio in rapporto a questo suo peculiare *pattern* metabolico, la quantificazione degli spazi nella retina è stata condotta in presenza ed in assenza di O₂ ed in presenza ed in assenza di glucosio.

(*) Lavoro eseguito nella Clinica Neurologica e nella Clinica Oculistica dell'Università di Palermo e nella Clinica Neurologica dell'Università di Messina con contributi del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Nella seduta del 19 giugno 1973.

MATERIALE E METODI

Sono stati usati ratti Wistar albin, adulti, di ambo i sessi, del peso di 220–240 g. Le retine venivano isolate secondo il procedimento descritto di Bonavita *et al.* [17].

Determinazione del peso secco. Esso veniva determinato secondo Cohen *et al.* [8]. In particolare, le retine, subito dopo il prelievo, venivano immerse in vaschette Erlenmeyer da 25 ml contenenti 5 ml del mezzo di incubazione con o senza glucosio (negli esperimenti con glucosio in ciascuna vaschetta si faceva gorgogliare O₂ per 30 sec.) ed incubate a 37° C per 40, 60 e 90 minuti sotto leggera agitazione. Al termine della incubazione, le retine venivano rapidamente raccolte per filtrazione del mezzo di incubazione, pesate, essiccate in stufa a 90° C per circa 24 h e ripesate. L'essiccamento veniva ripetuto fino al raggiungimento di un peso costante.

Il contenuto d'acqua del tessuto veniva calcolato secondo la formula:

$$\text{ml di H}_2\text{O/g peso secco} = \frac{100 - \% \text{ peso secco}}{\% \text{ peso secco}}$$

Determinazione dello spazio extracellulare (spazio inulinico). Questa veniva eseguita nelle condizioni sperimentali descritte da Cohen *et al.* [8]. Le retine venivano preincubate in 4,5 ml di terreno con o senza glucosio per 30 minuti a 37° C sotto leggera agitazione. Al termine di tale periodo veniva aggiunta una quantità di 0,5 ml di una soluzione al 4% di inulina-C¹⁴ (Radiochemical Centre, Amersham), e l'incubazione veniva continuata per 10, 30 e 60 minuti. Alla fine della incubazione le retine venivano filtrate, pesate, omogeneizzate in 2 ml di HClO₄ al 3% (peso/volume) e centrifugate. 0,5 ml del supernatante venivano mescolati a 15 ml di liquido di scintillazione di Prockop-Ebert [17], e la radioattività contata in uno scintillatore Unilux della Nuclear Chicago.

Le conte/g del peso fresco del tessuto (indice dello spazio inulinico) venivano calcolate dalle conte/minuto mediante la relazione:

$$\text{CPG} = \frac{\text{CPM} \times (2 + Lp)}{0,5 p}$$

dove p è il peso fresco ed L i ml di H₂O/g del tessuto. Le conte venivano paragonate ad uno standard di terreno contenente il substrato marcato.

La composizione del mezzo di incubazione era quella descritta da Cohen *et al.* [8]: 119 mM NaCl, 5,0 mM KCl, 0,75 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1,0 mM NaH₂PO₄, 1,0 mM NaHCO₃, 5,0 mM HEPES (acido N-2-idrossimetilpiperazina-N'-2 etanol sulfonico), 10 mM glucosio, pH 7,4–7,6. Negli esperimenti in assenza di glucosio, la soluzione di glucosio veniva sostituita con una quantità di H₂O bidistillata tale da non alterare la molarità finale degli altri composti nel terreno.

Tutti i reattivi usati erano prodotti « puri per analisi ».

RISULTATI E DISCUSSIONE

La Tabella I riassume i valori del peso secco, del volume totale, e degli spazi extra- ed intra-cellulari della retina, incubata in assenza di glucosio e di O₂.

TABELLA I
*Contenuto idrico e compartimentalizzazione della retina di ratto
in assenza di O₂ e glucosio.*

Tempo di incubazione min.	% peso secco	Volume totale ml/g peso secco	Spazio inulinico ml/g peso secco	Spazio extracell. % vol. totale	Spazio intracell. % vol. totale
0 ⁽¹⁾	10.34 ± 0.765	8.70 ± 0.725	—	—	—
40	10.56 ± 0.935	8.52 ± 0.836	3.97	46.6	53.4
60	9.79 ± 0.972	9.28 ± 1.030	4.65	50.2	49.8
90	8.94 ± 0.640	10.21 ± 0.779 ⁽²⁾	5.35	52.4	47.6

(1) Per la determinazione dei valori al tempo 0, le retine immediatamente dopo essere state prelevate, venivano pesate ed essiccate.

(2) Significative per $P < 0,01$.

In queste condizioni sperimentali, l'imbibizione del tessuto, espressa come incremento del contenuto idrico totale, è risultata molto modesta, verificandosi solo dopo un tempo di incubazione relativamente lungo (almeno 90 minuti). Con riferimento a questo fenomeno appare suggestiva l'analogia di comportamento della retina di ratto adulto in condizioni di anossia, e delle fettine di cervello di ratto giovane, in condizioni normali di incubazione. Piccoli *et al.* [4] hanno, infatti, osservato che fino al 25° giorno di vita, l'encefalo di ratto incubato *in vitro* non va incontro ad un rigonfiamento significativo.

TABELLA II
*Contenuto idrico e compartimentalizzazione della retina di ratto
in presenza di O₂ e glucosio.*

Tempo di incubazione min.	% peso secco	Volume totale ml/g peso secco	Spazio inulinico ml/g peso secco	Spazio extracell. % vol. totale	Spazio intracell. % vol. totale
0 ⁽¹⁾	10.34 ± 0.765	8.70 ± 0.725	—	—	—
40	11.45 ± 0.820	7.76 ± 0.615 ⁽²⁾	3.26	42.0	58.0
60	10.9 ± 0.910	8.16 ± 0.720	4.12	50.6	49.4
90	11.13 ± 0.515	7.99 ± 0.425	4.21	52.7	47.3

(1) Per la determinazione dei valori al tempo 0, le retine, immediatamente dopo essere state prelevate, venivano pesate ed essiccate.

(2) Significative per $P > 0,01$.

Si può affermare che il fenomeno caratterizza metabolicamente anche la retina matura in condizioni di anossia [17].

La Tabella II ripropone gli stessi parametri della Tabella I per la retina incubata in presenza di glucosio ed ossigeno. In queste condizioni non è stato osservato alcun incremento del volume totale, ma solo una diversa distribuzione dell'acqua nei due compartimenti extra- ed intra-cellulare. Le variazioni di volume dello spazio extracellulare, durante l'incubazione, appaiono molto simili a quelle descritte da Cohen *et al.* [8] per le fettine di cervello.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. B. TOWER e R. S. BOURKE, « J. Neurochem. », *13*, 119 (1966), cit. in F. PICCOLI, A. GRYNBAUM e A. LAJTHA, *Developmental Changes in Na⁺, K⁺, ATP, and in the Levels and Transport of Amino Acids in Incubated Slices of Rat Brain*, « J. Neurochem. », *18*, 1135 (1971).
- [2] A. LAJTHA, « Brain Edema », ed. I. Klatzo e F. Seitelberg, p. 367, Springer-Verlag, New York (1967).
- [3] G. LEVI e M. G. LATTES, *Changes with Age in Water and Extracellular space in Incubated Brain Tissue*, « J. Neurochem. », *17*, 587 (1970).
- [4] F. PICCOLI, A. GRYNBAUM e A. LAJTHA, *Developmental Changes in Na⁺, K⁺, ATP, and in the Levels and Transport of Amino Acids in Incubated Slices of Rat Brain*, « J. Neurochem. », *18*, 1135 (1971).
- [5] H. S. BACHELARD, W. L. CAMPBELL e H. MCILWAIN, « J. Biochem. », *84*, 225 (1962), cit. in S. R. COHEN, R. BLASBERG, G. LEVI e A. LAJTHA, *Compartmentation of the Inulin Space in Mouse Brain Slices*, « J. Neurochem. », *15*, 707 (1968).
- [6] J. C. KESSEY, H. WALLGREN e H. MCILWAIN, « J. Biochem. », *95*, 289 (1965), cit. in S. R. COHEN, R. BLASBERG, G. LEVI e A. LAJTHA, *Compartmentation of the Inulin Space in Mouse Brain Slices*, « J. Neurochem. », *15*, 707 (1968).
- [7] H. M. PAPPUS, *The Nervous Tissue Spaces*, « Progr. Brain Res. », *29*, 201 (1968).
- [8] S. R. COHEN, R. BLASBERG, G. LEVI e A. LAJTHA, *Compartmentation of the Inulin Space in Mouse Brain Slices*, « J. Neurochem. », *15*, 707 (1968).
- [9] S. R. COHEN, P. F. STAMPHELMAN e A. LAJTHA, *The Temperature Dependent Compartmentation of the Extracellular Space in Mouse Brain Slices as Revealed by the Markers: Inulin, Sucrose, D-mannitol, D-sorbitol and Sulfate*, « Brain Res. », *21*, 419 (1970).
- [10] S. R. KOREY e R. MITCHELL, « Biochim. Biophys. Acta », *7*, 507 (1951), cit. in F. PICCOLI, A. GRYNBAUM e A. LAJTHA, *Developmental Changes in Na⁺, K⁺, ATP, and the Levels and Transport of Amino Acids in Incubated Slices of Rat Brain*, « J. Neurochem. », *18*, 1135 (1971).
- [11] H. M. PAPPUS e K. A. C. ELLIOTT, « Canad. J. Biochem. Physiol. », *34*, 1007 (1956), cit. in H. M. PAPPUS, *The Nervous Tissue Spaces*, « Progr. Brain Res. », *29*, 201 (1968).
- [12] H. M. PAPPUS, M. ROSENFELD, D. M. JOHNSON e K. C. A. ELLIOTT, « Canad. J. Biochem. Physiol. », *36*, 217 (1958), cit. in KEESEY J. C., WALLGREN H. e MCILWAIN H., *The Sodium, Potassium and Chloride of Cerebral Tissues: Maintenance, Change on Stimulation and Subsequent Recovery*, « Biochem. J. », *95*, 289 (1965).
- [13] R. GUARNERI, F. PICCOLI, F. PONTE e V. BONAVIDA, *Alcuni aspetti del trasporto di aminoacidi nella retina* (in corso di stampa).
- [14] L. H. COHEN e W. K. NOELL, *Relationships between Visual Function and Metabolism*. In « Biochemistry of the Retina », ed. C. N. W. Graymore, p. 36, Acad. Press (1965).
- [15] V. BONAVIDA, F. PONTE e G. AMORE, *Neurochemical Studies on the Inherited Retinal Degeneration of the Rat. I*, « Vision Res. », *3*, 271 (1963).
- [16] R. BLASBERG e A. LAJTHA, *Substrate Specificity of Steady-state Amino Acid Transport in Mouse Brain Slices*, « Arch. Biochem. Biophys. », *112*, 361 (1965).
- [17] V. BONAVIDA, R. GUARNERI e F. PONTE, *Neurochemical Studies on the Inherited Retinal Degeneration of the Rat. II*, « Vision Res. », *5*, 113 (1965).