
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ROSETTA GUARNERI, FEDERICO PICCOLI, FRANCESCO
PONTE, VINCENZO BONAVIDA

**Alcuni aspetti del trasporto di aminoacidi nella
retina**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.3-4, p.
277-280.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_3-4_277_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. — *Alcuni aspetti del trasporto di aminoacidi nella retina* (*). Nota di ROSETTA GUARNERI, FEDERICO PICCOLI, FRANCESCO PONTE e VINCENZO BONAVITA, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY. — The properties of mediated transport have been studied under different metabolic conditions, on the retina of the rat, *in vitro*.

In the case of glycine and glutamate the transport system is affected in terms of efficiency by glucose and oxygen, in the retina as well as in brain slices. Furthermore the influx of the two amino acids shows the same metabolic pattern. Conversely, the highest values of lysine uptake have been measured when the retinas were incubated in absence of glucose and oxygen. A possible interpretation of the data is discussed on the base of the peculiar metabolic pattern of the retina.

Le proprietà del trasporto mediato sono state studiate sia *in vivo* che *in vitro* su fettine di tessuto nervoso, in condizioni sperimentali che possono essere facilmente controllate [1-5]. Le fettine di tessuto nervoso accumulano aminoacidi dal mezzo, contro un gradiente di concentrazione, in misura variabile, che dipende da diversi parametri, tra i quali appaiono di maggiore rilievo la natura dell'aminoacido e la sua concentrazione. Tale accumulo contro gradiente richiede energia, è bloccato o ridotto da inibitori metabolici, da altri aminoacidi e/o da analoghi di aminoacidi [6-9], oltre che dalla assenza di Na^+ e di O_2 . Esso è mediato da sistemi *carrier* sulla cui natura non tutti sono concordi [10-11], ed infine la sua dinamica dipende da processi in parte opposti, quali il flusso, l'efflusso e lo scambio [1-3]. Proprio gli studi condotti sulla specificità di substrato di tali fattori hanno indicato la possibilità di raggruppare gli aminoacidi in diverse classi di trasporto [12-15].

Gli esperimenti descritti in questa Nota si inseriscono nei numerosi tentativi di definire il ruolo specifico della glia e dei neuroni nel trasporto attivo [16-17]. Si è utilizzata la retina che può essere considerata un autentico preparato di neuroni particolarmente differenziati. Le condizioni sperimentali di incubazione sono state suggerite dalle considerazioni esposte altrove [18].

Relativamente alla specificità delle componenti del trasporto, si è considerato un solo aminoacido per ogni classe di trasporto ed in particolare, la glicina per i neutri a catena breve, la lisina per i diamminici e l'acido glutamico per i dicarbossilici.

Sono stati usati ratti Wistar albi, adulti di ambo i sessi, del peso di 220-240 g. Le retine prelevate secondo la tecnica descritta da Bonavita *et al.* [19]

(*) 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.

venivano preincubate in 4,5 ml di terreno in presenza o in assenza di glucosio (negli esperimenti con glucosio, si faceva gorgogliare O₂ per 30 sec in ciascuna vaschetta Erlenmeyer da 25 ml), per 30' a 37°C sotto leggera agitazione. Al termine di tale periodo, a ciascuna vaschetta venivano aggiunti 0,5 ml del composto marcato (glutamato-C 14, glicina-C 14, L-lisina-C 14 alla concentrazione finale di 2 mM/L), e la incubazione veniva continuata per 3, 10, 30, 60, 120 minuti. Al termine dell'incubazione le retine venivano rapidamente raccolte per filtrazione del mezzo di incubazione, pesate, omogeneizzate in 2 ml di HClO₄ al 3% (peso/volume) e centrifugate. 0,5 ml di supernatante venivano mescolati a 15 ml di liquido di scintillazione Prockop-Ebert [20] e la radioattività contata in uno scintillatore Unilux della Nuclear Chicago. Le conte venivano paragonate ad uno standard di terreno contenente il composto marcato.

I valori del trasporto venivano calcolati come micromoli del composto presente nello spazio intracellulare in eccesso sulla concentrazione del composto nel terreno, secondo la formula: $\frac{(T - M \times E)}{I} - M$, dove T è la concentrazione del composto nel tessuto (micromoli del composto/ml H₂O del tessuto), M è la concentrazione del composto nel mezzo alla fine della incubazione (micromoli del composto/ml del mezzo), E è lo spazio extracellulare ed I lo spazio intracellulare. La composizione del terreno era quella descritta da Guarneri *et al.* [18].

Gli aminoacidi marcati erano prodotti dalla CEA (Gif-sur-Yvette, Francia); tutti gli altri composti erano reattivi « puri per analisi ».

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le Tabelle I e II riassumono i valori del trasporto attivo nelle due condizioni sperimentali descritte.

TABELLA I

Trasporto attivo di alcuni aminoacidi nella retina di ratto adulto, incubata in assenza di O₂ e di glucosio.

Tempo di incubazione, minuti	GLICINA 2 mM	LISINA 2 mM	Ac. GLUTAMICO 2 mM
3'	1.47 ± 0.46	—	1.4 ± 0,1
10'	4.98 ± 0.1	3.69 ± 0.835	5.64 ± 0.431
30'	12.08 ± 0.1	9.04 ± 0.402	12.68 ± 0.540
60'	11.98 ± 0.792	12.65 ± 1.720	16.16 ± 2.200
120'	—	—	18.93 ± 1.000

I valori sono espressi in micromoli intracellulari di amino-acido per ml di tessuto.

TABELLA II

Trasporto attivo di alcuni aminoacidi nella retina di ratto adulto, incubata in presenza di O₂ e di glucosio.

Tempo di incubazione, minuti	GLICINA 2 mM	LISINA 2 mM	Ac. GLUTAMICO 2 mM
3'	3.38 ± 0.586	—	5.8 ± 1.00
10'	10.57 ± 1.00	2.67 ± 0.727 P < 0.05	17.1 ± 1.95
30'	22.44 ± 2.02	5.95 ± 0.564 P < 0.01	36.05 ± 3.00
60'	35.01 ± 4.17	8.49 ± 1.530 P < 0.01	52 ± 4.52
120'	35.73 ± 4.40		46 ± 1.00

I valori sono espressi in micromoli intracellulari di amino-acido per ml di tessuto.

Nel caso della glicina e del glutamato, l'assenza di glucosio e di ossigeno incide sulla capacità di trasporto del sistema in misura pressoché equivalente sia in fase di flusso iniziale (velocità del sistema) sia in fase di raggiunto equilibrio.

Nel caso della lisina, i dati sperimentali meritano un commento a parte. I massimi valori del trasporto attivo di questo aminoacido sono stati misurati proprio in assenza di ossigeno e di glucosio. L'interpretazione del fenomeno rimane incerta. Appare, tuttavia, lecita una ipotesi che tenga conto della particolare organizzazione metabolica della retina [21-22]. Se la lisina riconosce nelle strutture trofiche della retina il proprio sistema di trasporto, e ciò è presumibile sulla base della scarsa inibizione del suo trasporto ad opera di KCN [23], si può supporre che l'attivazione da ossigeno e glucosio degli elementi funzionali induca un decremento della potenzialità di trasporto dell'aminoacido, in analogia con quanto è stato osservato in altri sistemi a duplice *pattern* morfofunzionale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. LAJTHA e J. TOTH, *The Brain Barrier System. II. Uptake and Transport of Amino Acids by the Brain*, « J. Neurochem. », 8, 216 (1961).
- [2] L. BATTISTIN, A. GRYNBAUM e A. LAJTHA, *Distribution and Uptake of Amino Acids in Various Regions of the Cat Brain in Vitro*, « Brain Res. », 29, 85 (1971).
- [3] G. LEVI, A. CHERAYIL e A. LAJTHA, « J. Neurochem. », 12, 757 (1965), cit. in A. LAJTHA, *Transport as Control Mechanism of Cerebral Metabolite Level*, « Progr. Brain Res. », 29, 201 (1968).
- [4] M. YAMAGUCHI, T. YANOS, T. YAMAGUCHI e A. LAJTHA, « J. Neurobiol. », 1, 419 (1970), cit. in Y. IBATA, F. PICCOLI e G. F. PAPPAS, *The Fine Structure of Incubated Brain Slices in Relation to Insulin Uptake*, « Anat. Rec. », 166, 322 (1970).

- [5] S. LAHIRI e A. LAJTHA, *Cerebral Amino Acid Transport in vitro. I. Some Requirements and Properties of Uptake*, « J. Neurochem. », **11**, 77 (1964).
- [6] L. BATTISTIN, A. GRYNBAUM e A. LAJTHA, *Energy Dependence of Amino Acid Uptake in Brain Slices*, « Brain Res. », **16**, 187 (1969).
- [7] M. BANAY-SCHWARTZ, L. PIRO e A. LAJTHA, *Relationship of ATP Levels to Amino Acid Transport in Slices of Mouse Brain*, « Arch. Biochem. Biophys. », **145**, 199 (1971).
- [8] G. GUROFF, W. KING e S. UDENFRIEND, *The Uptake of Tyrosine by Rat Brain in vitro*, « J. Biol. Chem. », **256**, 1773 (1961).
- [9] K. D. NEAME, « J. Neurochem. », **11**, 67 (1964), cit. in A. LAJTHA, in « Brain Edema », ed. J. Klatzo e F. Seitelberg, p. 367, Springer-Verlag, New York (1967).
- [10] A. LAJTHA, in « Brain Edema », ed. J. Klatzo e F. Seitelberg, p. 367, Springer-Verlag, New York (1967).
- [11] K. D. NEAME, *A comparison of the Transport Systems for Amino Acids in Brain, Intestine, Kidney and Tumour*, « Progr. Brain Res. », **29**, 185 (1968).
- [12] R. BLASBERG e A. LAJTHA, *Substrate Specificity of Steady-state Amino Acid Transport in Mouse Brain Slices*, « Arch. Biochem. Biophys. », **112**, 361 (1965).
- [13] A. LAJTHA e J. TOTH, *The Brain Barrier System. V. Stereospecificity of Amino Acid Uptake, Exchange and Efflux*, « J. Neurochem. », **10**, 909 (1963).
- [14] G. LEVI, G. BLASBERG e A. LAJTHA, *Substrate Specificity of Cerebral Amino Acid Exit in vitro*, « Arch. Biochem. Biophys. », **114**, 339 (1966).
- [15] R. BLASBERG e A. LAJTHA, *Heterogeneity of Mediated Transport Systems of Amino Acid Uptake in Brain*, « Brain Res. », **1**, 86 (1966).
- [16] T. W. NORTON e S. E. PADUSLO, *The Separation of the Glia*, « Science », **167**, 1143 (1970).
- [17] S. P. R. ROSE, in « *Handbook of Neurochemistry* », vol. 2. *Structural Neurochemistry*, ed. A. Lajtha, p. 183, Plenum Press, New York (1969).
- [18] R. GUARNERI, F. PONTE, F. PICCOLI e V. BONAVIDA, *Analisi dello spazio inulinico nella retina* (in corso di stampa).
- [19] V. BONAVIDA, F. PONTE e G. AMORE, *Neurochemical Studies on the Inherited Retinal Degeneration of the Rat, I*, « Vision Res. », **3**, 271 (1963).
- [20] R. BLASBERG e A. LAJTHA, *Substrate Specificity of Steady-State Amino Acid Transport in Mouse Brain Slices*, « Arch. Biochem. Biophys. », **112**, 361 (1965).
- [21] 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, Academic Press, New York (1965).
- [22] V. BONAVIDA, R. GUARNIERI e F. PONTE, *Neurochemical Studies on the Inherited Retinal Degeneration of the Rat, II*, « Vision Res. », **5**, 113 (1965).
- [23] F. PICCOLI, R. GUARNERI, F. PONTE e V. BONAVIDA, *In preparazione*.