
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ANDREA BRUNORI, MARK L. MAYER, KAZUHIDE
SUGIYAMA

**Effetto degli aminoacidi eccitatori (EAA) sulla
sopravvivenza di neuroni ippocampali di topo in
coltura: uno studio morfologico e quantitativo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 83 (1989), n.1, p. 327–333.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1989_8_83_1_327_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/>

Biochimica. — *Effetto degli aminoacidi eccitatori (EAA) sulla sopravvivenza di neuroni ippocampali di topo in coltura: uno studio morfologico e quantitativo.* Nota di ANDREA BRUNORI, MARK L. MAYER e KAZUhide SUGIYAMA, presentata (*) dal Corrisp. D. CAVALLINI.

ABSTRACT. — *Effect of excitatory amino acids (EAA) on neuronal survival of cultures of mouse hippocampus: a morphological and quantitative study.* The paper reports experimental data on the survival of neuronal cultures from mouse hippocampus, following exposure to the excitatory amino acids (L-Glu and L-Asp). The results obtained with quantitative estimates of neuronal density, with morphological observations and with immunohistochemical staining (for neuron specific enolase) indicate a toxic effect of excitatory amino acids, which is more severe on neurons with a higher density of specific receptors. Moreover the data show that neuronal damage is reduced in the presence of the antagonist Kynureic acid, and enhanced in the presence of glycine, an allosteric activator of the receptor.

KEY WORDS: Excitatory amino acids; Cell cultures; Neuronal damage.

RIASSUNTO. — Il lavoro riporta risultati sperimentali sulla sopravvivenza di cellule ippocampali di topo in coltura esposte agli aminoacidi eccitatori (L-Glu e L-Asp). I dati ottenuti con conte della densità neuronale, con osservazioni morfologiche e con metodi immunoistochimici (enolasi neuronale specifica) indicano un effetto tossico degli aminoacidi eccitatori, più marcato in cellule che hanno espresso un maggior numero di recettori specifici. Inoltre i risultati mostrano che il danno neuronale è ridotto in presenza dell'antagonista acido chinureico, ed aumentato in presenza di glicina, un attivatore allosterico del recettore.

INTRODUZIONE.

L'acido L-Glutammico (L-Glu) è conosciuto da circa trent'anni come neurotrasmettitore a carattere eccitatorio; è tuttavia solamente da pochi anni che lo studio degli EAA (excitatory amino acids) sta compiendo significativi progressi nella comprensione del loro meccanismo d'azione e del loro ruolo nei processi dello sviluppo, dell'apprendimento e nella patologia del sistema nervoso centrale. L'azione degli EAA (L-Glu e L-Asp) sulle strutture del SNC è mediata da quattro sistemi recettoriali comuni a tutti i mammiferi ed ugualmente presenti negli invertebrati, sebbene con caratteristiche diverse. Questi sono denominati: 1) NMDA; 2) Quisquilato; 3) Cainato; 4) L-AP4 (Cotman and Iversen, 1987). Questi recettori sono stati individuati attraverso l'uso di agonisti ed antagonisti (Watkins and Olverman, 1987) specifici da cui prendono il nome, quali: N-metil-D aspartato (un agonista di sintesi), l'Acido cainico, il Quisquilato, e fra gli antagonisti principalmente l'L-AP4 (acido L-2aminofosfonobutirrico), il D-AP5 (acido D-2amino5fosfonopentanoico) e l'acido chinureico (Ky). Inoltre, alcune sostanze sono state proposte come modulatori allosterici; fra queste la più studiata è la glicina (Gly) che agirebbe (Cotman *et al.*, 1987) su un recettore accoppiato all'NMDA sulla membrana citoplasmatica e codistribuito nell'ambito del Sistema Nervoso Centrale (SNC), incrementando la risposta all'attivazione dei recettori NMDA.

(*) Nella seduta del 26 novembre 1988.

Lo studio elettrofisiologico delle correnti generate dall'attivazione dei recettori NMDA, K e Q ha evidenziato in queste alcune caratteristiche (lunga durata, rigeneratività, entità proporzionale alla depolarizzazione) che hanno suggerito un ruolo delle sinapsi glutamergiche nei processi della plasticità, del comportamento, ma soprattutto nell'apprendimento (fenomeno dell'LTP «long term potentiation» (Collingridge and Bliss, 1987).

Solo recentemente alcune osservazioni hanno suggerito che i recettori coinvolti nella fisiologia attivazione delle sinapsi glutamergiche possono mediare il danno neuronale (Mayer and Westbrook, 1987; Choi *et al.*, 1987; Rothman and Olney, 1987). La stimolazione prolungata dei recettori NMDA e non NMDA provoca nei neuroni una serie di alterazioni che eventualmente precedono la lisi della cellula. Nella patogenesi del danno mediato da EAA, fondamentale importanza rivestirebbe l'abnorme flusso intracellulare di Ca^{++} promosso dall'eccessiva stimolazione del recettore NMDA. Rimane tutt'ora da stabilire il meccanismo con il quale il calcio innesca il danno irreversibile; è comunque interessante l'ipotesi che l'incremento dei livelli di calcio intracellulare influenzi positivamente l'attivazione dei recettori NMDA (meccanismo tipo feed-back positivo), la loro espressione e moduli il rilascio dell'L-Glu in sede presinaptica (Rothman and Olney, 1987).

Questo progetto di ricerca ha avuto come fine lo studio dell'effetto degli EAA sulla sopravvivenza di cellule ippocampali di topo in coltura. L'indagine è stata eseguita con tecniche immunostochimiche, colorazioni classiche e con marcatori fluorescenti per cellule vitali e non, seguite da conte per la quantificazione dell'eventuale effetto tossico.

MATERIALI E METODI.

Le colture cellulari sono state ottenute dall'ippocampo di feti di topo (XVI-XVII giorno di gestazione) (ceppo C57 BL6J) rimosso attraverso l'uso di tecniche di microdissezione. Queste sono state seminate su uno strato monocellulare di cellule gliali anch'esse ottenute da topi neonati, e cresciute in un mezzo di coltura contenente siero fetale bovino per un periodo di circa due settimane sino a confluenza. Le colture cellulari (a densità di 200 000 o 50 000 cellule/capsula di Petri da 35 mm) sono state cresciute per periodi di tempo variabili nei seguenti mezzi di coltura:

- 1) MEM (minimum essential medium) + 5% HS (siero equino) + N3 (fattori di crescita), che è il mezzo di coltura standard.
- 2) F-12 (soluzione salina contenente 100 μ M L-Glu, L-Asp, Gly, e 3 μ M Zn) + 5% HS + N3.
- 3) mezzo 2) + antagonisti (acido chinureico e AP5).
- 4) mezzo 1) + Gly (400 μ M).

Le colorazioni usate sono state: NSE (neuron specific enolase) tecnica immunostochimica basata sull'uso di anticorpi di coniglio diretti verso l'isoenzima enolasi specifica neuronale; soluzione di tripanblu al 2% in acqua distillata (provvedendo ad equilibrare il pH e la tonicità al fine di evitare il danno osmotico) per evidenziare le cellule non vitali e quindi incapaci di escludere il colorante; due marcatori fluorescenti: PI

(propidium iodide, specifico per cellule danneggiate irreversibilmente) e FDA (fluorescein diacetate, specifico per cellule vitali) che, eccitati a 450-490 nm, conferiscono alle cellule una fluorescenza rossa e verde rispettivamente (Jones and Kniss, 1987; Jones and Senft, 1985). Le conte sono state eseguite sulle colture trattate al microscopio ottico, eseguendo per ciascuna condizione un numero di osservazioni dell'ordine di 100.

RISULTATI.

La tossicità dell'F-12 è stata vagliata secondo due protocolli sperimentali diversi:

1) Tossicità acuta: dopo un periodo di 10-12 giorni di crescita nel mezzo standard le colture sono esposte al mezzo contenente F12, per un periodo di tempo variabile fra le 8 e le 16 h. Nell'ambito del protocollo acuto l'età delle colture variava da 2 a 4 settimane.

2) Tossicità cronica: rimuovendo il mezzo standard sin dal primo giorno di crescita e sostituendolo con F12 per un periodo di 10 e 15 giorni.

Le colture così trattate sono state quindi colorate e sottoposte alla conta. Come mostrano i grafici ricavati dai dati ottenuti dalle conte (fig. 1), la sopravvivenza dopo trattamento acuto varia da un valore minimo nelle colture di 4 settimane di età ad un valore massimo in quelle di 2, rispetto ai controlli. Inoltre si è notato un sensibile incremento della sopravvivenza quando l'esposizione all'F12 avveniva in presenza di 5% HS (sino al 50% ca.) rispetto alle condizioni in cui il siero non era presente. Per contrasto nel protocollo di trattamento cronico (verificato al giorno 10 o 15 di esposizione, fig. 1) la sopravvivenza è sempre prossima al 50% rispetto ai controlli, nonostante un «fisiologico» decremento nella densità assoluta dei neuroni dal giorno 10 al giorno 15. La verifica dell'efficacia degli antagonisti nella prevenzione del danno neuronale EAA mediato è stata ottenuta seguendo lo schema acuto sia nei confronti dell'F12 che di alcuni dei suoi componenti (L-Glu, L-Asp, Gly in concentrazioni analoghe a quelle presenti nell'F12) nel tentativo di discriminare quali fattori siano causa dell'effetto tossico. Gli antagonisti usati sono stati: acido chinureico (Ky 10 mM) e l'AP5, NMDA specifico. Il grafico riportato nella fig. 1 mostra come già nei controlli la tossicità dell'F12 sia molto più severa di quella L-Glu/L-Asp mediata e come il Ky protegga efficacemente le cellule solo in questo caso ma non contro l'F12. Inoltre la glicina incrementa la tossicità L-Glu/L-Asp mediata rispetto ai controlli.

Una serie di indagini a carattere morfologico ha completato la parte quantitativa degli esperimenti. Osservazioni al microscopio ottico ed a fluorescenza sono state compiute per documentare le variazioni indotte dai vari mezzi di coltura nella morfologia del neurone. A questo fine abbiamo usato tecniche del contrasto di fase e contrasto sec. Hoffmann per la microscopia ottica e l'eccitazione con luce di 450-490 nm per la microscopia a fluorescenza. Le microfotografie (fig. 2) mostrano cellule cresciute nei mezzi di coltura 1) e 2) (cfr. materiali e metodi). Oltre alle evidenti differenze di densità (notevolmente più elevata nel mezzo 1) rispetto al 2), si possono rilevare evidenti variazioni nello sviluppo e nella differenziazione delle cellule nervose specie per quanto riguarda assoni e dendriti.

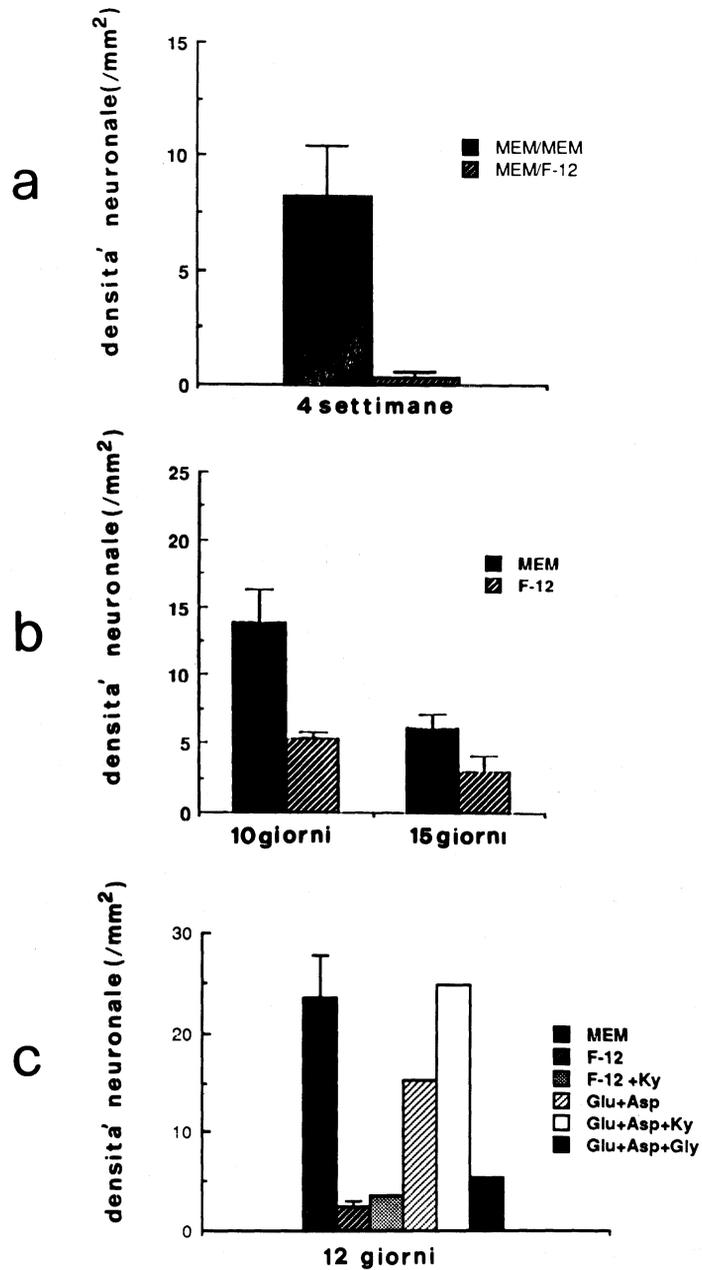


Fig. 1. - Istogrammi della densità neuronale in varie condizioni di crescita: (a) decremento della densità neuronale in seguito all'esposizione di colture mature (4 sett) al F12 sec. il protocollo di tossicità acuta; (b) nel caso di esposizione cronica al F12 la sopravvivenza è prossima al 50%; (c) mostra l'effetto dell'acido chinureico (Ky) nel ridurre sensibilmente il danno cellulare, e l'effetto potenziante della glicina (Gly).

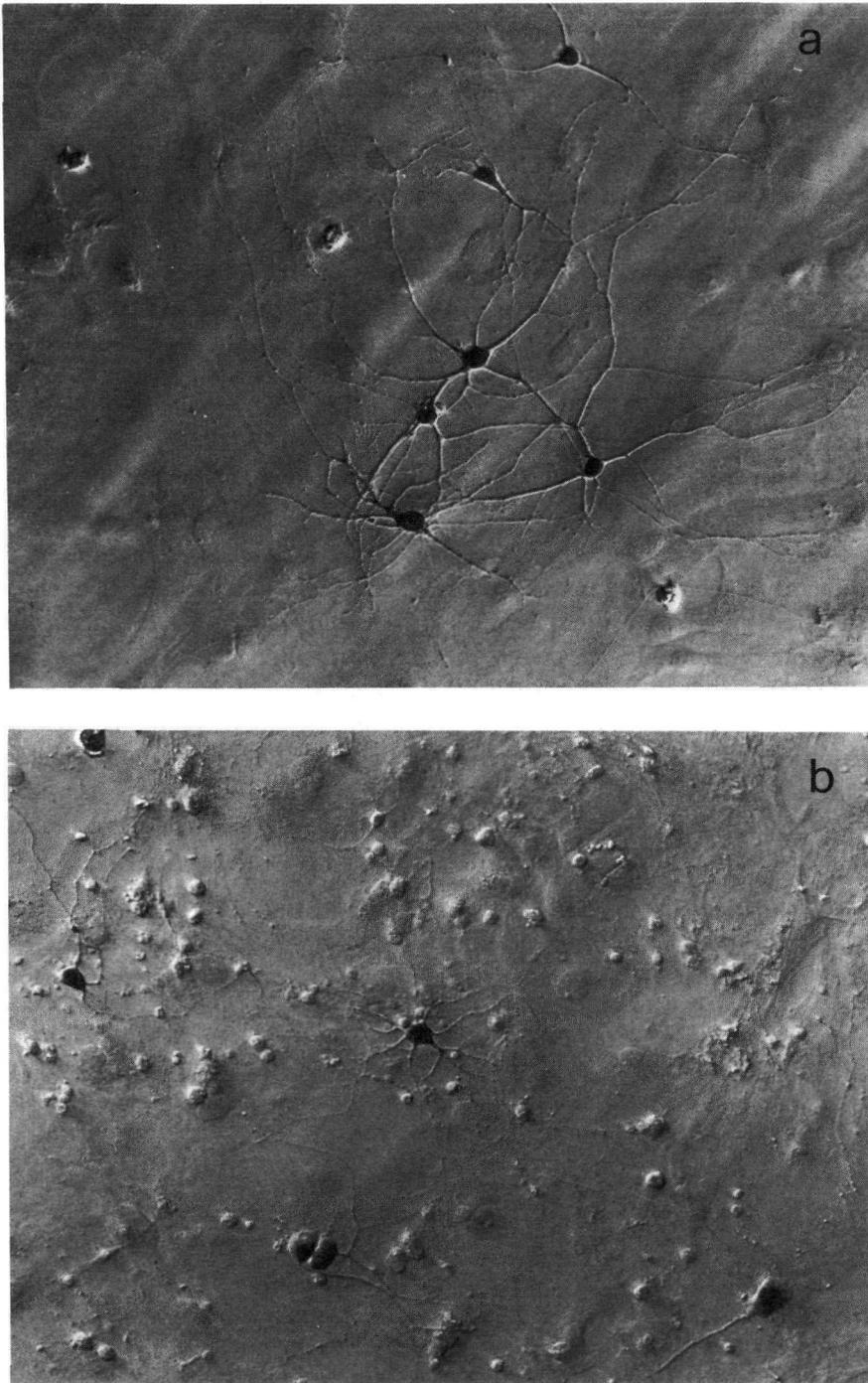


Fig. 2. – Microfotografie (20 \times , contrasto sec. Hoffmann) di colture colorate con NSE. Notare la differenza nella densità e nello sviluppo della trama assodendritica fra cellule cresciute nel mezzo standard (controllo, *a*) e quelle esposte al F12 sec. il protocollo di tossicità acuta (*b*).

CONCLUSIONI.

Dalle osservazioni compiute sulla tossicità dell'F12 possiamo trarre le seguenti conclusioni:

1) Questa soluzione è stata inequivocabilmente provata essere tossica per le cellule ippocampali di topo; anche se apparentemente dai nostri studi emerge che l'effetto dannoso è solamente in parte imputabile alla presenza nell'F12 degli EAA.

2) L'F12 in presenza di siero equino induce un effetto tossico meno severo che in assenza di questo. Diverse ipotesi possono essere formulate per spiegare questo risultato: *a)* La concentrazione del calcio libero è probabilmente maggiore in assenza di siero, in quanto una quota di questo è verosimilmente legata alle proteine; *b)* Il legame alle proteine del siero degli EAA presenti nel mezzo, il che li sottrarrebbe in parte all'interazione con i recettori di membrana; *c)* La presenza di fattori protettivi nel siero equino. Queste tre ipotesi non sono in contrasto tra di loro e potrebbero quindi essere tutte e tre esatte.

3) L'età delle cellule influisce sulla loro sensibilità alla tossicità indotta dagli EAA. Infatti le cellule di 4 settimane sono nettamente più sensibili di quelle di 2 settimane, ed inoltre la tossicità acuta è chiaramente più severa di quella indotta cronicamente. Si propone che questo risultato sia riconducibile al fatto che, con il procedere dei fenomeni differenziativi nel neurone, aumenta la densità dei recettori NMDA e non NMDA sulla membrana con conseguente alta disponibilità di siti per il legame con gli EAA. Pertanto cellule esposte al F12 in stadi precoci della differenziazione si adattano alle nuove condizioni ambientali (indubbiamente sfavorevoli), modulando in negativo l'espressione dei recettori stessi, possibilità che è preclusa a cellule già in via di differenziazione.

Per quanto riguarda gli effetti della Gly questi sono di difficile interpretazione e parzialmente inattesi, in quanto in assenza di EAA l'effetto modulatore della Gly non dovrebbe manifestarsi. In questo caso sarebbe quindi prematuro trarre conclusioni su fenomeni ancora oscuri e che richiedono indagini più accurate ed approfondite.

Ringraziamenti. A. Brunori ringrazia il Ministero della Pubblica Istruzione ed il FAES del N.I.H., Bethesda (USA) per una Borsa di Studio; lavoro discusso al «Forum per gli studenti e specializzandi della Facoltà di Medicina» 1988.

BIBLIOGRAFIA

- CHOI D. W., MAULUCCI-GEDDE M. and KRIEGSTEIN A. R., 1987. *Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture*. *Journal of Neurosciences*, 7: 357.
- COLLINGRIDGE G. L. and BLISS T. V. P., 1987. *NMDA receptors. Their role in Long term potentiation*. *Trends in Neurosciences*, 10: 288.
- COTMAN G. W. and IVERSEN L., 1987. *Excitatory amino acids in the brain: Focus on NMDA receptors*. *Trends in Neurosciences*, 10: 263.
- COTMAN C. W., MONAGHAN D. T., OTTERSEN O. P. and STORM-MATHISEN J., 1987. *Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways*. *Trends in Neurosciences*, 10: 273.
- JONES K. H. and KNISS D. A., 1987. *Propidium iodide as a nuclear counterstain for immunofluorescence studies on cells in culture*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 35: 123.

-
- JONES K. H. and SENFT J. A., 1985. *An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33: 77.
- MAYER M. L. and WESTBROOK G. L., 1987. *Cellular mechanisms underlying excitotoxicity*. *Trends in Neurosciences*, 10: 59.
- ROTHMAN S. M. and OLNEY J. W., 1987. *Excitotoxicity and the NMDA receptor*. *Trends in Neurosciences*, 10: 299.
- WATKINS J. C. and OLVERMAN H. J., 1987. *Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors*. *Trends in Neurosciences*, 10: 265.