
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ANNA FIORELLA VALENTINI, GIANCARLO CAROLI,
LUCIANO GIOVANELLI, OLIVIERO MARIO OLIVO

**Azione differenziale del tiopentale sodico su tessuti
embrionali diversi (miocardio e tessuto nervoso)
coltivati in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 49 (1970), n.5, p. 315–322.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_49_5_315_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/>

Citologia. — *Azione differenziale del tiopentale sodico su tessuti embrionali diversi (miocardio e tessuto nervoso) coltivati in vitro* (*).

Nota di ANNA FIORELLA VALENTINI, GIANCARLO CAROLI, LUCIANO GIOVANELLI e OLIVIERO MARIO OLIVO, presentata (**) dal Socio O. M. OLIVO.

SUMMARY. — The action of Farmotal action, at 0,1%–0,0001% concentration, was experimented on *in vitro* cultivated myocardium, lobi ottici and spinal ganglia.

0,01%–0,10% concentrations depressed myocardial cellular migration and proliferation; 0,04% concentration stopped contractile activity instantly.

Spinal ganglia and lobi ottici explants underwent regressive deterioration for 10 times over doses (0,002%–0,008%). Nerve fibres gave out hyaline buds, cells regressed and both disintegrated in the end.

Il tiopentale sodico (Farmotal della Farmitalia) è un tiobarbiturico di sintesi ampiamente utilizzato in anestesia. Chimicamente è un sale, risultante dalla combinazione di un acido debole con una base forte, che disciolto in acqua idrolizza dando una soluzione a reazione alcalina (pH 9–10) fotosensibile ed instabile, che va utilizzata entro 24 h dalla sua preparazione.

È assodato che le dosi ipnotiche di Farmotal agiscono soprattutto a livello mesodiencefalico e le dosi narcotiche su tutto il sistema nervoso centrale. Non si conosceva tuttavia l'attività di base del farmaco e la reazione di strutture semplici ed aggredibili ad un'indagine istomorfologica. Per questo in precedenti lavori [1], [2], [3], [4] abbiamo ritenuto opportuno renderci conto della sensibilità delle cellule coltivate *in vitro* al tiopentale sodico.

È stata nostra cura particolare, cercare di stabilire quali concentrazioni esplicassero un'azione su culture di miocardio, valutando il comportamento dell'attività migratoria, della proliferazione mitotica, dell'attività contrattile specifica e ricercando eventuali modificazioni morfologiche.

Per far questo abbiamo utilizzato la tecnica delle colture in goccia pendente su doppio copri-oggetto, sec. Maximow. Il terreno di coltura era costituito in parti uguali da plasma omologo ed estratto embrionale acquoso, ottenuto da embrioni di pollo di 9 g. di incubazione, al 10–20%. A tale substrato si addizionava il Farmotal in dosi tali da ottenere diluizioni terminali

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Umana Normale e Cattedra di Anestesiologia e Rianimazione di Bologna con finanziamento del C.N.R. (Contratto 70.01025/04).

(**) Nella seduta del 14 novembre 1970.

crescenti in scala logaritmica, di dieci volte, da 0,0001 % a 1 % e in scala aritmetica di 0,02 da 0,01 a 0,1 %, perché dopo i primi esperimenti si è potuto stabilire che è questo il gradiente di concentrazione efficace a livello cellulare, per quanto riguarda il tessuto miocardico.

Associando il tiopentale sodico al liquido di Hanks, che utilizziamo normalmente per diluire il farmaco in questione, all'estratto embrionale ed al plasma del terreno di coltura, si ottiene un'opportuna riduzione del pH del mezzo ambiente dagli iniziali valori nettamente alcalini e come tali non adatti ad un normale comportamento e sviluppo degli espianti. Abbiamo così rilevato un pH oscillante fra 7,8 e 6,9 a seconda della concentrazione di Farmotal.

Possiamo sistematicamente riferire che:

- 1) l'attività migratoria è depressa in maniera crescente per concentrazioni di tiopentale sodico comprese fra 0,01-0,1 %.
- 2) l'attività proliferativa è pure sensibile a concentrazioni comprese fra 0,01 % e 0,1 % ed è quasi nulla già a 0,08 %.
- 3) l'attività contrattile specifica, valutata costantemente rispetto a colture di controllo, è risultata ancora più sensibile all'azione del Farmotal che non le attività cellulari più elementari e generali sopra ricordate; si arresta infatti per concentrazioni di Farmotal di 0,02 % prima che nei controlli e si blocca immediatamente alla concentrazione di 0,04 %.

Per aver però un'azione nociva sulle strutture specifiche e una inibizione della formazione dei nastri contrattili, valgono le concentrazioni comprese fra 0,01 % e 0,1 %.

4) Da un punto di vista morfologico possiamo inoltre riferire che col crescere della concentrazione di tiopentale sodico, aumenta progressivamente e proporzionalmente la quantità di lipidi presenti nelle cellule. Vi deve quindi essere un'azione del Farmotal a livello cellulare che non interferisce tuttavia con le tre attività sopra ricordate.

I lipidi intracellulari sono particolarmente abbondanti nella corona di cellule marginali dell'area di migrazione, mentre non è raro riscontrare come le aree interne ne siano del tutto prive.

Dato che un processo analogo si verifica in colture normali, quando il terreno di coltura sia particolarmente ricco di lipidi, pensiamo che, anche sotto l'azione del Farmotal, questo accumulo di lipidi non sia espressione di un processo di degenerazione grassa, ma di assorbimento dal terreno. La tendenza inoltre di questi lipidi a confluire in gocce di dimensioni sempre più rilevanti ci fa ritenere che si tratti, prevalentemente, di acidi grassi e grassi neutri, anche se non possiamo affermarlo con assoluta certezza.

Pensiamo dunque di poter affermare che il Farmotal agisce sul metabolismo dei lipidi, anche in concentrazioni molto basse.

Non sappiamo tuttavia se sia il legame del farmaco ai lipidi a favorirne il passaggio all'interno delle cellule o se si tratti invece di una riduzione di attività enzimatiche specifiche. I lipidi comunque, una volta assorbiti, restano accumulati nel citoplasma come paraplasma inerte e non interferiscono con le altre attività cellulari (migrazione, sintesi del DNA e RNA, metabolismo dei glucidi e dei protidi).

È già noto del resto che il complesso processo della mitosi si compie normalmente anche in cellule cariche di lipidi.

Dato che il Farmotal, come già si è premesso, esplica un'azione elettiva sul sistema nervoso, quando è utilizzato in clinica come anestetico, ci è sembrato particolarmente interessante cercare di valutarne l'azione sul tessuto nervoso, soprattutto per vedere quali siano le concentrazioni tollerabili.

A questo punto dobbiamo ricordare che per saggiare tale tollerabilità noi utilizzeremo del tessuto nervoso embrionale coltivato *in vitro* che prosegue nei suoi fenomeni di accrescimento dei neuriti e differenziazione dei neuroblasti, mentre non sappiamo quanto conservi o abbia già in atto delle sue funzioni specifiche (formazione degli impulsi nervosi e loro conduzione).

Il nostro criterio di valutazione sarà perciò prevalentemente morfologico. In campo clinico invece si può valutare un'azione *in vivo* del farmaco, sulla complessa attività specifica di tutto un sistema: eccitabilità, impulsi nervosi dei neuroni, loro conduzione lungo i neuriti, loro trasmissione attraverso le sinapsi.

Per comprendere opportunamente le reazioni del tessuto nervoso coltivato *in vitro*, in particolare del materiale da noi utilizzato, lobi ottici e gangli spinali, all'azione del farmaco addizionato al terreno di coltura, ricordiamo brevemente il comportamento di preparati di tessuto nervoso di controllo (figg. 1-4-21).

Vediamo che espianti ottenuti da gangli spinali, già dopo alcune ore di coltura danno luogo alla migrazione di fibroblasti e all'accrescimento di neuriti con tendenza a formare dei plessi nell'ambito e in prossimità dell'espianto e tra le parti terminali delle fibre nervose.

Le fibre emergenti dai gangli hanno spesso decorso parallelo e si raccolgono in fasci. Accollati alle fibre si possono riconoscere elementi cellulari particolari in intimo rapporto con le fibre stesse e che si ritiene siano lemnoblasti. Particolare inoltre la tendenza delle fibre dei gangli a dare molte collaterali. In questi preparati, accanto ai neuroblasti sono presenti dei fibroblasti, la coesistenza di questi due stipiti cellulari ci permetterà di saggiarne comparativamente la risposta all'azione del tiopentale sodico, nelle diverse concentrazioni. Colture di gangli spinali possono sopravvivere per alcune settimane, prima di andare incontro a processi regressivi.

Gli espianti di lobi ottici si presentano come membranelle opalescenti; alla loro periferia già dopo alcune ore compaiono ciuffi di neuriti ad accrescimento radiale rettilineo ed indipendente per ogni singola fibra. Frequen-

temente nelle prime 24 h dall'allestimento delle colture, il coagulo di plasma ed estratto embrionale si stacca dall'espianto. I neuriti che vi erano già cresciuti restano stirati radialmente in questa area di scollamento, ma continuano a svilupparsi nella zona periferica del terreno di coltura.

Si è osservato che i neuriti immersi in questo ambiente liquido presentano più tardivamente i fenomeni degenerativi, sia quelli spontanei che quelli provocati precocemente da agenti nocivi. Pare che questo sia tuttavia dovuto alla maggior vicinanza al centro trofico, rappresentato dal pirenoforo.

A volte è possibile trovare nell'area di scollamento dei neuroblasti isolati che hanno l'aspetto di neuroblasti bipolari, tesi come sono fra il prolungamento nervoso periferico e il prolungamento nervoso che li collega all'espianto. Anche i preparati di lobi ottici si possono coltivare per alcune settimane e i neuriti raggiungono la lunghezza di 2-3 mm.

Dopo un certo periodo di tempo dunque compaiono i fenomeni regressivi: piccole varicosità ialine sul decorso dei neuriti, che si fanno sempre più rilevanti e rotondeggianti finché si staccano come sfere dal neurite. Questo o permane come filamento estremamente sottile o addirittura scompare. I neuriti tesi nella zona di scollamento si spezzano e restano liberi ad un'estremità, ondulati e fluttuanti nell'ambiente liquido per poi dissolversi. Inoltre con la degenerazione dei neuroblasti, tutto l'espianto si fa opaco e granuloso, infine si disgrega.

Abbiamo allestito, per questa parte della ricerca, colture di gangli spinali di 8-9 g. di incubazione e di lobi ottici da 4 a 9 g. di incubazione, con la tecnica già descritta. Al terreno di coltura costituito da plasma sanguigno omologo ed estratto embrionale acquoso, generalmente usato alla concentrazione di 0,025 %, si aggiungeva il tiopentale sodico, in modo da ottenere le concentrazioni volute per la sperimentazione. A volte si addizionava il farmaco agli espienti primari, a volte al successivo rifornimento oppure al momento del trapianto della coltura.

Inizialmente i preparati sono stati trattati con una serie di concentrazioni comprese fra 0,0001 % e 0,1 % e crescenti in scala logaritmica di 10 X e fra 0,02 % e 0,08 %, crescenti in scala aritmetica di 0,02.

L'esame microscopico ci ha permesso di rilevare che, mentre le concentrazioni più basse (0,0001 %) non provocano variazioni di comportamento e di sopravvivenza sensibili rispetto ai controlli (figg. 5-6), quelle più forti (ad esempio 0,01 %-0,02 %-0,08 %) provocano alterazioni massive ed immediate (figg. 7-10). La valutazione di questi primi risultati ci ha indirizzato a concentrazioni molto più deboli comprese fra 0,002 % e 0,008 % e crescenti in scala aritmetica di 0,002. Sono risultati questi infatti i valori critici di concentrazione di Farmotal già in grado di esplicare un'azione lesiva sugli espienti di tessuto nervoso (figg. 21-28).

Abbiamo esaminato complessivamente 356 colture di tessuto nervoso, giornalmente al microscopio ottico. Alcuni preparati invece sono stati osservati in contrasto di fase, poi eliminati. Altri ancora, e precisamente le colture

allestite con gangli spinali, dopo un esame a fresco orientativo, venivano trattate col metodo di Cajal-Esaki per l'impregnazione argentica.

Stabilito il gradiente di concentrazione utile a provocare una reazione da parte delle strutture nervose, si è visto che le alterazioni rilevabili sono sempre più accentuate, in misura direttamente proporzionale alla concentrazione stessa: i processi regressivi cioè sono tanto più precoci ed intensi quanto più alto è il grado di concentrazione di tiopentale sodico presente nel terreno di coltura. Questo vale tanto per i preparati allestiti con gangli spinali che per quelli ottenuti da lobi ottici. Ricordiamo tuttavia che, negli espianti di gangli spinali, accanto allo sviluppo di neuriti tipico, già descritto per i preparati di controllo, si ha la migrazione di fibroblasti. Quando abbiamo trattato queste colture con le concentrazioni di farmaco capaci di ledere le strutture nervose, e cioè i dosaggi compresi fra 0,002 % e, 0,008 %, è risultato che i fibroblasti conservano la loro integrità morfologica e funzionale, in quanto la loro soglia di reazione è per una dose di tiopentale sodico dieci volte più concentrata. Le alterazioni morfologiche che compaiono nei lobi ottici e nei gangli spinali in seguito alla somministrazione di Farmotal, non sono specifiche dell'azione del farmaco, ma sono le stesse che si possono rilevare in preparati di controllo coltivati per diverse settimane. È legata al Farmotal ed alla sua concentrazione invece, la precocità e l'intensità dei processi regressivi. Ricordiamo brevemente l'emissione di questa specie di gemme ialine, sul decorso dei neuriti, che si fanno di dimensioni sempre più rilevanti fino a quando come piccole sfere si staccano dalla fibra che, o resta come esilissimo filamento o si dissolve completamente. Intanto l'espianto si opacizza e si fa granuloso per la degenerazione dei neuroblasti, finché si disgrega. Abbiamo osservato che, trattando le colture primarie al momento dell'allestimento con concentrazioni di tiopentale sodico comprese fra 0,008 %-1 %, è del tutto inibito l'accrescimento dei neuriti nel terreno di coltura e l'espianto si opacizza già nelle prime 24 h di coltivazione. Se utilizziamo le stesse concentrazioni di Farmotal, su colture di tessuto nervoso già sviluppate da 48-72 h, si osserva una rapida degenerazione dei neuriti che in questo lasso di tempo si erano sviluppati *in vitro* e un'altrettanto rapida degenerazione dell'espianto.

Si è dunque stabilito che per un'azione lesiva sul tessuto nervoso, sono sufficienti concentrazioni di tiopentale sodico comprese fra 0,002 %-0,008 % (figg. 11-20, 22-28). Nell'ambito di questa scala le concentrazioni più basse, 0,002 % e 0,004 %, esplicano sulle strutture nervose un'azione tossica più lenta e meno massiva, tanto che consentono la persistenza e l'attività dei penicilli all'estremità dei neuriti (fig. 18).

L'opacizzazione degli espianti, che è l'espressione della loro alterazione, è verosimilmente legata alla depressione dei processi respiratori tissutali, per cui il tessuto degenererebbe per anossia.

Da questo complesso di osservazioni risulta che il neuroplasma embrionale è dieci volte più sensibile all'azione nociva del farmaco in questione che non elementi di diversa origine e natura, come ad esempio fibroblasti e mioblasti.

La particolare labilità osservata per i neuriti nei confronti del tiopentale sodico è probabilmente legata anche al fatto che non sono ancora mielinizzati.

Ricordiamo che il tiopentale sodico nell'organismo vivente, alle dosi utilizzate in campo clinico, agisce provocando una sospensione reversibile dell'attività funzionale specifica dei neuroni (eccitabilità, conducibilità...) e non sappiamo neppure con precisione se il livello d'azione del farmaco sia il carioplasma, la fibra nervosa o la sinapsi. Il materiale che noi abbiamo utilizzato *in vitro* è invece embrionale e come tale costituito da elementi in via di accrescimento e differenziazione.

Il tiopentale sodico quindi, utilizzato *in vitro* o *in vivo* agisce su due stati metabolici molto diversi: processi molto intensi e complessi nel primo caso, una funzionalità ben definita e stazionaria nel secondo.

Queste valutazioni ci inducono a non trasferire con troppa sicurezza le risultanze di questa sperimentazione al campo clinico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] VALENTINI A. F., L. GIOVANELLI, G. C. CAROLI e O. M. OLIVO, «Minerva Anestes.», 35, 916-928 (1969).
- [2] VALENTINI A. F., L. GIOVANELLI, G. C. CAROLI e O. M. OLIVO, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 45, 1243-1246 (1969).
- [3] CAROLI G. C., VALENTINI A. F., L. GIOVANELLI e O. M. OLIVO, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 45, 1247-1250 (1969).
- [4] GIOVANELLI L., VALENTINI A. F., G. C. CAROLI e O. M. OLIVO, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 45, 1251-1253 (1969).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-VII

TAVOLA I.

Fig. 1 e 2. - Colt. 163912 - Lobi ottici di g. 7, da 48 h *in vitro*. Controlli: area vicina all'espianto e fibre periferiche (ingr. 500×).

Fig. 3. - Colt. 157123. - Ganglio spinale di g. 9, da 8 g. *in vitro*. Controllo. Impregnazione argentea (ingr. 125×).

Fig. 4. - Stesso preparato della fig. 3 (ingr. 500×).

TAVOLA II.

Fig. 5. - Colt. 157125. - Ganglio spinale di g. 9, da 6 g. *in vitro*, negli ultimi 4 g. Farmotal 0.0001%. Cellula gangliare bipolare (ingr. 500×).

Fig. 6. - Stesso preparato della fig. 5. Fascetto di fibre periferiche (ingr. 500×).

- Fig. 7. – Colt. 157911 – Ganglio spinale di g. 8, da 9 g. *in vitro*, negli ultimi 4 g. Farmotal 0.01%. Frammentazione delle fibre (ingr. 500×).
- Fig. 8 – Colt. 157129 – Ganglio spinale di g. 9, da 6 g. *in vitro*, negli ultimi 4 g. Farmotal 0.01%. Frammentazione delle fibre (ingr. 500×).

TAVOLA III.

- Fig. 9. – Colt. 162865 – Lobi ottici di g. 6, da 6 g. *in vitro*, negli ultimi 3 g. Farmotal 0.02%. Aspetti di degenerazione (ingr. 500×).
- Fig. 10. – Colt. 162881 – Lobi ottici di g. 6, da 7 g. *in vitro*, ultimi 4 g. Farmotal 0.08%. Degenerazione massiva (ingr. 500×).
- Fig. 11. – Colt. 163936 – Lobi ottici di g. 7, da 3 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.008%. Sferette ialine eliminate dalle fibre nervose e loro disgregazione finale (ingr. 500×).
- Fig. 12. – Colt. 167087 – Lobi ottici di g. 5, da 6 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.008%. Varicosità lungo il decorso dei neuriti (ingr. 500×).

TAVOLA IV.

- Fig. 13 e 14. – Colt. 167086. – Lobi ottici di g. 5, da 6 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.006% (ingr. 500×).
- Fig. 15. – Colt. 167085. – Lobi ottici di g. 5, da 6 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.004% (ingr. 500×).
- Fig. 16. – Colt. 163925. – Lobi ottici di g. 7, da 48 h *in vitro* ultime 24 h Farmotal 0.004%. Neuroblasta bipolare, teso nella zona di scollamento (ingr. 500×).

TAVOLA V.

- Fig. 17. – Colt. 163921. – Lobi ottici di g. 7, da 3 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.002% (ingr. 500×).
- Fig. 18. – Colt. 167084. – Lobi ottici di g. 5, da 7 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.002%. Fibre in accrescimento, penicilli terminali (ingr. 500×).
- Fig. 19. – Colt. 163915. – Lobi ottici di g. 7, da 48 h *in vitro*, ultime 24 h Farmotal 0.001%.
- Fig. 20. – Colt 163917. – Lobi ottici di g. 7, da 3 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.001%. Caratteristica dei neuroblasti bipolari stirati nell'area di scollamento (ingr. 500×).

TAVOLA VI.

- Fig. 21. – Colt. 167083. – Lobi ottici di g. 5, da 6 g. *in vitro*, controllo, fibre periferiche (ingr. 500×).
- Fig. 22. – Colt. 167084. – Lobi ottici di g. 5, da 6 g. *in vitro* ultimi 2 g. Farmotal 0.002%. (ingr. 500×).
- Fig. 23 e 24. – Colt. 167085. – Lobi ottici di g. 5, da 6 g. *in vitro*. Numerose le varicosità ialine. Ultime 2 g. Farmotal 0.004% (ingr. 500×).

TAVOLA VII.

- Fig. 25 e 26. - Colt. 167086. - Lobi ottici di g. 5, da 6 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.006%. Esili filamenti neuritici e intensa degenerazione. Dei neuriti rimarranno soltanto catene di sferette ialine (ingr. 500×).
- Fig. 27 e 28. - Colt. 167087. - Lobi ottici di g. 5, da 6 g. *in vitro*, ultimi 2 g. Farmotal 0.008%. Alterazioni profonde dei neuriti e dei neuroblasti (ingr. 500×).













