
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

VINCENZO BONAVITA, FRANCESCO PONTE, GIUSEPPE
AMORE

Morfogenesi retinica ed eterogeneità molecolare della latticodeidrogenasi di ratto

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.6, p.
710–716.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_6_710_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. — *Morfogenesi retinica ed eterogeneità molecolare della latticodeidrogenasi di ratto* (*). Nota di VINCENZO BONAVITA, FRANCESCO PONTE e GIUSEPPE AMORE, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

Questa Nota riassume alcuni risultati di uno studio sulla evoluzione molecolare della latticodeidrogenasi ⁽¹⁾ di retina e diencefalo di ratto durante lo sviluppo post-natale. La retina, che completa la sua morfogenesi solo dopo la nascita [1, 2], suggerisce il tentativo di correlare eventi, normali o abnormali, della sua maturazione morfologica e fenomeni di differenziazione molecolare. Essa offre l'eccezionale possibilità di correlare tali eventi in elementi nervosi che subiscono una differenziazione morfo-funzionale del tutto peculiare. Nello studio della LDH di retina normale, questo tentativo è stato deludente, ma la retina di ratti con degenerazione spontanea ereditaria [3] ha dimostrato modificazioni cospicue delle proprietà elettroforetiche dell'enzima dopo la nascita ⁽²⁾.

Lowry et al. [4] hanno dato, con l'istochimica quantitativa, un contributo fondamentale alla citofisiologia della retina, dimostrando una distribuzione differenziata della LDH e di altri enzimi nei vari strati retinici. La presente indagine è stata compiuta, invece, sulla retina intera, ma i risultati descritti suggeriscono anche essi, in accordo con i dati dell'istochimica quantitativa, che «l'intensa glicolisi aerobica della intera retina sia una specie di artefatto risultante dalla mescolanza di cellule, o parti di cellule, di elevata capacità ossidativa con cellule di forte capacità glicolitica» [4].

In rapporto alla comune origine embriologica, è sembrato opportuno condurre uno studio parallelo sul diencefalo, ma, in netto contrasto con l'assenza di variazioni nella retina normale, esso ha rivelato modificazioni progressive delle proprietà elettroforetiche della LDH.

(*) Lavoro eseguito nella Clinica Neurologica e nella Clinica Oculistica dell'Università di Palermo, con un contributo (Grant B-2917) del National Institute of Neurological Diseases and Blindness, e con contributi del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Nella seduta del 13 giugno 1963.

(1) Le abbreviazioni usate sono le seguenti: LDH, latticodeidrogenasi; DPN, difosfopiridinucleotide; DPNH, difosfopiridinucleotide ridotto.

(2) Come è noto, BOURNE et al. [3], hanno isolato nel 1938 un ceppo di ratti con degenerazione retinica spontanea, trasmessa come carattere mendeliano recessivo, ed in cui la lesione anatomica interessa elettivamente gli strati più esterni della retina stessa (cellule visive).

PARTE SPERIMENTALE.

Preparazione degli estratti di retina e di diencefalo. — Sono stati usati ratti Wistar albini di entrambi i sessi, di età variabile dai 2 ai 120 giorni e ratti con degenerazione ereditaria della retina appartenenti al ceppo descritto da Bourne et al. [3]. Previa asportazione della cornea e del diaframma irido-lenticolare, la coppa sclerale veniva immersa in soluzione fisiologica a 2–4°C e la retina delicatamente separata dalla coroide. L'esame istologico delle retine prelevate con tale tecnica, fissate in liquido di Bouin e colorate con ematossilina-eosina, ha rivelato solo rarissimi frammenti di coroide asportata. Poiché con tale procedimento lo strato dell'epitelio pigmentato rimane adeso alla coroide, tutte le analisi compiute si riferiscono ai nove strati più interni della retina.

Le retine, subito dopo il prelievo, venivano conservate a — 25°C e scongelate una sola volta al momento della esecuzione delle analisi elettroforetiche. In un esperimento tipico, 5–6 retine di ratto adulto venivano omogeneizzate mediante apparecchio di Potter-Elvehjem, in un volume finale di circa 1 ml di H₂O bidistillata. Si eseguiva, quindi, centrifugazione a 16.000 g per 30 min in centrifuga Lourdes mod. LRA. Tutte le operazioni venivano svolte a 2–4°C. Nel caso di ratti in corso di sviluppo, il numero di retine omogeneizzate in 1 ml di H₂O era inversamente proporzionale all'età degli animali. Per il diencefalo la omogeneizzazione veniva eseguita in 2 volumi di H₂O bidistillata; il restante procedimento era identico.

Elettroforesi su gel di agar. — Essa è stata eseguita nelle condizioni sperimentali descritte da Grabar e Williams [5], con un tampone di veronal — HCl, 0,05 M, pH 8,4 su gels di 18 × 12 × 0,4 cm e con una intensità di corrente di 45–48 mA. Tempo di migrazione a 14–15°C: 3,5 h. L'eluizione dell'enzima dall'agar veniva eseguita secondo il procedimento descritto da Bonavita e Guarneri [6], che consente un recupero quasi completo (90–95 %). Il *pattern* isoenzimatico ottenuto su gel di agar per la LDH di diencefalo può essere duplicato su gel di amido nelle condizioni sperimentali descritte nel paragrafo seguente. L'enzima da retina, che dà un *pattern* altamente riproducibile su gel di amido ha, invece, un comportamento poco costante su gel di agar, imputabile forse al basso contenuto proteico degli estratti di retina. Per tale motivo, dopo numerosi tentativi preliminari, la LDH di retina è stata studiata solo su gel di amido.

Elettroforesi su gel di amido. — È stata eseguita nelle condizioni sperimentali descritte da Plagemann et al. [7], con modificazioni di minor conto. Il tempo di migrazione su piastre di 30 × 12,5 × 0,5 cm era di 14,5–15,0 h. In tale intervallo di tempo, l'emoglobina di bue, usata come indicatore visivo, migrava verso l'anodo di 5,3–5,5 cm. L'eluizione dell'enzima dal gel di amido veniva eseguita nelle stesse condizioni sperimentali descritte per

l'agar [6]. Il recupero della LDH nel supernatante era molto basso, oscillando tra il 27 ed il 30%. Tuttavia, la incubazione del gel di amido con amilasi [7], rivelava una distribuzione percentuale degli isoenzimi sostanzialmente simile a quella osservata dopo eluzione in tampone di fosfati di sodio, 0,45 M, pH 7,4. Si è concluso, pertanto, che quest'ultimo procedimento dà una rappresentazione abbastanza corretta delle proporzioni relative dei vari isoenzimi di LDH in organi diversi. Inoltre, come si è già notato prima, nel caso dell'enzima da diencefalo, si è ottenuta su gel di agar una perfetta riproduzione del *pattern* isoenzimatico osservato su gel di amido.

Determinazione dell'attività latticodeidrogenasica. - Sono stati usati piruvato di sodio ed acido lattico (*purum*) 40% (Fluka, Basilea). Il DPN e il DPNH erano prodotti Pabst (Milwaukee, Wisconsin). La riduzione del DPN e la ossidazione del DPNH sono state misurate con uno spettrofotometro Beckman DB, connesso ad un registratore Sargent mod. SRL, seguendo l'incremento ed il decremento della estinzione a 340 m μ .

Del DPN venivano usate 0,7 μ -moli in un volume finale di 3 ml, mentre del DPNH venivano usate solo 0,2 μ -moli. Le altre condizioni sperimentali erano quelle suggerite da Kornberg [8] per la riduzione del piruvato e quelle proposte da Neilands [9] per la deidrogenazione del lattato.

RISULTATI.

Nella fig. 1 è riportato il *pattern* isoenzimatico su gel di amido della LDH di retina di ratto adulto normale. Il paragone con il *pattern* della LDH

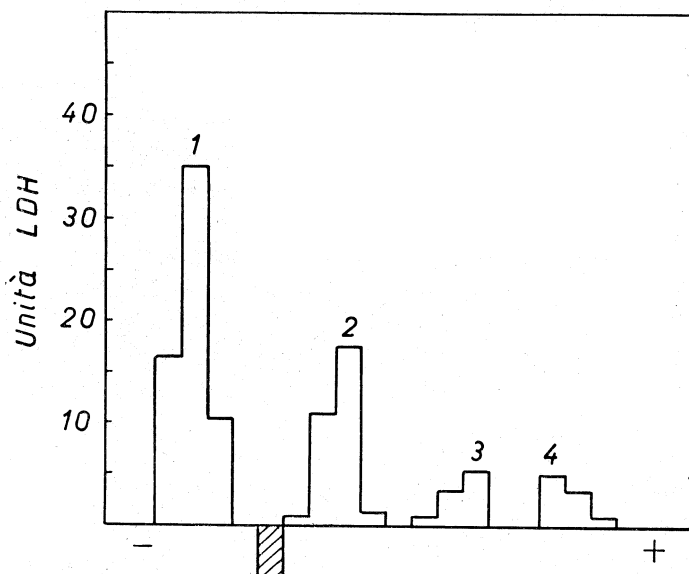


Fig. 1. - Separazione su gel di amido degli isoenzimi di LDH di retina di ratto adulto normale. Unità di attività latticodeidrogenasica (unità LDH) è la quantità di enzima che determina un decremento dell'estinzione a 340 m μ di 0,001 in 1 min. Per le condizioni sperimentali, si veda il testo. I rapporti percentuali medi tra gli isoenzimi 1, 2, 3 e 4 sono i seguenti: 55,8 : 28,9 : 7,7 : 7,6.

di diencefalo è molto interessante (fig. 2). A diversità della retina, il diencefalo contiene, infatti, un quinto isoenzima, che migra a grande velocità verso l'anodo. Non è da escludere che anche la retina contenga una piccola quantità di quest'ultima proteina e che l'esistenza di tale frazione non sia stata dimostrata per una insufficiente sensibilità del metodo di saggio. In ogni caso poiché la frazione 4, che non supera l'8%, è stata costantemente dimostrata in estratti di retina, è da ritenere che la eventuale quinta frazione sia molto più piccola in termini percentuali.

Oltre che per la diversa distribuzione percentuale degli isoenzimi costitutivi in età adulta, retina e diencefalo differiscono profondamente per le

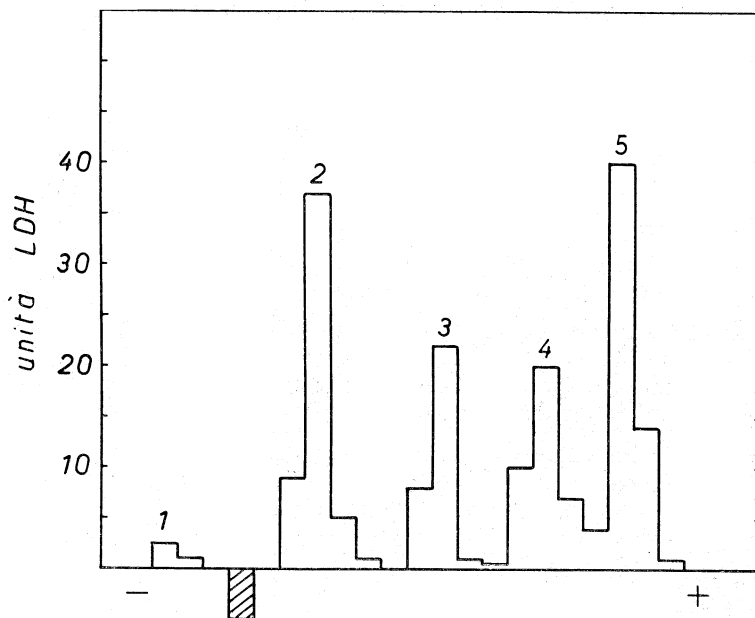


Fig. 2. - Separazione su gel di amido degli isoenzimi di LDH di diencefalo di ratto adulto normale.

Il diencefalo di ratti con degenerazione spontanea ereditaria non differisce dal diencefalo di animali normali per la composizione isoenzimatica della LDH.

caratteristiche elettroforetiche della LDH nel corso dello sviluppo post-natale. La LDH di retina non va incontro ad alcuna variazione dalla nascita all'età adulta. Non è così, invece, per il diencefalo, la cui LDH acquisisce la sua composizione definitiva dopo il 22° giorno dalla nascita.

Nella Tabella I è riportata la distribuzione percentuale degli isoenzimi della LDH di diencefalo di ratto a due giorni dopo la nascita ed in età adulta. Si può rilevare come le frazioni 2 e 5 siano quelle che vanno incontro alle variazioni maggiori.

Nei ratti con degenerazione ereditaria della retina, la LDH di quest'ultimo organo non si diversifica alla nascita dall'enzima presente in animali normali.

La fig. 3 dimostra, tuttavia, che nel corso dello sviluppo post-natale, la composizione isoenzimatica si altera progressivamente per un decremento graduale della frazione 1, cui fa riscontro l'incremento degli altri isoenzimi. Il paragone della fig. 4 con la fig. 1 fa rilevare la profonda differenza tra la LDH retinica di animali normali adulti e di ratti con degenerazione spontanea ereditaria. Questo aspetto della patologia molecolare retinica sarà argomento di descrizione accurata in un articolo successivo [17].

TABELLA I.

Composizione isoenzimatica della LDH di diencefalo di ratto a due giorni dopo la nascita ed in età adulta ().*

Età	Distribuzione percentuale degli isoenzimi				
	1	2	3	4	5
Due giorni dopo la nascita	3,0	52,0	22,7	15,6	6,7
Quattro mesi dopo la nascita	2,0	28,0	17,0	21,0	32,0

(*) I valori riportati in questa tavola rappresentano le medie di almeno tre determinazioni su gruppi di tre-quattro diencefali. Un'analisi statistica della variabilità nella distribuzione percentuale degli isoenzimi di LDH è stata descritta in un precedente lavoro [10].

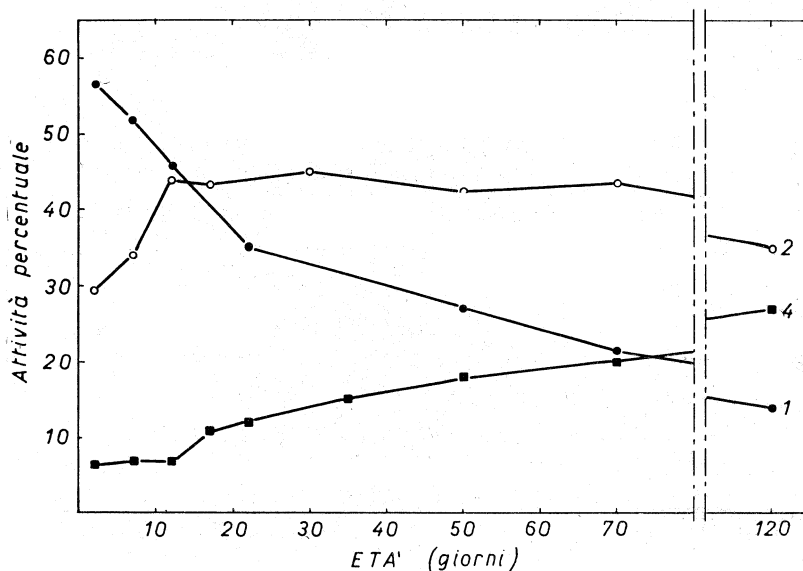


Fig. 3. - Variazioni nell'attività percentuale di tre isoenzimi di LDH di retina di ratto.

Degenerazione spontanea ereditaria durante lo sviluppo post-natale.

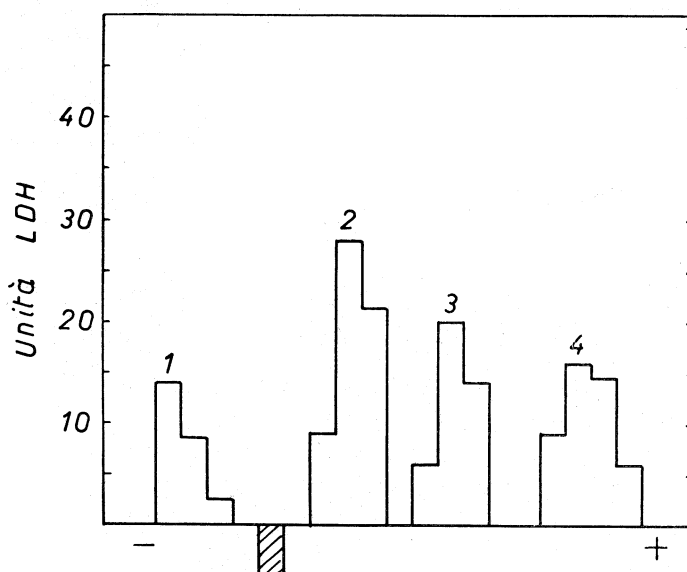


Fig. 4. - Separazione su gel di amido degli isoenzimi di LDH di retina di ratto adulto.

Degenerazione spontanea ereditaria. I rapporti percentuali medi tra gli isoenzimi 1, 2, 3 e 4 sono i seguenti:

15,1 : 34,9 : 24,1 : 25,9.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

I risultati descritti in questa Nota meritano un breve commento. Bonavita et al. [10] hanno studiato di recente l'evoluzione del *pattern* isoenzimatico della LDH dell'encefalo totale di ratto durante l'ontogenesi post-natale. Sebbene il diencefalo si diversifichi dalle altre strutture encefaliche per il *pattern* elettroforetico finale e per la più grande velocità di maturazione [11], deve essere sottolineata la sostanziale somiglianza tra esso e le altre aree encefaliche nella maturazione post-natale della LDH. Al contrario, malgrado la comune derivazione embriologica, la retina normale non modifica, dopo la nascita, la composizione isoenzimatica della sua LDH. Se le osservazioni sull'enzima da encefalo e diencefalo suggeriscono, pertanto, un parallelismo tra morfogenesi e maturazione molecolare, i risultati ottenuti con la retina suggeriscono l'ipotesi opposta. In verità, anche le osservazioni compiute sulla retina di ratti con degenerazione ereditaria dimostrano che l'evoluzione delle caratteristiche chimiche e quella delle alterazioni morfologiche dell'organo non sono contemporanee.

Secondo la classica descrizione istologica di Lucas et al. [2], nei ratti con degenerazione ereditaria, la retina si sviluppa normalmente fino al 14° giorno circa. Solo in tale stadio, quando cioè i bastoncelli sono all'apice della loro curva di sviluppo, « i segmenti distali vanno incontro ad improvvisa rottura e formano masse amorfe di detriti eosinofili ». Al contrario, l'altera-

zione del *pattern* isoenzimatico della LDH è estremamente precoce nella retina di tali animali, osservandosi un netto decremento del valore percentuale dell'isoenzima 1 già prima del 10° giorno di vita extrauterina (fig. 3).

In verità la variazione del *pattern* isoenzimatico della LDH nella retina di ratti con degenerazione ereditaria è anche più precoce del decremento della glicolisi [12, 13] e della scomparsa dell'elettroretinogramma [14], per la cui genesi Noell [15] ha attribuito particolare importanza alla glicolisi stessa.

È stato sostenuto di recente che l'isoenzima 1, che prevale anche nel muscolo scheletrico, caratterizza tessuti di elevata capacità glicolitica, e che l'isoenzima 5 e le forme ibride correlate caratterizzano invece tessuti come quello cardiaco, la cui efficienza funzionale è più strettamente dipendente da un elevato consumo di ossigeno [16]. Se tale affermazione è valida, l'elevato valore percentuale, nella retina intera, del primo tipo di isoenzima suggerisce, in accordo con i dati della istochimica quantitativa, che la LDH sia localizzata a preferenza in tipi cellulari a « metabolismo glicolitico prevalente ».

A tale proposito è da notare che un'accurata analisi cinetica della LDH durante lo sviluppo di retina e diencefalo [11, 17], ha documentato che le differenze regionali ed ontogenetiche, osservate nella composizione isoenzimatica, sono correlate a differenti proprietà catalitiche dell'enzima, la cui importanza può essere notevole anche quando le differenze stesse sono lievi.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] S. R. DETWILER, « J. Comp. Neurol. », 55, 473 (1932).
- [2] D. R. LUCAS, M. ATTFIELD e J. B. DAVEY, « J. Pathol. Bacteriol. », 70, 469 (1955).
- [3] M. C. BOURNE, D. A. CAMPBELL e K. TANSLEY, « Brit. J. Ophth. », 22, 613 (1938).
- [4] O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS e CH. LEWIS, « J. Biol. Chem. », 220, 879 (1956).
- [5] P. GRABAR e C. A. WILLIAMS, « Biochim. Biophys. Acta », 17, 67 (1955).
- [6] V. BONAVITA e R. GUARNERI, « Biochim. Biophys. Acta », 59, 634 (1962).
- [7] P. G. W. PLAGEMANN, K. F. GREGORY e F. WROBLEWSKI, « J. Biol. Chem. », 235, 2282 (1960).
- [8] A. KORNBERG, in S. P. COLOWICK e N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. I, p. 441. Academic Press Inc., New York 1955.
- [9] J. B. NEILANDS, in S. P. COLOWICK e N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. I, p. 449. Academic Press Inc., New York 1955.
- [10] V. BONAVITA, F. PONTE e G. AMORE, « Nature », 196, 576 (1962).
- [11] V. BONAVITA, F. PONTE e G. AMORE (in preparazione).
- [12] H. W. READING e A. SORSBY, « Vision Res », 2, 315 (1962).
- [13] J. BROTHERTON, « Exp. Eye Res. », 1, 234 (1962).
- [14] A. RUBINO e F. PONTE, « Giorn. It. Oftalm. », 14, 147 (1961).
- [15] W. K. NOELL, « Ann. N. Y. Acad. Sci. », 74, 337 (1958).
- [16] R. D. CAHN, N. O. KAPLAN, L. LEVINE e E. ZWILLING, « Science », 136, 962 (1962).
- [17] V. BONAVITA, F. PONTE e G. AMORE (in preparazione).