

* Istituto di Clinica Oculistica dell'Università di Padova
Direttore: Prof. F. D'Ermo

** Istituto di Anatomia Umana normale dell'Università di Padova
Direttore: Prof. P.F. Munari

S. PIERMAROCCHI *, A.S. BELLONI **, I. FREGONA *, A.G. SECCHI *

TECNICA DI PREPARAZIONE DI COLTURE CELLULARI
PRIMARIE IN MONOSTRATO DI EPITELIO PIGMENTATO
RETINICO DA CONIGLIO NEONATO

Estratto da:

BOLLETTINO DI OCULISTICA

Anno 60 - N. 9-10 - 1981
Cappelli editore - Bologna

TECNICA DI PREPARAZIONE DI COLTURE CELLULARI PRIMARIE IN MONOSTRATO DI EPITELIO PIGMENTATO RETINICO DA CONIGLIO NEONATO

S. PIERMAROCCHI *, A.S. BELLONI **, I. FREGONA *, A.G. SECCHI *

* Istituto di Clinica Oculistica dell'Università di Padova
Direttore: Prof. F. D'Ermo

** Istituto di Anatomia Umana normale dell'Università di Padova
Direttore: Prof. P.F. Munari

L'epitelio pigmentato retinico (EPR) rappresenta un costituente fondamentale della retina di mammifero. Una delle sue principali funzioni sembra sia quella di fagocitare i segmenti esterni di coni e bastoncelli al fine di garantire un adeguato rinnovamento dei fotorecettori (1). Altre azioni riguardanti il metabolismo ed il trasporto della vitamina A sono state descritte da numerosi Autori (2), ma la difficoltà di ottenere quantità apprezzabili di materiale sperimentale « in vivo » ed « in vitro » rende le notizie in merito largamente incomplete. Nel presente lavoro esponiamo un metodo semplice per allestire colture cellulari primarie di EPR di coniglio neonato, in grado di fornire un modello sperimentalmente valido per lo studio dei suoi aspetti metabolici.

MATERIALI E METODI

Il medium di coltura utilizzato è costituito da Eagle's MEM (minimum essential medium) (Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England) addizionato con 20% di FCS (fetal calf serum) (Flow Laboratories, Ltd, Irvine, Scotland) precedentemente inattivato a 56°C per 30 minuti; al terreno vengono aggiunti 50 µg/ml di cefaloridina (Eli Lilly Italia Spa, Firenze), 50 µg/ml di Streptomina (Farmitalia Spa, Padova), 25 UI/ml di nistatina (Squibb Italia Spa, Padova); viene raggiunto il pH di 7.2 mediante l'aggiunta di soluzione all'8% di NaHCO₃. Per ottenere la dissociazione del tessuto vengono utilizzate soluzioni di Eagle's MEM senza Ca e con tripsina allo 0.1%

Chemical Co., St. Louis, USA), BSS (balanced salt solution) senza Ca e Mg e con tripsina e versene (EDTA). Dopo aver sacrificato neonati di conigli leprati dell'età media di 2 giorni mediante inalazione di etere, se ne prelevano asetticamente gli occhi che vengono trasferiti in Eagle's MEM (-Ca) a 4°C per 12-24 ore ed in Eagle's MEM (-Ca) con tripsina a 37°C per un'ora. Incisi quindi i bulbi a livello dell'ora serrata, vengono eliminati segmento anteriore, vitreo e retina; le coppe posteriori vengono incubate a 37°C per 20 minuti in BSS-tripsina-versene senza Ca e Mg. L'EPR viene successivamente isolato con una spatola e due centrifugazioni successive (500 rpm per 5') con aggiunta di FBS (fetal bovine serum) (Flow Laboratories Ltd, Irvine, Scotland) per bloccare l'azione della tripsina residua, portano all'isolamento del sedimento di cellule di EPR. Utilizzando la tecnica di Fulton descritta come « squash-method » (3), il se-

dimento viene risospeso in 1 ml di medium con 20% di FBS che viene distribuito in 16 piccole gocce su piastra di Perspex sterile. Ogni goccia viene coperta con un dischetto di polietilene (Visqueen Ltd, Stevenage, Serts, England) di 13 mm di diametro, bagnato in plasma coagulante di topo; le cellule restano così ancorate sui dischetti che sono subito trasferiti in 16 piccoli pozzetti riempiti di medium e saldati sul fondo di una capsula Petri modificata che viene posta in termostato a 35°C in aria con 5% CO₂ (4).

RISULTATI

Il pretrattamento degli occhi in medium senza Ca e successivamente in medium senza Ca e Mg ma con tripsina e versene, facilita lo scollamento dell'EPR (5) che osservato a fresco ha il tipico aspetto ad acciottolato (fig. 1a): le cellule sono esagonali, ricche in pigmento e pre-

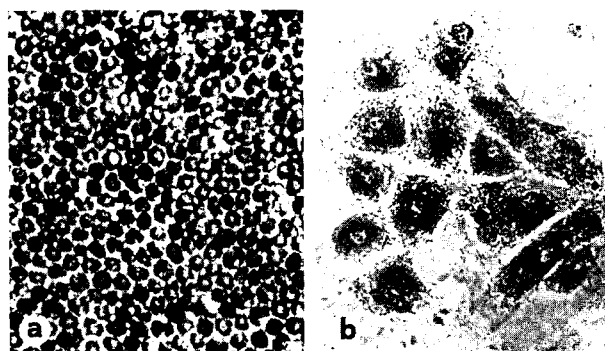


Fig. 1 - a) aspetto dell'EPR isolato prima della dissociazione per la semina nel terreno di coltura; è evidente la tipica forma esagonale e l'abbondante pigmentazione; contrasto di fase; 150x b) isolotto di cellule di EPR a 24 ore dalla semina; contrasto di fase; 500x.

Tecnica di preparazione di colture cellulari primarie in monostrato, ecc.

sentano goccioline lipidiche citoplasmatiche di comune riscontro nell'EPR di molti roditori. Appena seminate le cellule mantengono quest'aspetto e quelle che sopravvivono dopo le prime ore si organizzano in isolotti di elementi con citoplasma contratto (fig. 1b) e ricco in pigmento che le rende difficilmente osservabili con la tecnica del

contrasto di fase e refrattarie alla fluorescenza con l'arancio di acridina che viene per gran parte mascherata dal pigmento. Intorno all'8° giorno le cellule mostrano adattamento al nuovo ambiente con isolotti più grandi e contenenti meno pigmento (fig. 2a-2b); conseguentemente si ha una migliore evidenziazione dei nuclei. Dopo circa 15



Fig. 2 - a b- monostrato di cellule dopo 8 giorni di sopravvivenza in vitro; osservazione con microscopio a fluorescenza dopo colorazione con arancio di acridina; a: 500x; b: 800x.

giorni nelle colture comincia a riformarsi il pigmento che è più abbondante al centro degli isolotti ove le cellule hanno stabilito stretti contatti (fig. 3a). A maggiore ingrandimento le cellule mostrano un citoplasma disteso con nucleo spostato eccentricamente; come si riscontra in vivo coesistono forme mono e bi-nucleate, mentre quelle polinucleate sono rare e reperibili peraltro solo alla periferia (fig. 3b-3c); inoltre in questa fase di attiva prolifera-

zione sono frequentemente osservabili figure mitotiche. Al 20° giorno il monostrato appare continuo con organizzazione caratteristica: il pigmento che è scarso alla periferia dell'isolotto, va via via aumentando verso il centro ove le cellule, arrangiate a mosaico, sono più piccole e molto pigmentate, con apparato di Golgi ben evidente in zona paranucleare e ricordano l'aspetto morfologico tipico dei comuni preparati istologici di EPR (fig. 4). Lo studio

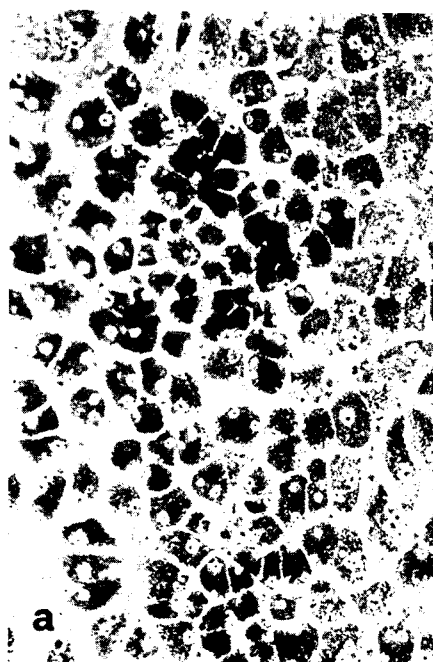
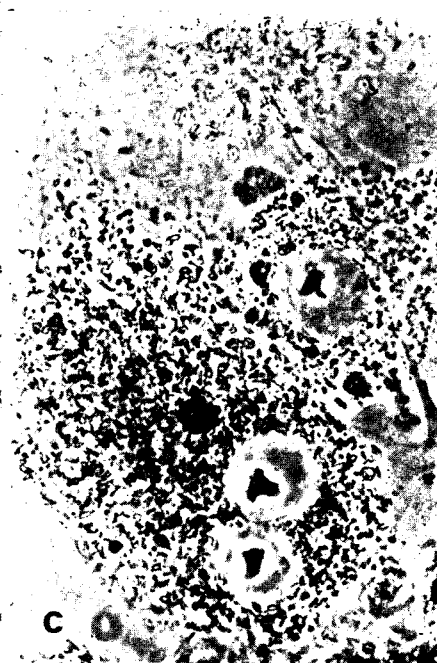


Fig. 3 - a, tappeto in monostrato di cellule di EPR dopo 15 giorni di permanenza in vitro; è evidente nella porzione centrale dell'isolotto una densa pigmentazione; colorazione con acetato di uranile osservazione in contrasto di fase; 250x b,c) alcune cellule mono e bi-nucleare con citoplasma ricco in pigmento; colorazione con acetato di uranile; contrasto di fase; 1500x.



Tecnica di preparazione di colture cellulari primarie in monostrato, ecc.

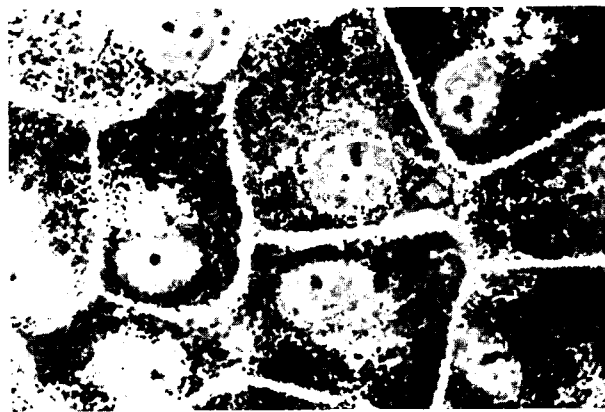


Fig. 4 - Cellule di EPR al 20° giorno in vitro: ben evidente il monostrato continuo di elementi a stretto contatto con apparato di Golgi visibile in regione paranucleare; colorazione con blu di toluidina osservazione in contrasto di fase; 1500x.

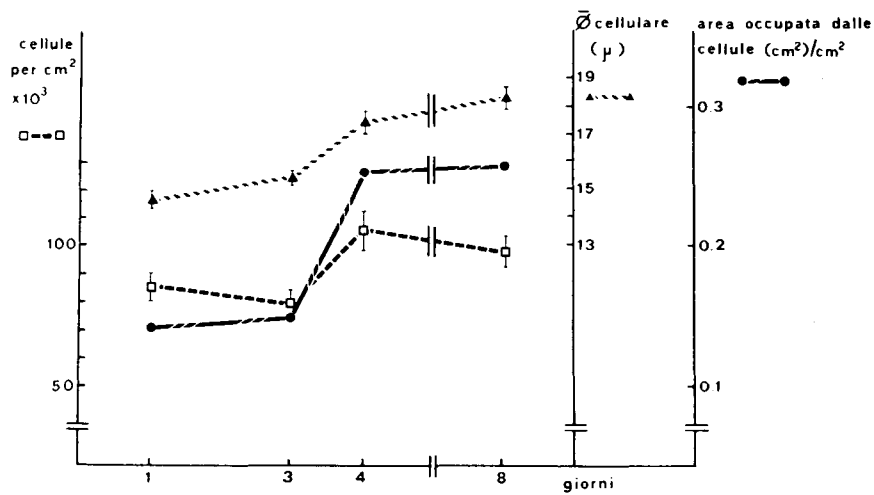


Fig. 5 - Variazione dei parametri cellulari (numero delle cellule, diametro cellulare medio, densità cellulare) in funzione del tempo in colture cellulari primarie di cellule di EPR di coniglio neonato (discussione nel testo).

della crescita delle colture ha evidenziato un incremento nel numero delle cellule più importante fra il 3° ed il 4° giorno, fino a raggiungere conte di circa 100.000 cellule per cm², che si sono poi più o meno mantenute nei tempi successivi. Anche il diametro cellulare medio subisce un costante incremento: le cellule che a 24 ore dalla semina misurano circa 14 μ , raggiungono i 18 μ all'8° giorno di crescita; di conseguenza la superficie totale delle cellule sul dischetto, considerato come parametro più significativo di crescita, subisce un aumento costante.

CONCLUSIONI

L'allestimento di colture pure di EPR consente di studiare il comportamento delle cellule in un ambiente controllato artificialmente, in condizioni riproducibili ed eliminando le interferenze di altri tipi cellulari. Nel passato sono stati fatti diversi tentativi per allestire colture « in vitro » di EPR, ma solo recentemente si è arrivati ad approntare tecniche in grado di mantenere sufficiente istospecificità delle cellule di EPR di mammifero (5, 6, 7); mancano tuttavia dati quantitativi che dimostrino la maturità biochimica di tali cellule « in vitro ». La funzione di fagocitosi per i segmenti esterni dei fotorecettori, al fine di

garantirne un adeguato rinnovamento (8, 9, 10, 11), e quella di immagazzinamento della vitamina A sembrano ora abbastanza chiarite. Tuttavia la scarsità di dati esistenti sulla fisiologia dell'EPR sembra connessa ai problemi tecnici derivanti dalla sua difficile manipolazione « in vivo » e dalle interferenze provocate dai tessuti adiacenti (7). Parte di queste difficoltà possono essere superate preparando colture cellulari primarie di EPR il cui allestimento non è tuttavia privo di problemi tecnici legati essenzialmente 1) alla separazione dell'EPR dalla retina e dalla membrana di Bruch al fine di evitare contaminazione da parte di altri tipi cellulari, 2) alla dissociazione delle cellule prelevate senza utilizzare enzimi istolitici eccessivamente lesivi, 3) all'ottenimento di un elevato numero di colture che forniscano dati statisticamente significativi e che siano facilmente riproducibili nelle metodiche. Così, per facilitare l'isolamento dell'EPR, abbiamo utilizzato, oltre alle comuni tecniche enzimatiche, incubazioni dei globi interi e parzialmente escissi in terreno senza Ca ed in terreno senza Ca e Mg e con tripsina e versene. Lo « squash-method » di Fulton, oltre a garantire un perfetto ancoraggio iniziale delle cellule, permette di preparare da pochi animali donatori un numero elevato di colture di separazione (16 nel nostro caso)

Tecnica di preparazione di colture cellulari primarie in monostrato, ecc.

dove i dischetti di polietilene recanti le cellule possono essere facilmente manipolati per usi sperimentali diversi; inoltre la facilità di preparare campioni per studi al microscopio ottico ed elettronico rende a nostro avviso questo metodo di coltura un nuovo ed utile strumento per lo studio degli aspetti fisiologici e patologici dell'EPR.

RIASSUNTO

Gli Autori descrivono un metodo semplice e riproducibile per la preparazione di colture cellulari primarie di epitelio pigmentato retinico di coniglio neonato. L'incubazione dei globi interi e parzialmente escissi in terreno senza Ca e senza Ca e Mg con tripsina-versene favorisce l'isolamento dell'EPR dai tessuti circostanti; lo « squash-method » di Fulton permette di ottenere da pochi animali donatori numerose colture che possono essere facilmente utilizzate per studi morfologici e biochimici.

Parole chiave: *Colture cellulari, epitelio pigmentato retinico.*

SUMMARY

Piermarocchi S., Belloni A.S., Fregona I., Secchi A.G.: *Technique for preparation of primary cell culture in monolayer of retinal pigment epithelium from neonatal rabbit.*

A simple and reproducible method for preparation of primary cell culture of Retinal Pigment Epithelium (RPE) from neonatal rabbit is described. Incubation of eyeballs in culture without Ca and without Ca and Mg plus trypsin-EDTA improves the separation of the RPE from the adjoining tissues; the « squash-method » described by Fulton allows a high number of samples from few donors and cultures which may be used for morphological and biochemical investigations.

Key words: *Cell culture, retinal pigment epithelium.*

BIBLIOGRAFIA

- (1) Young R.W.: *Visual cells and concept of renewal*, « Invest. Ophthalmol. », 15/9, 700, 1976.
- (2) Chen C., Heller J.: *Uptake of Retinol and Retinoic Acid from Serum Retinol-binding Protein by RPE cells*, « J. Biol. Chem. », 252/15, 5216, 1977.
- (3) Fulton F.: *Tissue culture on polythene*, « J. Gen. Microbiol. », 22, 416, 1960.
- (4) Armato U.: *Primary tissue culture of Normal Adult Human and Rat Adrenocortical cells from Zona Fasciculata and Reticularis*, « Procedure 47636 Tca Manual », 2/4, 467, 1976.
- (5) Edwards R.B.: *Culture of rat Retinal Pigment Epithelium*, « In Vitro », 13/5, 301, 1977.
- (6) Hayashi M., Asayama K., Ueno S.: *Tissue culture of the Retinal Pigment E-*

pithelial cells, « Acta Ophthalmologica », 56, 83, 1978.

(7) Albert D.M., Tso M.O.M., Rabson A.S.: *In vitro growth of pure cultures of Retinal Pigment Epithelium*, « Arch. Ophthal. », 88, 63, 1972.

(8) La Vail M.M.: *Rod outer segment disc shedding in relation to cyclic lighting*, « Exp. Eye Res. », 23, 277, 1976.

(9) Tamai M., O'Brien P.J.: *Retinal dystrophy in the RCS rat: in vivo and in vitro studies of phagocytic action of the*

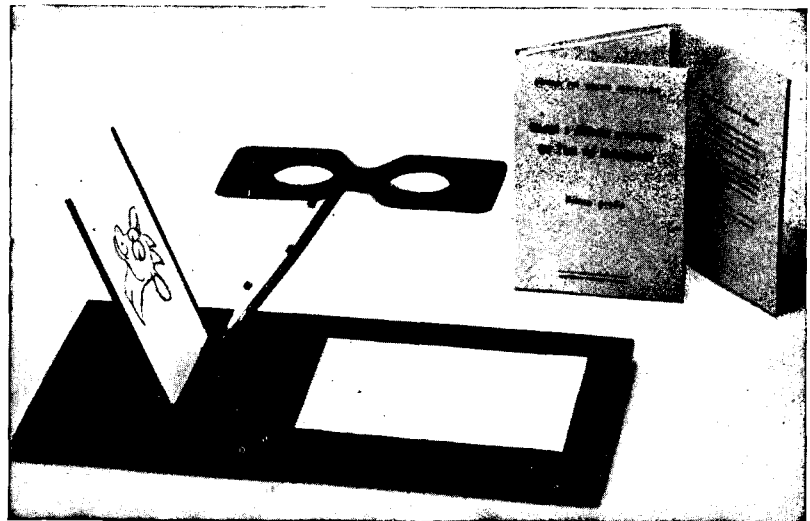
Pigment Epithelium on the shed rod outer segments, « Exp. Eye Res. », 28, 399, 1979.

(10) Goldman A.I., O'Brien P.J., Master-son E., Israel P., Teirstein P., Chader G.: *A quantitative system for studying phagocytosis in Pigment Epithelium tissue culture*, « Exp. Eye Res. », 28, 455, 1979.

(11) Feeney L., Mixon R.N.: *An in vitro model of phagocytosis in bovine and human Retinal Pigment Epithelium*, « Exp. Eye Res. », 22, 533, 1976.

MECIANI - APPARECCHI OCULISTICI

VIA AMPÈRE, 49 - MILANO - TELEF. 230736 - 2366432



CHE ROSCOPIO
DI MADDOX
MOD. MECIANI
PER CURA
DOMICILIARE

PLEOTTICA - ORTOTTICA

ATTREZZATURE COMPLETE PER SCUOLE DI ORTOTTICA