



In vitro toxicity of vitreous substitutes

Giovanni Scorcia

Department of Ophthalmology

School of Medicine

University of Catanzaro "Magna Graecia", Catanzaro, Italy

Nel nostro studio abbiamo voluto analizzare gli effetti in vitro di alcuni sostituti artificiali del vitreo (SAV) come: perfluorofenantrene (PFF), perfluorodecaline (PFD), perfluoro-n-ottano (PFO), idrossipropilmetilcellulosa (HPMC), olio di silicone (PDMS) ed perfluoroxilottano (F6H8) su colture primarie di retina di ratto.

Materiali e metodi: cellule retiniche estratte da ratti neonati (1-3 gg) Wistar, sono state seminate su appositi inserti polilisinati per colture cellulari con fondo in cyclopore in 1 ml di terreno MEM (Minimal Essential Medium); successivamente gli inserti sono stati trasferiti su pozzetti standard di 25 mm contenenti 2ml di solo terreno; questo sistema, permette il passaggio del nutrimento sia dall'alto che dal basso e il successivo trattamento con la sostanza da testare dall'alto. Come controllo una quota di cellule è stata seminata nelle stesse condizioni su pozzetti standard. Le colture sono state conservate in incubatori in atmosfera al 5% di CO₂ a 37°C e sono state trattate al 9° giorno: rimosso il terreno sulla parte superiore delle cellule, è stato sostituito con 1 ml ciascuno di SAV; mentre per i pozzetti controllo è stato sostituito con terreno fresco. Sia su campioni trattati e non, è stata analizzata la sopravvivenza cellulare attraverso il test di esclusione di colorante vitale Trypan blue (Sigma), la percentuale di nuclei con caratteristiche morfologiche dell'apoptosi, utilizzando lo ioduro di propidio e con la tecnica a TUNEL. Per l'analisi morfologica le colture sono state fissate e colorate con ematossilina-eosina. I campioni da osservare al microscopio elettronico a scansione (SEM) sono stati fissati in gluteraldeide al 2,5%. Per la caratterizzazione immunocitochimica gli antigeni sono stati marcati con l'immunofluorescenza e con l'immunoperoxidasi.

Risultati: nelle prime 2-4 ore la maggior parte delle cellule retiniche aderivano al substrato come singole cellule che come piccoli aggregati (clusters), che gradualmente si sono espansi formando piccole arborizzazioni neuritiche. Il PFP è il primo dei SAV che induce un precoce distacco periferico di un agglomerato di cellule. L'immunomarcatura con vimentina, che lega gli astrociti e le cellule di Muller e la proteina 2 associata ai microtubuli (MAP2) indice di differenziazione cellulare sono ugualmente espresse sia nelle colture controllo che nelle colture trattate con SAV a basso peso specifico. L'evidenziazione dell'immunomarcatura-GABA dimostra la presenza di cellule amacrine nelle colture neuronali dopo trattamento con SAV a basso peso. Sinapsi sinaptofisina positive sono presenti lungo i neuriti e sui corpi cellulari di cellule trattate con PFO. Invece l'organizzazione delle coltura trattata con PFD è stata notevolmente modificata. La percentuale di cellule positive al test di esclusione al Trypan blue era estremamente bassa per i trattati con PFD rispetto ai SAV a basso peso specifico; i risultati più interessanti sono stati ottenuti con la tecnica TUNEL e confermati dalla colorazione con ioduro di propidio che hanno mostrato una percentuale di nuclei in apoptosi sensibilmente più alta nei trattati con PFD e F6H8 rispetto al controllo. Le modificazioni indotte da PFD e F6H8 sono state ancora più evidenti all'osservazione al SEM.

Discussione: nel campione controllo le cellule crescono su uno strato di fondo composto da cellule gliali che supportano le cellule neuronali largamente anastomizzate a rete. Dopo il trattamento con SAV a basso peso i clusters cellulari mantengono l'organizzazione mentre quelli trattati con PFD appaiono appiattiti ed allargati, composti da un singolo strato di cellule densamente stipate che non hanno perso i contatti intercellulari. Evidenti, invece, i danni causati dal trattamento con F6H8: dopo 18 ore di trattamento: i clusters appaiono compressati con perdita della loro tipica organizzazione in doppio strato, le cellule sono piatte poliedriche ed hanno perso le connessioni tra loro.

Conclusioni: dai dati ottenuti si evince che la PFD non induce effetti citotossici su colture cellulari, ma cambia notevolmente il pattern di organizzazione e l'espressione di markers citochimici cellulari, modifica l'espressione di componenti del citoscheletro ed i markers di sinapsi, alterando la loro funzione.

I danni causati dalla PFD in vitro sono fisici, dovuti al suo elevato peso specifico, che può comprimere e disorganizzare la struttura della retina. I SAV come PFO, PDMS, HPMC non alterano la morfologia e la differenziazione cellulare e soprattutto non inducono apoptosi, poiché hanno un peso specifico simile a quello dei liquidi organici che li rende compatibili con la sopravvivenza e la differenziazione cellulare in vitro. F6H8, alcano semifluorinato appartenente alla nuova classe di mezzi tamponanti ha mostrato un evidente effetto neurotossico in vitro, determinando un incremento della morte cellulare calcolata in termini di apoptosi ed alterando l'organizzazione sia cellulare che il citoscheletro neuronale.