
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ANNA MARIA ZACCHEI, ERMINIO MUZZI

**Azione inibitoria della ossitetraciclina
sull'accrescimento in coltura dei tibiotarsi di
embrione di pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.3, p.
413-418.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_3_413_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/>

Biologia. — *Azione inibitoria della ossitetraciclina sull'accrescimento in coltura dei tibiotarsi di embrione di pollo* (*). Nota di ANNA MARIA ZACCHEI e ERMINIO MUZZI, presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

È noto che le tetraciclina, così come anche altri antibiotici, possono formare complessi chelati con i metalli e specialmente con i metalli bivalenti dando origine a composti organo-metallici che spesso hanno azione inibitoria sugli enzimi e quindi influiscono su vari processi metabolici [1, 2, 3]. Di recente è stata dimostrata la funzione di mediatori degli ioni metallici bivalenti nei riguardi della formazione di complessi fra tetraciclina e macromolecole organiche come l'albumina e il DNA [4].

Queste acquisizioni recenti riaprono alla discussione tutto il problema della natura chimica del fenomeno di fissazione delle tetraciclina ai tessuti calcificati; infatti si riteneva probabile [5, 6] che la tetraciclina si legasse al tessuto osseo durante la ossificazione per un legame di chelazione interessante insieme la matrice organica, il deposito minerale e l'antibiotico. Proprio queste vedute sembrano oggi tornare valide alla luce delle nuove conoscenze; quindi la possibilità che la tetraciclina interferisca non solo con il deposito del calcio ma anche con la sintesi della matrice organica dell'osso sembra degna di studio.

Si possono interpretare in questo senso l'azione inibitoria sullo sviluppo in coltura dei fibroblasti di cuore embrionale di pollo [7] e le esperienze di Bevelander ed altri [8] che hanno ottenuto notevole inibizione dello sviluppo dello scheletro, sempre nell'embrione di pollo, iniettando tetraciclina nel sacco del tuorlo tra l'8° e il 12° giorno di incubazione.

L'esperienza di Bevelander ha posto molti interrogativi sia riguardo alle interferenze fra forti concentrazioni di tetraciclina e mineralizzazione dello scheletro, sia riguardo alla influenza della tetraciclina sulla moltiplicazione cellulare, sulla sintesi dei metaplasmi, sul differenziamento istologico. Questi Autori non approfondiscono alcuni di questi aspetti dell'azione dell'antibiotico e attribuiscono i disturbi dell'accrescimento dello scheletro, nelle condizioni sperimentali da essi usate, alla non disponibilità del calcio che formando complessi con la tetraciclina sarebbe bloccato nel sacco del tuorlo.

Nell'intento di chiarire i rapporti tra presenza di tetraciclina e mineralizzazione dello scheletro nelle prime fasi dello sviluppo e soprattutto per vedere se l'azione inibitoria sullo sviluppo dipende realmente dalla carenza di calcio disponibile o piuttosto da una azione sulla istogenesi dei connet-

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata «G. B. Grassi» della Università di Roma con un contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta del 10 marzo 1962.

tivi dello scheletro ci è sembrato opportuno studiare lo sviluppo e l'accrescimento di segmenti dello scheletro embrionale isolati in mezzo di coltura con aggiunta di tetraciclina. In queste condizioni è anche possibile discriminare se l'azione inibitoria si effettua nei tessuti direttamente o per via mediata attraverso le ghiandole a secrezione interna.

Nelle nostre esperienze sono state usate uova di pollo di razza Livornese bianca; al nono giorno di incubazione, quando la formazione del tessuto osseo è certamente iniziata, i due tibiotarsi di ogni embrione sono stati prelevati e posti in coltura rotante a 38°C in un mezzo sterile (preparato secondo Endo [9]) composto da: 1 parte di estratto embrionale, 5 parti di siero di cavallo, 4 parti di soluzione di Gey.

Mentre uno dei due tibiotarsi dell'embrione è stato posto in questo mezzo, ed ha rappresentato il controllo, l'altro è stato invece coltivato nel mezzo contenente ossitetraciclina cloridrato (terramicina). Il liquido di coltura è stato cambiato ogni due giorni; dopo 48 ore di trattamento con ossitetraciclina, anche i tibiotarsi trattati sono stati portati in mezzo normale allo scopo di eliminare l'antibiotico diffuso nelle parti non calcificate.

Sono stati eseguiti, in tempi successivi, tre gruppi di esperienze con concentrazioni diverse di antibiotici (0,01; 0,3; 1 mg di terramicina/ml). All'inizio delle esperienze e ad ogni *repiquage* sono stati disegnati con la camera lucida i profili di tibiotarsi, avendo naturalmente cura di mantenere costante l'ingrandimento. Alla fine della esperienza, cioè dopo 6 giorni di coltura, i tibiotarsi sono stati misurati con un calibro e fissati in formalina al 6% neutralizzata. Le colture sono rimaste esenti da contaminazioni batteriche per tutta la durata dell'esperienza. I tibiotarsi in toto sono stati osservati al microscopio binoculare a fresco e dopo fissazione sia in luce normale sia in luce UV di 3660 Å di lunghezza d'onda usando come generatore una lampada Wild a vapori di mercurio per microscopia di fluorescenza.

I valori medi della lunghezza raggiunta dai tibiotarsi coltivati alla fine dell'esperienza sono stati ottenuti misurando direttamente gli abbozzi; i valori medi al momento del prelievo e a 48 e 96 ore di coltura sono stati invece calcolati indirettamente dai disegni; per fare ciò si è applicato a questi stadi il rapporto tra grandezza reale e grandezza del disegno ottenuto alla 144ª ora. La variabilità dell'errore di ingrandimento è risultata essere nei limiti di \pm il 10%. I valori medi ottenuti sono riportati nel grafico; da essi risultano le differenze di allungamento fra i tibiotarsi coltivati in mezzo normale e quelli in mezzo contenente terramicina (fig. 1). Le differenze di grandezza iniziali dei tibiotarsi di ciascun gruppo dipendono da un leggero sfasamento tra i tempi di incubazione, in quanto i tre gruppi di esperienze sono stati eseguiti in tempi diversi. I valori numerici con i quali si è costruito il grafico sono indicati nella Tabella I.

L'allungamento dei tibiotarsi in coltura è risultato minore nei tibiotarsi trattati con terramicina rispetto a quelli controlaterali di controllo coltivati in mezzo normale. Il minore allungamento dei tibiotarsi coltivati nelle prime 48 ore in presenza di terramicina è evidente nel gruppo B e nel gruppo C

che rispettivamente avevano le concentrazioni di 0,3 e 1 mg per ml di mezzo di coltura; l'effetto è meno chiaro ma forse presente anche alla concentrazione minore usata nel lotto A (0,01 mg/ml). In ogni caso l'effetto della terramicina sull'allungamento dei tibiotarsi è proporzionale alle dosi impiegate come risulta chiaramente dal grafico. Le colonne nere rappresentano i controlli, le bianche marginate i trattati.

Ad un esame d'insieme del materiale si ricava l'impressione che anche la circonferenza dei tibiotarsi trattati con terramicina sia alla fine della esperienza minore rispetto a quella dei tibiotarsi controlaterali di controllo.

Per quanto riguarda la fissazione e la localizzazione della terramicina, e la sua persistenza non è possibile per ora dare dei risultati definitivi. Sembra che la fissazione sia limitata alle trabecole più interne della diafisi ossea, ma resta da definire se queste trabecole sono state deposte prima o durante le 48 ore di trattamento con terramicina. La fluorescenza gialla caratteristica della terramicina si riconosce chiaramente nei tibiotarsi appena estratti dal mezzo di coltura; alla fine dell'esperimento, cioè dopo 4 giorni di coltura in mezzo esente da antibiotico, essa è strettamente limitata alla diafisi ossea (fig. 2).

In buona parte dei casi però la fluorescenza scompare durante i passaggi nei solventi necessari per la preparazione delle sezioni istologiche, per solubilizzazione del fluorocromo. Sembra perciò trattarsi di una fissazione labile e non persistente come quella che si ha nel tessuto osseo deposto durante la somministrazione della antibiotico ad organismi viventi; anche in questo caso è però specifica del tessuto calcificato. Infatti il tessuto cartilagineo che costituisce le epifisi e l'estremità delle diafisi è fluorescente al primo *repiquage* (quando i tibiotarsi sono ancora in mezzo contenente terramicina) e diviene esente da fluorescenza gialla alla fine dell'esperimento (dopo 4 giorni di permanenza in mezzo di coltura esente da terramicina).

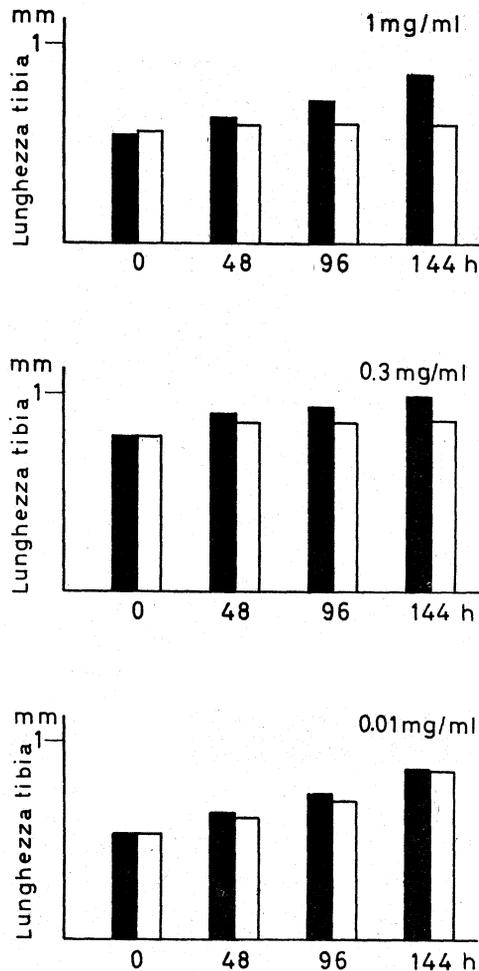


Fig. 1.

I fatti osservati non consentono conclusioni per ciò che riguarda le modalità di fissazione e la persistenza del fluorocromo; questi aspetti sono tuttora allo studio e verranno comunicati successivamente.



Fig. 2.

Risulta invece chiaramente definito un effetto inibitore della terramicina sull'allungamento dei tibiotarsi in coltura. L'azione dell'antibiotico è chiaramente e direttamente proporzionale alle dosi impiegate e si manifesta per dosi variabili fra 0,3 e 1 mg per ml di mezzo di coltura.

Inoltre gli espianti trattati con 1 mg di terramicina per ml e forse anche quelli trattati con 0,3 mg/ml di mezzo di coltura risultano alla 48^a ora meno allungati dei controlli e per tutto il tempo di incubazione successivo, fino alla fine dell'esperimento, non subiscono ulteriore allungamento. Si verifica cioè un arresto dell'allungamento proprio quando, dopo il trattamento con terramicina (effettuato nelle prime 48 ore), gli espianti sono stati riportati in mezzo quasi esente da antibiotico. Infatti la sola terramicina presente nel mezzo dopo il primo *repiquage* è quella diffusa dalle parti molli dell'espianto. Nelle condizioni che si realizzano quindi dopo la 48^a ora il mezzo di coltura dovrebbe essere capace

di fornire ioni calcio ed essendo esente da terramicina dovrebbe permettere la ripresa dell'allungamento degli espianti. Al contrario dopo la 48^a ora gli espianti non si allungano più. L'effetto di inibizione sull'allungamento quindi persiste anche dopo che gli espianti sono stati riportati in mezzo di coltura normale.

Le nostre osservazioni autorizzano piuttosto ad attribuire i fatti osservati ad una azione della terramicina sul differenziamento e sulla divisione cellulare o sulla istogenesi della sostanza intercellulare. Questa ipotesi può essere messa in rapporto con le osservazioni di Lépine, Barski e Maurin sulla inibizione da tetraciclina dello accrescimento in coltura dei fibroblasti di embrione di pollo; questa inibizione è stata descritta come molto efficiente a carico dei fibroblasti e quasi inefficiente a carico delle colture di epitelii dove la sintesi di materiale intercellulare è poco rilevante.

Un dato recente riguardante la fissazione delle tetraciclina ai mitocondri così in coltura come in vivo [10] potrebbe autorizzare la ipotesi di un disturbo al livello mitocondriale dei meccanismi che forniscono la energia per la sintesi

delle macromolecole organiche (proteine di struttura). Tutto ciò giustifica una estensione della ricerca nell'intento di definire quesiti rimasti insoluti.

TABELLA I.

Concentrazione di terramicina nel mezzo di coltura mg/ml	Lunghezza dei tibiotarsi in mm							
	Inizio		48 ore		96 ore		144 ore	
	Sinistro	Destro	Sinistro	Destro	Sinistro	Destro	Sinistro	Destro
0,01		5,4		6,2		7		7,6
mezzo normale	5,4		6,4		7,3		8	
0,3		7,9		8,5		8,5		8,6
mezzo normale	7,9		9		9,3		9,9	
1		5,7		6		6,1		6,1
mezzo normale	5,5		6,6		7,2		7,7	

Vi è da aggiungere che Grant [11] ha dimostrato una azione stimolante delle tetracicline, a dosi oligodinamiche, sulla tiroide del ratto; recenti ricerche di Manelli [12] e di Chih-Yün-Hsü [13] hanno inoltre dimostrato rispettivamente la più attiva rigenerazione della coda e la accelerazione della metamorfosi aggiungendo tetracicline all'acqua dei bacini di allevamento, in larve di Anfibi. Queste ricerche non sono da considerarsi contraddittorie con le nostre osservazioni in quanto le dosi impiegate da questi Autori sono molto inferiori (0,002-0,000001 mg/ml) e potrebbero, sull'organismo intero, stimolare la tiroide o l'ipofisi e quindi produrre un effetto differente.

In conclusione, le nostre esperienze sulla influenza della tetraciclina sull'accrescimento dei tibiotarsi embrionali in coltura, dimostrano che questa sostanza esercita una azione inibitrice che è proporzionale alla dose impiegata. Si ritiene che questo fenomeno non sia dovuto esclusivamente a carenza di calcio nel mezzo, secondaria alla chelazione tra metallo e terramicina, ma debba attribuirsi ad una azione diretta sulla istogenesi del tessuto; questa azione si esercita probabilmente più inibendo la sintesi delle proteine di struttura della sostanza intercellulare che arrestando o rallentando le moltiplicazioni cellulari.

Durante la correzione delle bozze siamo venuti a conoscenza di una Nota di F. CLEMENTI e L. TESSARI sullo: *Studio in vitro della capacità del tessuto osseo embrionale di fissare la tetraciclina*, « Atti Acc. Med. Lombarda », 16, 252 (1961). La tecnica usata non dà però garanzie sufficienti sulla reale fissazione della tetraciclina ai tessuti.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. ALBERT, *Avidity of Terramycine and Aureomycin for metallic cations*, « Nature », 172, 201 (1953).
- [2] E. D. WEINBERG, *The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations*, « Bacteriological Reviews », 21, 46 (1957).
- [3] M. ISHIDATE, T. SAKAGUCHI, *Metal chelate compounds of Tetracyclin derivatives*, « Phar. Bull. » (Japan), 3, 147 (1955).
- [4] K. W. KOHN, *Mediation of divalent metal ions in the binding of tetracycline to macromolecules*, « Nature », 191, 1156 (1961).
- [5] R. A. MILCH, D. P. RALL, J. E. TOBIE, *Fluorescence of Tetracycline antibiotics in bone*, « J. Bone and Joint Surgery », 40 a, 897 (1958).
- [6] E. D. TITUS, LOO TI LI, D. P. RALL, *Identification of the bone phosphorophore in tetracycline-treated rabbits*, « Antibiotic Annual », 949 (1957-58).
- [7] P. LEPINE, G. BARSKI, J. MAURIN, *Action of Chloromycetin and of Aureomycin on normal tissue culture*, « Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. », 73, 252 (1950).
- [8] G. BEVELANDER, H. NAHARA, G. K. ROLLE, *The effect of tetracycline on the development of the skeletal system of the chick embryo*, « Developmental Biol. », 2, 298 (1960).
- [9] H. ENDO, *Ossification in tissue culture. – I. Histological development of the femur of chick embryo in various liquid media*, « Exp. Cell Res. », 21, 151 (1959).
- [10] H. G. DU BUY, J. L. SHOWACRE, *Selective localization of tetracycline in mitochondria of living cells*, « Science », 133, 196 (1961).
- [11] W. C. GRANT, *Aureomycin and the Thyroid gland*, « Science », 120, 724 (1954).
- [12] H. MANELLI, *Sulla rigenerazione della coda nelle larve di anfibi soggette alla azione della clortetraciclina*, « Arch. Zool. It. », 45, 109 (1960).
- [13] CHIH-YUN-HSU, *The effect of Aureomycin on development of the frog*, « Embryologia », 3, 321 (1960).