
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO ZATTI, FILIPPO ROSSI

L'incorporazione di ^{32}P nei fosfolipididi muscoli atrofici per denervazione e tenotomia incubati in vitro

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.5, p. 756–760.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_5_756_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 (Patologia). — *L'incorporazione di ^{32}P nei fosfolipidi di muscoli atrofici per denervazione e tenotomia incubati in vitro* (*)
Nota di MARIO ZATTI e FILIPPO ROSSI, presentata (**) dal Socio M. ALOISI.

Con la presente Nota riferiamo alcuni risultati ottenuti sull'incorporazione di fosfato inorganico radioattivo nei fosfolipidi totali di muscoli atrofici denervati o tenotomizzati incubati *in vitro*. Esistono nella letteratura dati riguardanti una aumentata incorporazione *in vivo* nei fosfolipidi di muscoli denervati, interpretata da alcuni autori come espressione di aumentato deposito nei muscoli di fosfolipidi sintetizzati in altra sede [1, 2, 3].

MATERIALI E METODI.

I muscoli gastrocnemii di ratti albin Wistar maschi del peso di 180–200 grammi sono stati denervati mediante resezione di un frammento (circa 1 cm) del nervo sciatico; o tenotomizzati per asportazione di un frammento del tendine di Achille (circa 2 mm).

Gli animali erano uccisi a varia distanza di tempo dopo l'intervento. Parte dei ratti nei quali era stata praticata la denervazione sono stati trattati con 3 iniezioni giornaliere di mg 13 di chinidina per 100 g di peso corporeo, cominciando dal giorno stesso della denervazione. Il controllo della fibrillazione nei muscoli è stato eseguito immediatamente prima dell'uccisione con apparecchio Myocatograf III della Alvar.

I muscoli gastrocnemio atrofico e controlaterale appena asportati sono stati pesati, raffreddati rapidamente, e suddivisi in sottili striscioline nel senso delle fibre [4, 5].

L'incubazione è stata eseguita a 38° in Krebs-Ringer bicarbonato [6] contenente microcurie 1,25 di ^{32}P -ortofosfato per ml nel rapporto di 1 g di striscioline di muscolo per 20 ml di *medium*. Alla fine dell'incubazione il tessuto è stato rapidamente lavato per tre volte con Ringer-bicarbonato non contenente ^{32}P e immediatamente ghiacciato con neve carbonica.

Su aliquote sono stati determinati i fosfolipidi e il P acido-solubile.

Estrazione dei fosfolipidi. — È stato seguito il metodo di Folch [7] con numerosi lavaggi con solvente della fase superiore per assicurare un completo allontanamento di materiali radioattivi non lipidici; a tale scopo sui liquidi di lavaggio si determinava la radioattività (fino a scomparsa della stessa) con contatore per liquidi (SELO). Il residuo secco del

(*) Dal Centro « G. Vernoni » per lo Studio della Fisiopatologia, del C.N.R., e dall'Istituto di Patologia Generale della Università di Padova.

(**) Nella seduta del 12 maggio 1962.

primo estratto sciolto in cloroformio e filtrato era diviso in opportune aliquote per il dosaggio del fosforo dopo incenerimento [8] e per la misura della radioattività.

Estrazione del fosforo acido-solubile. - Altre aliquote di muscoli sono state omogenizzate a freddo in acido tricloroacetico 10% con omogenizzatore tipo Potter con pestello di teflon e centrifugate a 2500 g a 0°; il precipitato è stato lavato con l'acido per 6-7 volte fino a completa estrazione del fosforo radioattivo. Sui liquidi soprannatanti riuniti sono stati determinati: *a*) il contenuto di P totale dopo incenerimento; *b*) il contenuto di P inorganico e organico; *c*) la radioattività delle singole frazioni.

Dosaggi delle frazioni di fosforo. - La separazione del fosforo inorganico dall'organico è stata eseguita col metodo di Martin e Doty [9, 10]. La quantità di fosfolipidi è stata calcolata moltiplicando per 25 i valori del P dosato.

Misura della radioattività. - Aliquote precisamente misurate delle soluzioni contenenti le singole frazioni di fosforo sono state poste in dischi di alluminio ed essiccate. Il conteggio è stato eseguito con il Tracerlab Flow Counter con finestra FD-I-Mono Mol Resin.

RISULTATI.

La radioattività specifica dei fosfolipidi dei muscoli atrofici denervati incubati *in vitro* con ^{32}P è costantemente assai maggiore di quella dei fosfolipidi dei muscoli controlaterali. L'aumento è evidente già a tre giorni dalla denervazione e si mantiene, pur con la variabilità riscontrata da esperimento a esperimento, per tutto il periodo di atrofia esaminato (Tabella I).

TABELLA I.

Incorporazione di ^{32}P -ortofosfato nei fosfolipidi di muscoli denervati, in vitro. Incubazione in Krebs-Ringer bicarbonato da 1 a 3 ore. I risultati sono riferiti a 1 ora d'incubazione. Condizioni descritte nel testo.

Esper. N.	Ratti N.	Giorni dalla denervazione	Fosfolipidi mg/g muscolo		Attività specifica (impulsi/1 g P lipidico/1 min.)	
			controlaterali	atrofici	controlaterali	atrofici
1	2	2	6,05	7,2	3,0	2,5
2	2	3	7,5	7,6	6,6	13,7
3	3	4	7,6	7,1	2,8	11,6
4	3	5	7,9	7,2	2,3	9,2
5	2	5	8,2	7,7	4,2	6,4
6	2	7	6,9	7,3	3,2	5,4
7	3	7	6,2	5,8	2,9	8,1
8	2	9	6,5	6,5	3,6	15,2
9	2	9	6,8	7,0	4,3	13,0
10	3	10	6,1	6,1	4,2	15,6

Il contenuto di fosfolipidi non subisce rilevanti modificazioni.

L'attività specifica del fosforo organico acido-solubile è uguale nei muscoli denervati e controlaterali, mentre quella del fosforo inorganico è sensibilmente più bassa nel muscolo atrofico (Tabella II).

TABELLA II.

Incorporazione di ^{32}P -ortofosfato nelle frazioni fosforiche acido solubili di muscoli denervati, in vitro. Incubazione in Krebs-Ringer bicarbonato per 1 h. Condizioni descritte nel testo.

Esper. N.	Ratti N.	Giorni dalla denervazione	Attività specifica P inorganico (impulsi/1 min./1 g P)		Attività specifica P organico acido solubile (impulsi/1 min./1 g P)	
			controlaterali	atrofici	controlaterali	atrofici
1	3	5	5270	3650	448	419
2	3	6	4840	4340	391	526
3	3	3	6090	4402	588	592
4	2	4	4044	2418	384	369
5	2	4	3030	2055	465	426

Nei muscoli denervati degli animali trattati con chinidina la fibrillazione, presente nei muscoli denervati degli animali non trattati, è risultata totalmente soppressa. La chinidina non ha influenzato il comportamento del muscolo denervato per quanto riguarda l'incorporazione del ^{32}P nei fosfolipidi (Tabella III).

Nei muscoli atrofici tenotomizzati non si dimostrano alterazioni del turnover fosfolipidico (Tabella III).

TABELLA III.

Incorporazione di ^{32}P -ortofosfato nei fosfolipidi di muscoli denervati; denervati, da ratti trattati con chinidina; tenotomizzati. Incubazione di 3 ore in Krebs-Ringer bicarbonato.

N. Esper.	N. Ratti	Trattamento	Fosfolipidi mg/g muscolo				Attività specifica (impulsi/1 min./1 g P)			
			control.	atrofici	con Chinidina (39 mg/100g peso/die in 3 dosi)		control.	atrofici	con Chinidina (39 mg/100g peso/die in tre dosi)	
					control.	atrofici			control.	atrofici
1	3	Denervazione (da 7 gg)	5,9	6,0	6,1	5,8	4,3	8,1	3,1	8,0
2	3	Tenotomia (da 7 gg)	6,8	7,4	—	—	3,7	3,3	—	—

DISCUSSIONE.

La maggior attività specifica dei fosfolipidi del muscolo denervato non dimostrerebbe di per sé un aumentato turnover primitivo delle frazioni fosfolipidiche, in quanto potrebbe dipendere sia da un'accresciuta permeabilità al ^{32}P come da un aumentato turnover del fosforo organico acido-solubile. I nostri risultati dimostrano invece un reale aumento del turnover dei fosfolipidi perché l'attività specifica del fosforo organico acido-solubile non è modificata. Pertanto nel muscolo atrofico denervato il rapporto tra l'attività specifica dei fosfolipidi e quella del fosforo organico acido-solubile (cioè l'attività specifica relativa) risulta notevolmente più alto che nel muscolo normale dopo 1 ora d'incubazione *in vitro*. Anche l'interferenza di alterazioni della permeabilità è da escludere in quanto l'attività specifica del P inorganico è minore nel muscolo atrofico. Questo dato deriva dal fatto che nel muscolo atrofico il contenuto di P inorganico è più alto mentre la radioattività riferita a grammo di muscolo non presenta significative variazioni.

Per quanto riguarda l'attività specifica relativa del P organico acido-solubile (rapporto tra l'attività specifica di questa frazione e quella del P inorganico) i calcoli sui dati riportati nella Tabella II potrebbero indicare un certo aumento nel muscolo atrofico. Questo fatto potrebbe dipendere da un aumentato turnover di nucleotidi o anche da un diverso accumulo di metaboliti intermedi fosforilati, o da perdita di fosforo organico acido-solubile nel mezzo verificantesi in proporzioni diverse nel muscolo atrofico rispetto al controlaterale. Qualunque sia la spiegazione di questo reperto, esso non è pertinente al problema del turnover dei fosfolipidi in quanto l'attività specifica relativa di questi ultimi deve necessariamente derivare dal rapporto con l'attività specifica del P organico acido-solubile (o in termini meno esatti con l'attività specifica del P totale acido-solubile) e non ha alcuna relazione con l'attività relativa dei precursori.

Per quanto riguarda i dati della letteratura sulla maggiore radioattività dei fosfolipidi dei muscoli denervati interpretati come espressione di un deposito di composti sintetizzati nel fegato, i nostri dati dimostrano invece perlomeno l'esistenza di un aumento del turnover dei fosfolipidi primitivo nel muscolo atrofico da denervazione, in fasi molto precoci.

Non siamo attualmente in grado di fornire indicazioni sul significato di questo fenomeno in relazione agli eventi patologici che seguono la denervazione del muscolo striato. Il turnover dei fosfolipidi è normale nel muscolo atrofico tenotomizzato. Questa differenza tra i due tipi di atrofia poteva ritenersi dovuta al fenomeno della fibrillazione che manca nella tenotomia (e nella immobilizzazione del muscolo) mentre compare nella denervazione a partire dal 3° giorno [11]. Gli esperimenti sui muscoli denervati nei quali la chinidina aveva totalmente impedito la fibrillazione hanno dimostrato invece che nella denervazione il turnover dei fosfolipidi è aumentato anche in assenza di fibrillazione. La differenza tra i due tipi di atrofia per quanto

riguarda l'aspetto esaminato sembra dunque imputabile alle condizioni d'innervazione.

È nota l'importanza attribuibile ai fosfolipidi nei processi della contrazione [12, 13] e della eccitabilità muscolare [14], e in relazione a molti fenomeni dimostrabili nel muscolo dopo la denervazione, quali l'aumentata sensibilità all'acetilcolina [11, 15], le modificazioni della permeabilità e della situazione ionica [16, 17]. È nota un'influenza dell'acetilcolina sui processi di contrazione attraverso modificazioni della distribuzione elettrolitica [18]; la sua azione sul turnover dei fosfolipidi a livello delle membrane e la dipendenza della sua attività dalla presenza di recettori lipoproteici [19, 20, 21] ⁽¹⁾.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] C. ARTOM, « J. Biol. Chem. », 139, 953 (1941).
- [2] H. D. FRIEDLÄNDER, I. PERLMAN, I. L. CHAIKOFF, « Am. J. Physiol. », 132, 24 (1941).
- [3] R. SAMUELS, « Am. J. Phys. Med. », 36, 78 (1957).
- [4] C. H. BEATTY, R. D. PETERSON, R. M. BOCEK, E. S. WEST, « J. Biol. Chem. », 234, 11 (1959).
- [5] J. C. HALL, « J. Biol. Chem. », 235, 6 (1960).
- [6] M. R. HOKIN, L. E. HOKIN, « J. Biol. Chem. », 203, 967 (1953).
- [7] J. FOLCH, M. LEES, G. H. SLOANE STANLEY, « J. Biol. Chem. », 226, 497 (1957).
- [8] C. H. FISKE, Y. SUBBAROW, *Methods in Enzymology*, Ed. Colowick S. P., Kaplan N. O., 3, 843 (1957).
- [9] J. B. MARTIN, D. M. DOTY, « Anal. Chem. », 21, 965 (1949).
- [10] O. LINDBERG, L. ERNSTER, *Methods in Biochemical Analysis*, Ed. Glick D., 3, 1 (1960).
- [11] M. ALOISI, « Atti della Soc. It. Patol. », 2, 289 (1951).
- [12] W. W. KIELLEY, M. MEYERHOF, « J. Biol. Chem. », 183, 391 (1950).
- [13] G. M. GRAY, M. G. MCFARLANE, « Biochem J. », 81, 480 (1961).
- [14] J. M. TOBIAS, « J. Cell. Comp. Physiol. », 46, 183 (1955).
- [15] G. L. BROWN, G. C. KNOWLTON, H. M. HINES, « J. Physiol. », 89, 438 (1937).
- [16] E. FISCHER, J. W. MOORE, H. V. SKOGLUND, K. W. RYLAND, N. J. COPENHAVER, « Acta Phys. Med. », 30, 429 (1950).
- [17] E. J. HARRIS, J. J. NICHOLLS, « J. Physiol. », 131, 473 (1956).
- [18] P. A. KOMETIANI, *Membrane Transport and Metabolism*, Acad. Press London - N. Y. 180 (1960).
- [19] L. E. HOKIN, M. R. HOKIN, *ibidem*, 204 (1960).
- [20] M. R. HOKIN, L. E. HOKIN, « J. Biol. Chem. », 209, 549 (1954).
- [21] L. E. HOKIN, M. R. HOKIN, « B. B. Acta », 16, 229 (1955).

(1) Questo lavoro è stato in parte sussidiato da un « Grant-in-aid » della « Muscular Dystrophy Associations of America ».