

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

CARLO RIZZOLI, FRANCESCO A. MANZOLI, PAOLO  
CARINCI

**Modificazioni indotte dall'etionina nell'accumulo  
lipidico epatico dell'embrione di pollo alla schiusa:  
analisi istochimica e gas-cromatografica**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.4, p. 552–558.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1964\\_8\\_36\\_4\\_552\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_4_552_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/>

**Istochimica.** — *Modificazioni indotte dall'etionina nell'accumulo lipidico epatico dell'embrione di pollo alla schiusa: analisi istochimica e gas-cromatografica.* Nota di CARLO RIZZOLI, FRANCESCO A. MAÑZOLI e PAOLO CARINCI (\*), presentata (\*\*), dal Socio O. M. OLIVO.

L'etionina è un analogo metabolico e strutturale della metionina ad azione biologica molto complessa, che va dall'inibizione della sintesi proteica e dell'incorporazione degli aminoacidi nelle proteine di struttura, ad alterazioni del metabolismo glicidico e lipidico [6].

In particolare per quanto riguarda il metabolismo lipidico l'etionina è agente steatogeno di costante e riproducibile azione, almeno nell'animale adulto di sesso femminile [9]; anche se l'azione steatogena è variamente interpretata come carenza relativa di metili labili [3-23-24] o come difetto di produzione dei fattori di trasporto serici (lipoproteine) e conseguente accumulo dei lipidi prodotti nell'epatocita [8-11-13-16].

Chimicamente la steatosi etioninica è caratterizzata dall'esclusiva o quasi esclusiva presenza di trigliceridi [9-15], mentre, almeno nell'adulto, poco interessate sono le frazioni colesteriniche [12] e fosfolipidiche [12-18]. Singoli dati riguardano il rapporto tra etionina ed acidi grassi insaturi nei lipidi d'accumulo [10].

In quasi tutte le ricerche fino ad ora espletate l'azione steatogena dell'antagonista è stata esaminata sul fegato dell'adulto, il cui contenuto lipidico è molto limitato, valutandone il grasso accumulato. L'azione steatogena dell'etionina è documentata anche per l'embrione di pollo, con un limite presumibile di « competenza » [17] delle cellule epatiche all'accumulo lipidico che si aggira sul 7° giorno di incubazione [4].

Non ci consta che sia stata esaminata l'azione dell'antimetabolita sul fegato nel corso di un accumulo fisiologico dei lipidi, come è il caso dell'embrione di pollo in prossimità della schiusa [5-19].

Abbiamo ritenuto che un esame di tal genere potesse consentire un approfondimento dell'azione dismetabolica dell'etionina sul metabolismo lipidico a livello della cellula epatica e portare un contributo alla conoscenza dei meccanismi metabolici che presiedono ed accompagnano la schiusa e l'inizio della vita libera [2].

Abbiamo così somministrato l'etionina all'embrione di pollo in 12ª giornata di incubazione ed, in questa prima nota, abbiamo esaminato istochimicamente e chimicamente i lipidi che si accumulano dal 15° al 21° giorno di incubazione.

(\*) Dall'Istituto di Istologia e Fisiologia generale dell'Università di Bologna - Direttore dott. prof. Carlo Rizzoli.

(\*\*) Nella seduta dell'11 aprile 1964.

## MATERIALI E METODI.

Come nelle precedenti ricerche [2] abbiamo usato uova di *Gallus gallus* di razza Livorno bianco incubate in termostato a 39°-40° C. La DL etionina (N.B.Co) è stata somministrata per via endovitellina in 12<sup>a</sup> giornata di incubazione (1 ml di soluzione 2 % in H<sub>2</sub>O-20 mg/uovo). Gli embrioni trattati ed i controlli sono stati prelevati di 12 in 12 ore fino alla 15<sup>a</sup> giornata e successivamente di giorno in giorno fino alla 21<sup>a</sup>.

I fegati, immediatamente dopo il prelievo, erano fissati in formolo 10 % o, per il test di Baker, in formolo calcico, per non più di 6 ore, lavati con H<sub>2</sub>O e sezionati al microtomo congelatore. L'analisi istochimica dei lipidi è stata condotta con i seguenti tests: per i grassi totali con il Sudan III; per il colesterolo con il test alla digitonina (digitonina 0,5 % in etanolo 50 % - esame al microscopio polarizzatore; il colesterolo forma con la digitonina dei cristalli birifrangenti); per i colesteridi con la reazione di Liebermann, modificata da Schultz (ossidazione con allume ferrico 2,5 % per 72 a 37° C - reazione con una miscela a parti uguali di acido solforico e acido acetico; gli esteri del colesterolo assumono un colorito verdastro); per i fosfolipidi con il test di Baker, prima e dopo estrazione con piridina (i fosfolipidi appaiono di colorito nero, mentre non si colorano dopo estrazione con piridina).

Dato che l'azione dell'etionina può essere condizionata dal sesso [7], abbiamo tenuto conto di tale eventuale influenza prelevando sistematicamente ad ogni embrione ed esaminando istologicamente la gonade sinistra.

Il contenuto totale in lipidi dei fegati esaminati è stato determinato per pesata prima e dopo estrazione con alcool-etero (2/1) e riferito a peso secco.

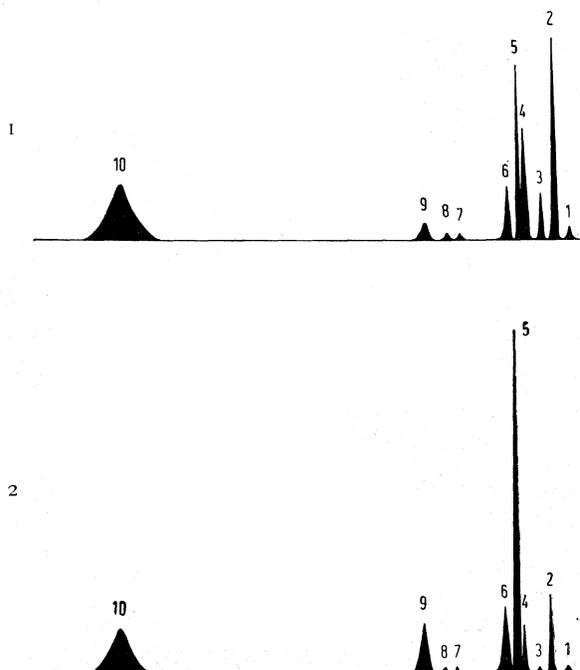
L'analisi gas-cromatografica è stata eseguita secondo la tecnica di James [14]. Gli organi venivano omogeneizzati, estratti con la miscela di Bloor (alcool-etero 3/1) per 24 ore a temperatura ambiente. L'estratto alcool-etero veniva filtrato ed evaporato in bagnomaria a 65° C sotto vuoto. Il residuo era ripreso con etere etilico ed i lipidi venivano saponificati con KOH alcoolica per 5 ore, a 65° C. L'insaponificabile estratto con etere veniva scaricato; dal residuo gli acidi grassi erano liberati con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N, estratti con etere e successivamente esterificati con metanolo acido per HCl 0,5 N a 55° C per 3 ore. La miscela degli esteri metilici era analizzata in gas-cromatografo Pye <sup>(1)</sup>, a camera di ionizzazione, usando come gas vettore l'argon, su colonna di celite 100-200 mesh, con fase stazionaria di polietilene-glicole-adipato, a 180° C, con pressione di ingresso dell'argon 0,8 Kg/cm<sup>2</sup>, flusso di uscita 80 ml al minuto. I grafici ottenuti sono stati poi valutati quantitativamente mediante il metodo della triangolazione.

(1) Desideriamo ringraziare il prof. Libero Martoni, Direttore dell'Istituto Clinico di Puericoltura dell'Università di Bologna, per averci gentilmente concesso l'uso del gas-cromatografo.

## RISULTATI SPERIMENTALI.

*Dati Istochimici.*

Al termine dell'incubazione il fegato dei controlli è di colorito giallo intenso, di consistenza pastosa, di aspetto untuoso al taglio. Negli embrioni trattati l'organo appare di volume ridotto, di colorito giallo verdastro, di consistenza teso-elastica, di aspetto untuoso al taglio. Notevole è la riduzione delle dimensioni della colecisti. Gli embrioni trattati, pur giungendo al termine dell'incubazione, non schiudono.



Grafici 1-2. - Frazionamento gas-cromatografico degli acidi grassi epatici in 21<sup>a</sup> giornata.

1. - Controllo 2. - Trattato.

Identificazione dei picchi: 1) miristico; 2) palmitico; 3) eptadecanoico; 4) stearico; 5) oleico; 6) linoleico; 7) eicosenoico; 8) eicosodienoico; 9) eicosotrienoico; 10) docosoesaenico.

Sempre in 21<sup>a</sup> giornata all'esame microscopico, dopo colorazione col Sudan per i grassi totali, i fegati dei controlli presentano un aspetto di infiltrazione massiva, diffusa in tutto il lobulo, con cellule infarcite di numerose e minute goccioline (1,5-3  $\mu$  di diametro). Nei trattati l'infiltrazione lipidica è pure assai intensa e diffusa, costituita però da goccioline poco numerose per cellula e molto voluminose (9-13  $\mu$  di diametro). Le differenze nelle dimensioni e nel numero delle goccioline sono talmente evidenti da consentire immediatamente la diagnosi microscopica dei fegati trattati (Tav. I. Fig. 1-2).

All'analisi istochimica dei costituenti lipidici presenti nelle goccioline si osservano, nei controlli, forti quantità di colesterolo libero, di colesteridi, di fosfolipidi. Nei trattati il test di Baker è nettamente positivo (fosfolipidi); risultano invece pressoché del tutto negativi i tests con la digitonina (radi cristalli birifrangenti sparsi qua e là nel parenchima epatico [Tav. II - fig. 2] e di Schultz per i colesteridi. Nei lipidi che si accumulano nel fegato degli embrioni trattati mancano adunque il colesterolo ed i suoi esteri.

Abbiamo successivamente cercato di precisare le modalità istochimiche qualitative con cui si istituisce, nel corso degli ultimi giorni della vita embrionale, l'infiltrazione lipidica sotto carico di etionina.

In 13<sup>a</sup> giornata e cioè 24 ore dalla somministrazione dell'antagonista nelle cellule dei fegati trattati si osservano rare e minute goccioline sudanofile, prevalentemente nelle cellule periportali; non è presente colesterolo (test alla digitonina negativo). Tale quadro è sostanzialmente analogo a quanto si osserva nei controlli.

Fra le 36 e le 48 ore dalla somministrazione dell'etionina compaiono qua e là negli epatociti voluminose goccioline sudanofile.

In 15<sup>a</sup> giornata il quadro morfologico ed istochimico dei lipidi che si accumulano nei fegati trattati è già tipicamente etioninico e cioè costituito da voluminose goccioline sudanofile, da assenza di colesterolo e di colesteridi. Nei successivi giorni di sviluppo fino al termine dell'incubazione si osserva l'estendersi dell'infiltrazione a tutto il parenchima. Il numero delle goccioline per cellule aumenta e tendono a prevalere le grandi goccioline.

Le caratteristiche istochimiche dell'accumulo lipidico epatico sono indistinguibili fra gli embrioni di sesso ♂ e ♀. In entrambe le due serie si osserva la medesima steatosi a grandi goccioline, prive di colesterolo e dei suoi esteri.

#### *Dati quantitativi.*

I dati morfologici ed istochimici precedentemente esposti dimostrano che la somministrazione di etionina modifica la natura dei lipidi che normalmente si accumulano nel fegato dell'embrione di pollo in prossimità della schiusa (assenza del colesterolo e dei colesteridi).

Abbiamo successivamente cercato di dimostrare se alle modificazioni qualitative si accompagnano variazioni della quantità relativa dei lipidi accumulati nell'organo.

In Tabella I sono raccolti i valori sul contenuto lipidico totale riferito a peso secco dal 15° giorno al 21° di incubazione. Il contenuto lipidico epatico nei controlli è notevolmente elevato in 15<sup>a</sup> giornata (14,1 % sul peso secco) ed aumenta fino a costituire in prossimità della schiusa il 46,0 % del peso secco. Un incremento parallelo e quantitativamente pressoché indistinguibile si osserva nei fegati degli animali trattati con etionina; i lipidi costituiscono il 18,5 % del peso secco in 15<sup>a</sup> giornata e il 52,3 % in 21<sup>a</sup> giornata di incubazione. La quantità dei lipidi accumulati nell'organo non varia sotto l'azione dell'etionina.

TABELLA I.

*Contenuto percentuale dei lipidi totali riferito al peso secco.*

Giorni di sviluppo	Fegato normale	Fegato etioninico
15	14,1	18,5
17	28,3	23,1
19	44,4	45,1
21	46,0	52,3

La steatosi etioninica è costituita da un prevalente accumulo di trigliceridi con partecipazione dei fosfolipidi. Abbiamo allora studiato se i lipidi presentassero una differente composizione rispetto ai controlli, esaminando mediante analisi gas-cromatografica lo spettro in acidi grassi.

Nel fegato dell'embrione di pollo in 15<sup>a</sup> giornata sono presenti i seguenti 10 acidi grassi: miristico, palmitico, eptadecanoico, stearico, oleico, linoleico, eicosenoico, eicosodienoico, eicosotrienoico, docosoeisaenico. Gli acidi grassi saturi rappresentano poco più della metà del contenuto percentuale in acidi grassi (55,09% - Tabella II). Nei successivi stadi esaminati, e cioè in 17<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup> giornata di incubazione, lo spettro degli acidi grassi non si modifica qualitativamente. I valori percentuali degli acidi grassi saturi presentano però una lieve diminuzione fino alla schiusa; accentuate modificazioni quantitative percentuali si osservano invece nelle concentrazioni relative tra monoinsaturi e poliinsaturi. I primi, essenzialmente rappresentati dall'acido oleico ( $C_{18:1}$ ) presentano un continuo incremento percentuale per tutto il periodo considerato (15<sup>a</sup> giornata: 17,78% - 21<sup>a</sup> g.: 33,68%), mentre i secondi diminuiscono correlativamente (Tabella II). Il rapporto  $C_{18:0}/C_{18:1}$  e cioè fra l'acido stearico e l'acido oleico presenta nei vari stadi esaminati un continuo decremento, il che conferma che nel complesso anche il grado di insaturazione degli acidi grassi aumenta.

Nel fegato degli embrioni trattati con etionina si osserva lo stesso spettro qualitativo degli acidi grassi (miristico, palmitico, eptadecanoico, stearico, oleico, linoleico, eicosenoico, eicosodienoico, eicosotrienoico, docosoeisaenico). Sono invece modificati, rispetto ai controlli, i rapporti quantitativi fra le varie frazioni e il loro comportamento nello sviluppo.

È anzitutto costantemente minore la quantità percentuale di acidi grassi saturi presenti, anche se nel corso dell'incubazione si osserva un incremento limitato di tali frazioni che passano dal 16,97% in 17<sup>a</sup> g. al 27,99% in 21<sup>a</sup> g.

Per quanto riguarda gli acidi grassi monoinsaturi la loro concentrazione percentuale è molto elevata ed assai maggiore dei controlli (Tabella II).

Da un punto di vista qualitativo dunque la steatosi etioninica è caratterizzata da un'ampia prevalenza di acidi grassi insaturi, specie monoinsaturi, che si istituisce precocemente, appena inizia l'infiltrazione lipidica.

TABELLA II.

*Acidi grassi* (Contenuto percentuale).

Giorni di sviluppo	Saturi	Monoinsaturi	Poliinsaturi	$C_{18:0}/C_{18:1}$
15 normale . . . . .	55,09	17,78	27,13	1,38
17 normale . . . . .	53,59	21,90	24,51	0,86
etioninico . . . . .	16,97	64,57	18,46	0,11
19 normale . . . . .	51,71	27,09	21,20	0,69
etioninico . . . . .	19,30	53,34	27,36	0,13
21 normale . . . . .	49,12	33,68	17,20	0,32
etioninico . . . . .	27,99	58,16	13,85	0,19

## CONCLUSIONE E DISCUSSIONE.

I dati da noi raccolti si possono così riassumere e discutere:

1° La somministrazione di etionina all'embrione di pollo in 12<sup>a</sup> giornata di incubazione modifica qualitativamente il tipo di lipidi che normalmente si accumulano nel fegato in prossimità della schiusa, senza variare in modo statisticamente significativo l'intensità dell'accumulo stesso.

Qualitativamente, per quanto è messo in evidenza dall'analisi istochimica, nel fegato degli embrioni trattati mancano le frazioni colesteriniche e cioè il colesterolo libero ed i suoi esteri, mentre sono presenti i fosfolipidi.

Sono dunque le componenti colesteriniche specificatamente sensibili all'antagonista. La variazione della composizione chimica dei lipidi epatici si accompagna a modificazioni morfologiche delle modalità di accumulo.

2° Da un punto di vista quantitativo l'infiltrazione lipidica avviene nella stessa misura nei controlli e nei trattati. Cioè con un progressivo accumulo a partire dalla 15<sup>a</sup> giornata che porta nei trattati il grasso totale dal 18,5 % del peso secco al 52,3 % in 144 ore. Manca dunque nei trattati la rapida steatosi (24-36 ore) tipica dell'antagonista, riscontrabile invece in stadi precoci nello stesso embrione di pollo (8-9<sup>a</sup> giornata) [4]. Nel periodo della infiltrazione fisiologica pertanto anche in presenza di etionina, i lipidi si accumulano secondo il ritmo proprio dell'epatocita, anche se qualitativamente modificati.

3° L'analisi gas-cromatografica conferma che il danno primario da etionina è riferibile ad alterazioni del metabolismo lipidico endocellulare prima che a modificazioni dei meccanismi di trasporto. Anche nei lipidi che si accumulano i rapporti percentuali di acidi grassi sono interessati dall'etionina e in un senso (desaturazione) che è prova, almeno indiretta, di una alterazione del metabolismo. Sarebbe in tal senso interessante stabilire le modalità delle ossidazioni cellulari nei trattati rispetto ai controlli (1-3).

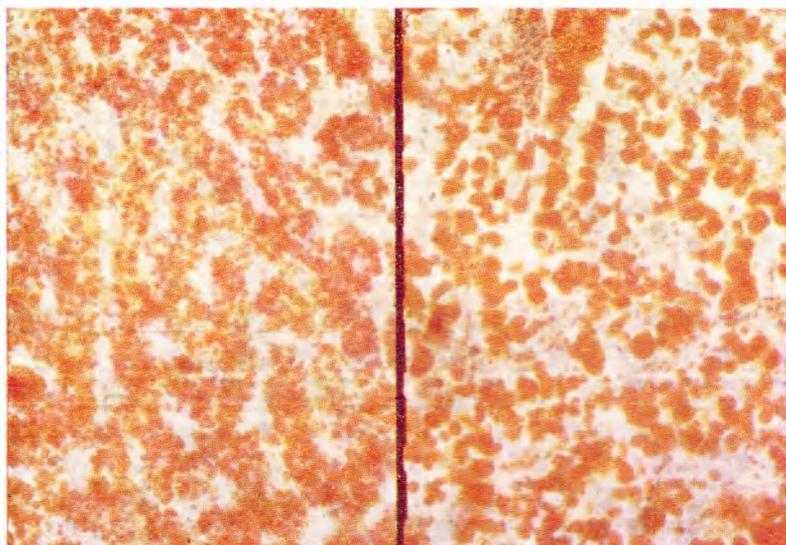
4° I meccanismi attraverso i quali l'etionina influenza la composizione lipidica epatica rimangono ancora da precisare. Gli aminoacidi solforati modificano il tasso colesterolemico, forse in rapporto con il loro gruppo —SH [22]; che il gruppo —SC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> dell'etionina possa ingranare nei processi del metabolismo intermedio dei gruppi —SH è stato già dimostrato nella necrosi epatica tiolopriva da bromobenzene [20].

L'esame delle lipoproteine seriche potrebbe consentire di discriminare la parte dovuta ai meccanismi di trasporto dal vitello.

5° La steatosi etioninica è infine indipendente dal sesso, nel senso che negli embrioni ♂♂ manca l'azione protettiva esplicata dagli ormoni androgeni nell'animale adulto, benché tali ormoni siano secreti anche dall'embrione in tale periodo di sviluppo [21].

#### REFERENZE BIBLIOGRAFICHE.

- [1] ARTOM C., « J. Biol. Chem. », 234, 2259 (1959).
- [2] CARINCI P., MANZOLI F. A., « Riv. Istoc. Norm. Pat. » (in stampa).
- [3] CESTARI A., RIZZOLI C., DESSI P., « La Ricerca Sci. », 28, 756 (1958).
- [4] DESSI P., RIZZOLI C., CESTARI A., « La Ricerca Sci. », 29, 1446 (1959).
- [5] DUMM M., LEVY M., « J. Cell. Comp. Physiol. », 33, 373 (1949).
- [6] FARBER E., « Advance. Cancer Res. », 7, 383 (1963).
- [7] FARBER E., KOCH-WESER D., POPPER H., « Endocrinology », 48, 205 (1951).
- [8] FARBER E., LOMBARDI B., CASTELLI A. E., « Lab. Inv. », 12, 873 (1963).
- [9] FARBER E., SIMPSON M. V., TARVER H., « J. Biol. Chem. », 192, 91 (1950).
- [10] FEIGENBAUM A. S., FISHER H., « Brit. J. Nutr. », 17, 51 (1963).
- [11] FURMANN R. H., NORCIA L. N., ROBINSON C. W., GONZALES I. E., « Amer. J. Physiol. », 191, 561 (1957).
- [12] HARRIS P., ROBINSON D., « Biochem. J. », 80, 352 (1961).
- [13] HARRIS P., ROBINSON D., « Biochem. J. », 80, 361 (1961).
- [14] JAMES A. T., « Methods of Biochemical analysis », 8, 1 (1960).
- [15] JENSEN D., CHAIKOFF L., TARVER H., « J. Biol. Chem. », 192, 395 (1951).
- [16] LOMBARDI B., RECKNAGEL O., « Fed. Proc. », 20, 289 (1961).
- [17] NEDHAM J., *Biochemistry and Morphogenesis*, Cambridge 1950.
- [18] OLMSTED C. A., « Fed. Prod. », 14, 375 (1955).
- [19] RIZZOLI C., « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 26, 7 (1950).
- [20] RIZZOLI C., DESSI P., CESTARI A., « La Ricerca Sci. », 29, 2405 (1959).
- [21] ROMANOFF A. L., *The Avian Embryo*, MacMillan, New York 1960.
- [22] SEIDEL J., HARPER H. E., « Jour. Lipid. Res. », 4, 75 (1963).
- [23] SIMMONDS S. e coll., « J. Biol. Chem. », 183, 191 (1950).
- [24] STEKOL J. A., WEISS K., « J. Biol. Chem. », 185, 577 (1950).



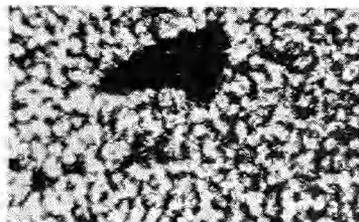
1

2

Colorazione Sudan III, Ingrandimento  $400\times$  -

1-2 Controllo e trattato in 21.ma giornata





1



2

Esame al microscopio polarizzatore (test  
alla digitonina). Ingrandimento 1000  $\times$ .

1-2 Controllo e trattato in 21<sup>a</sup> giornata.