

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

ALFREDO CURATOLO, PIETRO D'ARCANGELO, ANDREA LINO, ALDO BRANCATI

## **Effetti della stimolazione elettrica sulla concentrazione di acido N-acetilaspatico del tessuto cerebrale sopravvivate in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.5, p. 703–706.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1964\\_8\\_36\\_5\\_703\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_5_703_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/>



**Fisiologia.** — *Effetti della stimolazione elettrica sulla concentrazione di acido N-acetilaspatico del tessuto cerebrale sopravvivate in vitro* (\*). Nota di ALFREDO CURATOLO, PIETRO D'ARCANGELO, ANDREA LINO e ALDO BRANCATI, presentata (\*\*\*) dal Socio G. AMANTEA.

L'interesse suscitato dal reperto di elevate concentrazioni di acido N-acetilaspatico libero nell'encefalo di varie specie animali (Tallan e coll. [1], Curatolo [2]) ha promosso una serie di ricerche, che pur avendo permesso di acquisire utili informazioni su questo composto (meccanismo di biosintesi [3] [4], distribuzione nei vari segmenti del nevrasso [5] [6] e nelle diverse frazioni subcellulari del tessuto cerebrale [7], rapporti con i processi respiratori delle strutture nervose [8], comportamento della sua concentrazione encefalica in relazione con le prime fasi dello sviluppo post-natale [3] [5] [9] [10]), lasciano tuttavia del tutto insoluto il problema dei suoi rapporti con i processi biochimici e funzionali del sistema nervoso. Nessun elemento da cui poter trarre un preciso indirizzo per la conoscenza di questi rapporti è emerso, in particolare, dalle varie ricerche condotte sul comportamento dell'acido N-acetilaspatico encefalico in animali in condizioni di grave perturbamento del metabolismo e dell'attività funzionale del sistema nervoso: in nessuna delle condizioni finora esplorate (coma ipoglicemico da insulina [11], beri-beri acuto [12], stati convulsivi da elettroshock [13] e da farmaci [14] [15], narcosi [15]) è stato possibile, infatti, rilevare sicure e costanti modificazioni della concentrazione di questo composto. Riservandoci di proseguire le ricerche in questa direzione, con lo studio sull'organismo *in vivo* degli effetti di altre condizioni non ancora prese in esame, abbiamo intanto ritenuto opportuno trasferire le indagini sul tessuto cerebrale sopravvivate *in vitro*, onde poter realizzare condizioni sperimentali più direttamente controllabili e non sempre facilmente riproducibili sull'animale *in vivo*. Con le ricerche di cui riferiamo i risultati in questa Nota abbiamo voluto innanzi tutto indagare quali effetti avesse sulla concentrazione dell'acido N-acetilaspatico del tessuto cerebrale uno stato durevole di esaltata attività, quale può essere indotto *in vitro* da una stimolazione elettrica a lungo protratta (McIlwain ed altri [16]). Nell'eventualità, poi, che l'acido N-acetilaspatico, in analogia con quanto è stato riferito da Korey e coll. [17] per i derivati N-acetilici di altri aminoacidi (glicina, L-alanina, L-lisina), possa fungere reversibilmente da donatore di radicali acetilici per la sintesi dell'acetilcolina, abbiamo voluto saggiare se e come si modificasse in queste condizioni la sua concentrazione associando

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia Umana dell'Università di Roma diretto dal prof. G. Martino.

(\*\*) Nella seduta del 9 maggio 1964.

all'applicazione dello stimolo elettrico l'azione di un anticolinesterasico (salicilato di eserina), onde impedire il disimpegno del radicale acetilico dall'acetilcolina liberata dalla stimolazione (Rowell [18]).

Le esperienze sono state condotte su sospensioni cellulari di tessuto cerebrale di ratto (ratti Wistar adulti, del peso di circa 160 g), allestite in liquido di Krebs-Ringer fosfati pH 7,4 [19] addizionato con glicoso (0,01 M) e convenientemente ossigenato. Uccisi gli animali per decapitazione, veniva prelevato immediatamente l'intero cervello e rapidamente pesato. Per ogni serie di prove un gruppo di 10 cervelli era sottoposto a blanda omogeneizzazione, in 5 volumi del liquido di Krebs-Ringer, mediante apparecchio di Potter-Elvehjem munito di pistone di teflon a scarsa tenuta [20], secondo la tecnica usata da Elliott e coll. [21]. La sospensione così ottenuta veniva portata alla concentrazione di 1 g di tessuto per 10 ml, per aggiunta di altro liquido di Krebs-Ringer, e distribuita in aliquote di 25 ml (2,5 g di tessuto) in quattro beaker di vetro di 40 mm di diametro interno e 80 mm di altezza, mantenuti in bagnomaria alla temperatura di 37°C. Due aliquote della sospensione venivano sottoposte a stimolazione elettrica protratta per tutto il tempo di incubazione (10 min), dopo aver aggiunto ad una di esse 0,6 mg di salicilato di eserina (pari a 0,4 mg di eserina base); le altre due aliquote erano utilizzate come controlli (uno con eserina e l'altro senza). Per la stimolazione elettrica ci siamo serviti di coppie di elettrodi a griglia, del tipo di quelli descritti da McIlwain [22]. La coppia di elettrodi era costituita da due griglie di fili metallici d'oro fissate a due armature circolari in plexiglas di 30 mm di diametro, sovrapposte l'una all'altra a distanza di 1 cm. Gli elettrodi venivano collegati alla rete di illuminazione (corrente alternata sinusoidale, 50 cicli/sec, 120 V), mediante interposizione di un trasformatore e di un interruttore, e immersi nella sospensione di tessuto. I parametri della stimolazione furono in ogni caso i seguenti: frequenza 100/sec, 8,5 V e 60 mA (misurati a livello delle griglie dei due elettrodi immersi nella sospensione), durata 10 min.

TABELLA I.

*Concentrazione di acido N-acetilaspartico nel tessuto cerebrale sopravvissuto in vitro (\*).*

(mg per 100 g di tessuto fresco)

CONTROLLI		STIMOLAZIONE ELETTRICA (10 min, 100/sec, 8,5 V, 60 mA)	
Senza eserina	Con eserina	Senza eserina	Con eserina
80,5 ± 7,3 (**)	79,5 ± 6,8	82 ± 7,5	83 ± 4,5

(\*) Medie ottenute da 4 serie di prove.

(\*\*) Scarto quadratico medio ( $\sigma$ ).

Al termine dei 10 min di incubazione le varie aliquote della sospensione di tessuto venivano immediatamente sottoposte a deproteinizzazione, per aggiunta di acido perclorico (concentrazione finale, 0,33 N). Su ciascuna di esse si procedeva quindi alla determinazione della concentrazione dell'acido N-acetilaspatico, con il metodo cromatografico già dettagliatamente descritto in una precedente Nota [2].

Dai risultati, riportati in Tabella I, si rileva che la stimolazione elettrica nelle condizioni sperimentali da noi attuate non modifica in misura significativa la concentrazione dell'acido N-acetilaspatico del tessuto cerebrale sopravvivate *in vitro*. Il fatto che la concentrazione di questo composto risulti praticamente invariata al termine di uno stato protratto di esaltata attività del tessuto, qual'è quello ottenibile dall'applicazione prolungata dello stimolo elettrico, lascia supporre, nei limiti in cui è lecito rapportare la situazione sperimentale da noi realizzata alle condizioni che si verificano *in vivo*, che l'acido N-acetilaspatico non partecipi direttamente ai meccanismi metabolici impegnati nei processi di trasformazione e di trasferimento di energia legati allo stato di attività. Ad analoga considerazione portano i risultati in precedenza ottenuti da noi e da altri in alcune esperienze cui si è accennato all'inizio di questa Nota, in particolare quelli che rivelano l'incapacità dell'acido N-acetilaspatico a fungere da substrato ossidabile per la cellula nervosa [8] e quelli relativi al comportamento di questo composto negli stati convulsivi da elettroshock [13] e da farmaci [14]. La constatazione, infine, che la concentrazione di acido N-acetilaspatico del tessuto stimolato risulta imm modificata anche aggiungendo un anticolinesterasico al mezzo di incubazione sembra escludere la possibilità che questo composto intervenga come donatore di acetili nelle reazioni del ciclo dell'acetilcolina.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] H. H. TALLAN, S. MOORE e W. H. STEIN, « J. Biol. Chem. », 219, 257 (1956).
- [2] A. CURATOLO, « Rend. Acc. Naz. Lincei », XXXI, fasc. 3-4, 145 (1961).
- [3] K. B. JACOBSON, « J. Gen. Physiol. », 43, 323 (1959).
- [4] F. B. GOLDSTEIN, « Biochim. Biophys. Acta », 33, 583 (1959); « J. Biol. Chem. », 234, 2702 (1959).
- [5] H. H. TALLAN, « J. Biol. Chem. », 224, 41 (1957).
- [6] A. CURATOLO, P. D'ARCANGELO e L. CECCHI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 39, 1755 (1963).
- [7] P. D'ARCANGELO, A. LINO e A. BRANCATI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 39, 967 (1963).
- [8] A. CURATOLO, P. D'ARCANGELO e A. BRANCATI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. » (in stampa).
- [9] A. BRANCATI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 39, 1000 (1963).
- [10] A. CURATOLO, P. D'ARCANGELO, A. BRANCATI e L. CECCHI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 39, 1948 (1963).
- [11] A. CURATOLO e P. D'ARCANGELO, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. » (in stampa).
- [12] A. CURATOLO, P. D'ARCANGELO e A. BRANCATI, « Quaderni della Nutrizione » (in stampa).
- [13] A. CURATOLO, P. D'ARCANGELO e A. BRANCATI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », questo fasc.

- [14] J. K. TEWS, S. H. CARTER, P. D. ROA e W. E. STONE, « J. Neurochem. », 10, 641 (1963).
- [15] R. U. MARGOLIS, S. S. BARKULIS e A. GEIGER, « J. Neurochem. », 5, 379 (1960).
- [16] H. MCILWAIN, *Biochemistry and the Central Nervous System*, 1955, Churchill, London, *bibl.*; *Chemical exploration of the brain*, 1963, Elsevier Publ. Co., London, *bibl.*
- [17] S. R. KOREY, B. DE BRAGANZA e D. NACHMANSOHN, « J. Biol. Chem. », 189, 705 (1951).
- [18] E. V. ROWSELL, « Biochem. J. », 57, 666 (1954).
- [19] H. A. KREBS, « Ztschr. Physiol. Chem. », 217, 191 (1933).
- [20] H. MCILWAIN e R. RODNIGHT, *Practical Neurochemistry*, p. 131, 1962, Churchill, London.
- [21] K. A. C. ELLIOTT e B. LIBET, « J. Biol. Chem. », 143, 227 (1942); K. A. C. ELLIOTT e M. HENRY, *ibidem*, 163, 351 (1946); M. K. BIRMINGHAM e K. A. C. ELLIOTT, *ibidem*, 189, 73 (1951).
- [22] H. MCILWAIN e R. RODNIGHT, *loc. cit.*