
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

NICOLA BONASERA, GAETANO MANGIONE, VINCENZO
BONAVITA

Effetti della Reserpina sulla escrezione urinaria di metaboliti della nicotinamide nel topo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 37 (1964), n.3-4, p.
207-212.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_37_3-4_207_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/>

Patologia (Biochimica Farmacologica): — *Effetti della Reserpina sulla escrezione urinaria di metaboliti della nicotinamide nel topo*^(*). Nota ^(**) di NICOLA BONASERA, GAETANO MANGIONE e VINCENZO BONAVITA, presentata dal Socio L. CALIFANO.

È opinione diffusa che l'azione centrale della reserpina sia intimamente legata ad un effetto primario di essa sul livello encefalico di serotonina, 3-idrossitiramina e noradrenalina. Non v'è dubbio, tuttavia, che la reserpina è responsabile di interferenze metaboliche molto più numerose [1]. La sua capacità di modificare la sintesi ed il turnover del NAD epatico ed encefalico è uno degli effetti cui non è stata finora dedicata molta attenzione sperimentale [2, 3, 4].

Nel 1961, Bonavita *et al.* [5] hanno isolato dall'urina di topo quantità non trascurabili di nicotinamide-N-ossido, ed hanno dimostrato che l'azaserina induce un decremento rapido e cospicuo della escrezione di esso. Poiché l'azaserina deprime la sintesi epatica ed encefalica di NAD [6, 3], è sembrato suggestivo considerare la nicotinamide-N-ossido come possibile derivato metabolico del NAD epatico, a differenza della N'-metil-nicotinamide, la cui escrezione è proporzionale a quella parte di nicotinamide iniettata, che non viene utilizzata nella sintesi di NAD.

Gli esperimenti descritti in questa Nota si propongono di correlare l'effetto della reserpina sulla sintesi encefalica ed epatica di NAD con modifiche eventuali della escrezione urinaria di metaboliti del precursore, iniettato in dosi che stimolino la sintesi del coenzima.

PARTE SPERIMENTALE.

Sono stati usati topi albini di sesso maschile, e di peso oscillante tra i 18 ed i 23 grammi.

La Nicotinamide 7-C¹⁴ (10,7 mc/mM), iniettata per via intraperitoneale alla dose di 2 microcuries per animale, era un prodotto del Radiochemical Center (Amersham, England). La nicotinamide non radioattiva, iniettata simultaneamente in quantità di 500 mg/kg di peso corporeo, era un prodotto della California Corporation for Biochemical Research (Los Angeles, Calif., U.S.A.).

(*) Lavoro eseguito nella Clinica Neurologica dell'Università di Palermo con contributi (grant B-2917) del National Institute for Neurological Diseases and Blindness, e del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Pervenuta all'Accademia il 30 settembre 1964.

La reserpina (Ciba Pharmaceutical Products, Summit, N.J., U.S.A.) è stata iniettata anche essa per via intraperitoneale, in quantità di 2 mg/kg, come soluzione lievemente acida (pH 5-5,5). Essa è stata, infatti, disciolta in una soluzione diluita di acido acetico glaciale (0,2-0,4 %), parzialmente neutralizzata per aggiunta successiva di NaOH 2 N.

In un esperimento tipico, la raccolta dell'urina è stata compiuta per 24 ore ad intervalli fissi (4, 8, 12, 20, 24 ore). Durante il periodo di raccolta dell'urina, i topi, privati di acqua oltre che di cibo, venivano sottoposti ad iniezioni intraperitoneali di 0,5 ml di H₂O bidistillata ogni 4 ore. I campioni di urina venivano conservati a -20°C fino al momento della misurazione della radioattività totale e delle altre indagini sottoindicate.

La radioattività totale dell'urina è stata determinata in un contatore a flusso di gas connesso ad uno Scaler SC-73 Versa/Matic II (Tracerlab, Waltham, Mass., U.S.A.), dopo deposizione di piccole aliquote su piastrine di alluminio. Le stesse frazioni urinarie sono state sottoposte a cromatografia ascendente su carta Whatman N° 3, usando come solvente n-butanolo saturato con H₂O distillata. I cromatogrammi sono stati esaminati con luce UV, usando una lampada Mineralight (Model SL 2537) della Ultraviolet Products Inc. (San Gabriel, Calif., U.S.A.) e quindi tagliati in segmenti di cm 0,5. Dopo eluzione in 3 ml di H₂O distillata per 24 ore a temperatura ambiente, la radioattività dei singoli segmenti del cromatogramma è stata misurata con l'apparecchiatura sopradescritta, deponendo aliquote degli eluati su piastrine di alluminio.

RISULTATI.

La fig. 1 offre una rappresentazione sintetica della radioattività totale escreta dai topi iniettati con 2 microcuries di nicotinamide 7-C¹⁴ (500 mg/kg), e da un gruppo identico di animali iniettati con reserpina (2 mg/kg), 4 ore prima della somministrazione intraperitoneale della nicotinamide radioattiva.

Appare con chiarezza dalla fig. 1 che la reserpina ritarda sensibilmente l'escrezione urinaria della radioattività totale, che solo negli animali di controllo è quasi nulla alla 24^a ora (1).

Come è ovvio, la radioattività totale, indicata in fig. 1, è la somma della radioattività di composti diversi, tra cui la nicotinamide libera e la nicotinamide-N-ossido sono quantitativamente prevalenti. La prevalenza di questi due composti appare chiaramente in fig. 2, che dà una rappresentazione diagrammatica di un *pattern* escretorio tipico, quale può osservarsi dopo somministrazione di nicotinamide 7-C¹⁴.

(1) È degno di menzione il reperto, non indicato in fig. 1, della somiglianza tra la curva escretoria dopo reserpina e quella dopo clorpromazina, e della completa assenza di modifiche della curva escretoria da parte di imipramina, iniettata anche in dosi di 5 mg/kg (BONASERA *et al.*, osservazioni inedite).

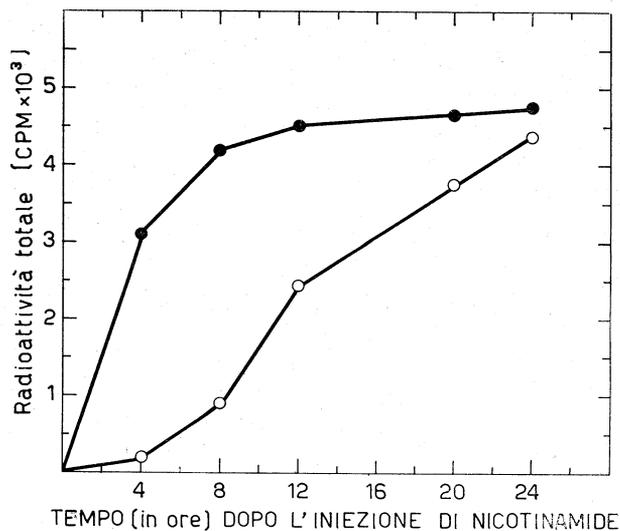


Fig. 1. - Eliminazione urinaria di C¹⁴ dopo l'iniezione di 2 micro-curies di nicotina-*mide-7-C¹⁴* (12,5 mg) per topo.

Un gruppo di 20 topi è stato pretrattato con reserpina (2 mg/kg), 4 ore prima dell'iniezione di nicotina-*mide-7-C¹⁴* (12,5 mg/kg); l'altro gruppo non ha ricevuto alcun trattamento farmacologico preliminare (●). Ciascun punto sperimentale rappresenta la radioattività escretata dal tempo zero fino al tempo indicato.

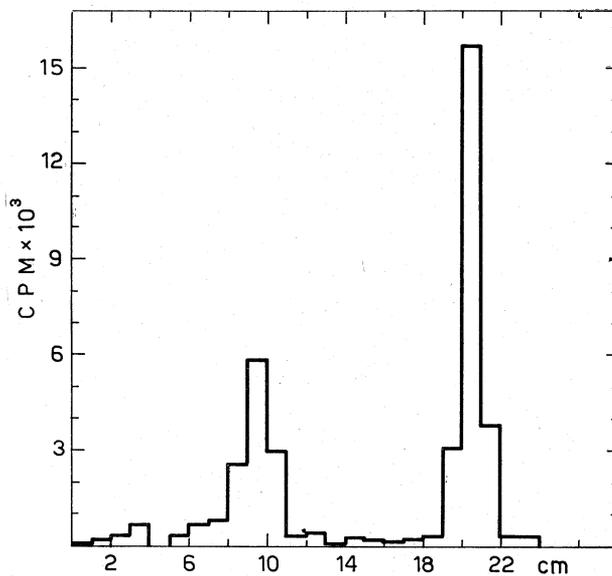


Fig. 2. - *Pattern* escretorio tipico dopo somministrazione di 2 micro-curies di nicotina-*mide-7-C¹⁴* (12,5 mg) per topo.

100 microlitri dell'urina, eliminata nelle prime 4 ore, sono stati sottoposti a cromatografia su carta in *n*-butanolo saturato con H₂O. Le due componenti maggiori rappresentano rispettivamente, dopo la linea di deposizione, la nicotina-*mide-N-ossido* e la nicotina-*mide*. Per i criteri di identificazione di tali composti si veda [6].

Il rapporto tra la radioattività della nicotinamide e quella della nicotinamide-N-ossido non è, tuttavia, costante dopo la somministrazione del precursore in dose di 500 mg/kg. La fig. 3 dimostra che tale rapporto va incontro ad un decremento progressivo e rapido, riducendosi da 1,8 ad 1,1 nelle prime 12 ore dopo l'iniezione di nicotinamide $7-C^{14}$. Il pretrattamento degli animali con reserpina determina una modifica sensibile delle variazioni nel tempo di tale rapporto. La fig. 3 dimostra, infatti, che in tale caso, durante le prime 12 ore dopo l'iniezione di nicotinamide radioattiva, il rapporto non varia. Essa dimostra, inoltre, che il rapporto non supera il valore di 1,4 e che un decremento rapido di esso si verifica solo dopo la 20^a ora dalla iniezione del precursore.

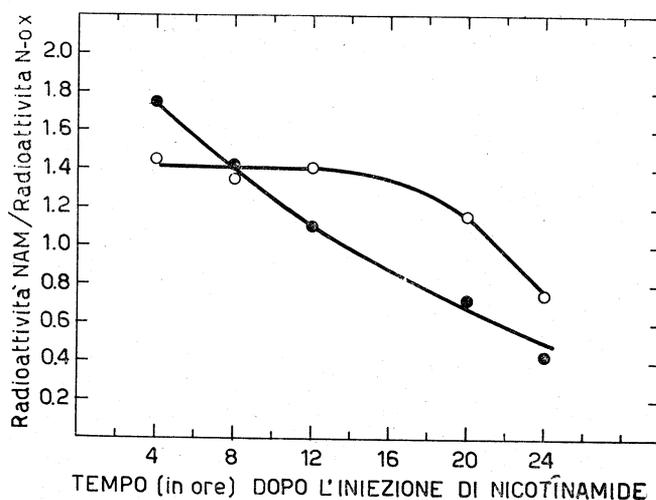


Fig. 3. - Rapporto tra la radioattività della nicotinamide e la radioattività della nicotinamide-N-ossido escreti nell'urina di topo dopo somministrazione di 2 microcuries di nicotinamide- $7-C^{14}$ (12,5 mg) per topo.

Un gruppo di 20 topi è stato pretrattato con reserpina (2 mg/kg), 4 ore prima dell'iniezione di nicotinamide radioattiva (O); l'altro gruppo non ha ricevuto alcun trattamento farmacologico preliminare (●).

DISCUSSIONE.

I risultati descritti in questa Nota meritano un breve commento. La escrezione urinaria da parte di topi iniettati con reserpina e nicotinamide $7-C^{14}$, è, nelle prime 24 ore dopo la somministrazione intraperitoneale del composto marcato, minore e più lenta della escrezione osservata negli animali iniettati con il solo precursore. Questa differenza fa ritenere che, in presenza di reserpina, la nicotinamide $7-C^{14}$ rimanga più a lungo nell'animale. È, tuttavia, incerto se il rallentamento dell'escrezione di metaboliti radioattivi sia primitivo o conseguente ad un assorbimento rallentato del precursore iniettato per via intraperitoneale. Questa ipotesi non appare inverosimile quando

si tiene conto del fatto che, negli animali pretrattati con reserpina, l'incremento della radioattività epatica ed encefalica è molto più lento che nei controlli [4].

È pertinente sottolineare, a questo proposito, che la clorpromazina, che interferisce anch'essa con la biosintesi del NAD epatico [2], induce modifiche del pattern escretorio molto simili a quelle determinate dalla reserpina (Bonasera *et al.*, osservazioni inedite).

Il fenomeno più interessante tra quelli osservati è, a nostro parere, l'altezzazione qualitativa del *pattern* escretorio. La fig. 3 e la Tabella I suggeriscono alcune considerazioni in proposito. Dopo reserpina, l'escrezione assoluta di nicotinamide e di nicotinamide-N-ossido, alla 4^a ora dopo l'iniezione, è minore che nei controlli, mentre è molto più elevata alla 20^a ora. L'analisi dei risultati nella Tabella I e nella fig. 3 fa ritenere che il rapporto tra i due composti, alla 4^a ora dopo l'iniezione, sia più basso negli animali pretrattati con reserpina che in quelli di controllo, non perché siano elevati nei primi i valori della nicotinamide-N-ossido, quanto perché sono relativamente bassi i valori della nicotinamide escreta. Al contrario, il decremento tardivo del rapporto stesso, in presenza di reserpina, non sembra conseguente ad un decremento della nicotinamide, che continua ad essere escreta in quantità cospicua, quanto all'incremento non trascurabile della nicotinamide-N-ossido. Quest'ultimo reperto è degno di particolare attenzione, in quanto, pur non rappresentando una prova diretta, è un risultato sperimentale in accordo con l'ipotesi che la nicotinamide-N-ossido sia un metabolita del NAD, che, proprio dopo la 20^a ora, raggiunto il suo valore massimo nel fegato, incomincia a diminuire.

TABELLA I.

Effetto della reserpina sulla escrezione urinaria di C¹⁴ da parte di topi iniettati con nicotinamide-7-C¹⁴ ().*

Tempo (in ore) dopo l'iniezione di nicotinamide-7-C ¹⁴	Composti iniettati	Radioattività della nicotinamide (cpm/100 µl di urina)	Radioattività della nicotinamide-N-ossido (cpm/100 µl di urina)
4	Nicotinamide	24036	12278
	Nicotinamide + Reserpina	12108	8421
20	Nicotinamide	2370	3180
	Nicotinamide + Reserpina	13200	19800

(*) Per le condizioni sperimentali, si veda il testo.

I risultati descritti consentono anche un'altra conclusione di qualche valore: essi inducono cioè, a ritenere che gli effetti della reserpina sulla sintesi e *turnover* del NAD epatico e cerebrale [3, 4] siano mediati, almeno parzialmente, dalle interferenze del composto con lo assorbimento ed eliminazione dei precursori iniettati.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] J. J. LEVIS, in *Physiological Pharmacology* (edited by W. S. Root and F. G. Hofman). Vol. I, p. 479. Academic Press Inc., New York 1963.
- [2] R. M. BURTON, N. O. KAPLAN, A. GOLDIN, M. LEITENBERG, S. R. HUMPHREYS, S. R. SODD, « *Science* », 127, 30 (1958).
- [3] N. BONASERA, G. MANGIONE, V. BONAVIDA, « *Biochem Pharmacol.* », 12, 633 (1963).
- [4] N. BONASERA, G. MANGIONE, V. BONAVIDA, « *Int. J. Neuropharmacol.* », in corso di stampa.
- [5] V. BONAVIDA, S. A. NARROD, N. O. KAPLAN, « *J. Biol. Chem.* », 236, 936 (1961).
- [6] S. A. NARROD, V. BONAVIDA, E. R. EHRENFELD, N. O. KAPLAN, « *J. Biol. Chem.* », 236, 931 (1961).