
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GUIDO PALLADINI, AMICO BIGNAMI, GIORGIO
VENTURINI

Prime osservazioni biochimiche sull'inibizione dell'ATPasi di membrana nel ratto in vivo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.5, p. 372–374.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_5_372_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. — *Prime osservazioni biochimiche sull'inibizione dell'ATPasi di membrana nel ratto in vivo* (*). Nota di GUIDO PALLADINI, AMICO BIGNAMI e GIORGIO VENTURINI, presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

In una Nota precedentemente presentata a codesta Accademia (Bignami e Palladini [1]) ed in una serie di successivi lavori (Bignami e Palladini, 1965 [2]; Stefanelli, Palladini e Ieradi, 1965 [3]; Bignami, Palladini, Appicciutoli e Maccagnani, 1965 [4]; Palladini, Venturini e Borghi, 1965 [5]) ci siamo occupati dei fenomeni nervosi, funzionali e morfologici; che avvengono in Vertebrati (rana, rospo, lucertola, pollo, ratto e cavia) iniettati intracranialmente con il glucoside G-strofantina (*ouabaina*), attualmente riconosciuto come il più potente inibitore (*in vitro*) del complesso enzimatico (ATPasi di membrana, sodio-potassio dipendente) deputato al trasporto attivo di acqua ed elettroliti attraverso la membrana cellulare. Rimandando ai lavori già citati per ulteriori particolari e per la bibliografia relativa, intendiamo qui sottolineare il fatto che, benché probabile, è mancata finora la dimostrazione che il glucoside attivo *in vitro*, lo fosse anche *in vivo*, sí che si potesse attribuire all'inibizione enzimatica il complesso dei fenomeni osservati, escludendo eventuali altre azioni tossiche della sostanza usata. Ci siamo perciò accinti a determinare se, nei cervelli trattati *in vita* con l'ouabaina esistesse realmente una inibizione del complesso enzimatico; le nostre indagini sono state rivolte alle prime ore dell'avvelenamento, in cui sono molto chiari i fenomeni funzionali, ma lievi quelli morfologici (rigonfiamento gliale, stato spongioso corticale), in modo da poter escludere che l'eventuale diminuzione dell'attività enzimatica fosse in relazione alla distruzione del tessuto. Per questa ricerca abbiamo impiegato il metodo biochimico, non essendoci possibile una valutazione istochimica dell'attività enzimatica per la mancanza di tecniche adeguate (Bonting, 1962 [6]; Novikoff et al., 1961 [7]).

Le ricerche sono state compiute su ratti albin Wistar, dello stesso peso ed età, di cui alcuni sono stati tenuti come controlli ed altri sono stati iniettati con le modalità di cui ai precedenti lavori, con una dose di mg 0,5 di ouabaina BDH. Gli encefali sono stati estratti a partire da 2 fino a 3 1/2 h dopo l'intervento, sacrificando gli animali per decapitazione, dopo esserci accertati che gli stessi presentassero i sintomi peculiari dell'avvelenamento.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata «G. B. Grassi» della Università di Roma (direttore prof. A. Stefanelli) e nel Centro di Neuroembriologia del C.N.R. con i contributi del Gruppo di Embriologia.

(**) Nella seduta del 13 novembre 1965.

Gli emisferi sono stati separati dal tronco encefalico ed omogenati in acqua distillata, parte insieme, parte separatamente per le due metà. L'omogenato è stato liofilizzato e conservato a -11° . La determinazione dell'attività enzimatica è stata eseguita con il metodo di Bonting et al., 1961 [8] che consiste nell'incubare una certa quantità del liofilizzato con ATP in 4 mezzi di cui tre atti ad inibire l'attività dell'ATPasi Na-K dip. per assenza di ioni sodico-potassici, o per presenza di ouabaina o per entrambi. Il fosfato liberato per azione dell'enzima è valutato spettrofotometricamente mediante la reazione al blu di molibdeno. La reazione avviene a pH 7,5, in presenza di CN⁻ per inibire la fosfatasi alcalina. L'attività specifica si ricava per differenza tra l'attività media dei tre mezzi in cui essa è inibita e la attività del mezzo completo.

Gli esemplari trattati mostrano, se la determinazione viene fatta sul liofilizzato di *entrambi* gli emisferi riuniti, una inibizione dell'ordine del 20% rispetto ai controlli; se invece la determinazione viene eseguita su liofilizzati *separati* dell'emisfero iniettato e del controlaterale, si osserva che mentre quest'ultimo non mostra una apprezzabile riduzione dell'attività enzimatica specifica, l'emisfero iniettato mostra una inibizione dell'ordine del 50-60%. Questo è in accordo con quanto da noi rilevato morfologicamente, in quanto abbiamo costantemente notato che le lesioni caratteristiche, ed in particolare lo stato spongioso, erano localizzate prevalentemente alla corteccia del lato iniettato.

Queste ricerche, di cui abbiamo esposto solo i primi risultati, dimostrano che l'inoculazione intracranica della ouabaina porta effettivamente, in accordo a quanto da noi supposto sulla base delle osservazioni di altri AA. *in vitro*, ad una inibizione dell'ATPasi di membrana. Va inoltre considerato che in queste ricerche preliminari noi abbiamo saggiato l'attività enzimatica su materiale che comprendeva formazioni anatomiche, quali il talamo ed il corpo striato, che nella massima parte dei casi da noi esaminati istologicamente non hanno lesioni. È quindi presumibile che se la ricerca fosse stata fatta isolando la corteccia cerebrale che presenta le alterazioni più gravi ed estese (Bignami e Palladini, lav. cit.) la diminuzione dell'attività enzimatica sarebbe stata più marcata.

È a notarsi che i glicosidi cardioattivi sono rintracciabili nei visceri degli animali da esperimento solo se iniettati a dosi molte volte superiori a quella letale e quindi rapidamente mortali (Mameli, 1927 [9]). Ci sembra quindi verosimile che l'inibizione enzimatica da noi osservata negli omogenati di cervello degli animali trattati sia dovuta ad una inibizione *in vivo* e non all'azione di ouabaina ancora presente tre ore dopo l'iniezione intracranica. Abbiamo in corso ricerche tendenti ad una maggiore precisazione del dato quantitativo ed ad una discriminazione topografica più fine del fenomeno inibitorio stesso.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. BIGNAMI e G. PALLADINI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 38, 253 (1965).
- [2] A. BIGNAMI e G. PALLADINI, *Vth Intl. Congr. Neuropath. Zurigo 1965* (in stampa).
- [3] A. STEFANELLI, G. PALLADINI e L. IERADI, « *Experientia* » (in stampa).
- [4] A. BIGNAMI, G. PALLADINI, L. APPICCIUTOLI e F. MACCAGNANI, « *Acta Neuropath.* » (in stampa).
- [5] G. PALLADINI, G. VENTURINI e F. BORGHI, « *Boll. Zool.* » (in stampa).
- [6] S. L. BONTING, L. L. CARAVAGGIO e N. M. HAWKINS, « *Arch. Bioch. Bioph.* », 98, 413 (1962)
- [7] A. B. NOVIKOFF, J. DRUCKER, W. Y. SHIN e S. GOLDFISCHER, « *J. Histochem. Cytochem.* » 9, 434 (1961).
- [8] S. L. BONTING, K. A. SIMON e N. M. HAWKINS, « *Arch. Bioch., Bioph.* », 95, 416 (1961).
- [9] E. MAMELI, *Tossicologia*, vol. XII/2, p. 902, in *Nuova Enciclopedia di Chimica, etc.* Ed. I. Guareschi-F. Garelli, Torino, UTET, 1927.

SUMMARY. — Intracranial injection of ouabain in the rat produces marked inhibition of cerebral Na-K dependent ATPase. The clinical, EEG and histological effects have been described elsewhere.