
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIAMPAOLO PACE, ENRICO CLERICI

Glicolisi aerobia in mezzi di incubazione sintetici e naturali

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.2, p. 280–283.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_2_280_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. — *Glicolisi aerobia in mezzi di incubazione sintetici e naturali*^(*). Nota di GIAMPAOLO PACE e ENRICO CLERICI, presentata^(**) dal Corrisp. E. CIARANFI^(***).

SUMMARY. — The formation of lactic acid from carbohydrate sources in the presence of oxygen (that is aerobic glycolysis) by normal rat tissues incubated in homologous lymph is not depressed as compared to that of the same tissues incubated either in homologous serum or a saline solution. Therefore, the present results are at variance with those of Warburg *et alii* [2] according to which normal tissues incubated in body fluids do not glycolyse aerobically. On the contrary, these data further support the generally held opinion that: 1) aerobic production of lactic acid by many normal tissues is not an artifact dependent on experimental variables but a true biological property of their own, and that; 2) the correlation between aerobic glycolysis and malignancy is not universal.

Warburg [1] ha postulato che una forte glicolisi aerobia è la caratteristica metabolica dominante della crescita neoplastica ed ha sempre negato che i tessuti normali, con l'eccezione della retina, siano in grado di produrre acido lattico dai carboidrati in presenza di ossigeno.

I numerosi dati contrari dimostranti che, oltre la retina, molti altri tessuti normali glicolizzano aerobicamente vengono considerati da Warburg frutto di semplici artefatti connessi al danneggiamento delle cellule durante le operazioni preparatorie o alla loro incubazione in semplici soluzioni saline invece che in mezzi più fisiologici. Questi concetti sono stati recentemente ribaditi dallo stesso Autore il quale non avrebbe osservato una apprezzabile produzione di acido lattico incubando tessuti normali di topo e di ratto, rispettivamente in ascite di tumore di Ehrlich (privata di cellule ed addizionata di glucosio) e siero omologo (addizionato di acido lattico) [2], mezzi che sarebbero, secondo Warburg *et alii* [2] assolutamente fisiologici.

Abbiamo ritenuto utile procedere ad una verifica sperimentale di queste asserzioni, incubando tessuti normali e neoplastici di ratto e tessuti neoplastici di topo in soluzione salina, in siero e linfa di ratto, secondo le modalità tecniche qui di seguito specificate.

Animali di ambo i sessi (la specie e il ceppo vengono citati in Tabella), digiuni da 12 ore, venivano sacrificati per decapitazione. Gli organi normali ed i tumori da esaminare venivano immediatamente isolati e preparati come previsto nelle metodiche convenzionali. Venivano approntati quattro campioni di ogni tessuto, ciascuno dei quali veniva sospeso in 3 ml di ognuno dei tre liquidi di incubazione (preparati come specificato in seguito), contenuti in

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Patologia Generale dell'Università di Milano.

(**) Presentata nella seduta dell'11 febbraio 1966.

(***) Questo lavoro è stato eseguito grazie all'aiuto finanziario del Consiglio Nazionale delle Ricerche (C.N.R.).

particolari vaschette della capacità di circa 40 ml, dotate di una grossa appendice laterale; in questa venivano immessi 3 ml di un tampone carbonati-bicarbonati 3 M, a pH 10.8 e 2 mg di anidra carbonica (Serva, Heidelberg), al fine di mantenere costante la tensione parziale di CO_2 (5%) per tutto il periodo dell'esperimento, come suggerito da Warburg *et alii* [3]. Sia il tampone che l'enzima venivano aggiunti quando le vaschette erano già montate sui manometri, immediatamente prima della loro immersione nel bagno termoregolato. Dopo 15' circa di incubazione a 37°C (fase gassosa = aria; oscillazioni = 100/minuto), due manometri venivano tolti (tempo 0') e gli altri due chiusi e letti. Il consumo di ossigeno veniva determinato ogni 10' per 60'. Le vaschette asportate dai manometri al tempo 0' e al tempo 60' venivano poste in un bagno di ghiaccio fondente. Due ml del medium di incubazione venivano prelevati da ciascuna vaschetta e versati in una provetta da centrifuga contenente due ml di acido perclorico 0,6 M. Dopo centrifugazione e filtrazione su carta, l'acido lattico contenuto nel supernatante limpido veniva determinato enzimaticamente secondo Scholz *et alii* [4].

Il Q_{O_2} e il $Q_{\text{CO}_2/\text{O}_2}$ venivano calcolati come d'abitudine; per quest'ultimo venivano effettuate le opportune correzioni anche in rapporto al periodo di equilibrio a 37°C in aria con manometri aperti.

I mezzi di incubazione impiegati erano: 1) Ringer di Krebs-Henseleit bicarbonato-glucosato [5]; 2) siero di ratto Wistar, scomplementato per riscaldamento a 56°C per 30' e 3) linfa di ratti Wistar.

Quest'ultima veniva raccolta per incannulazione del dotto toracico secondo il metodo di Bollman *et alii* [6], leggermente modificato. Infatti, la cannula di plastica infilata nel dotto non veniva legata con fili di seta ma tenacemente trattenuta in sede grazie all'applicazione di una-due gocce del polimero noto come Eastman 910 o 2-metilcianoacrilato [7].

Gli animali incannulati venivano immessi in una speciale gabbia da contenzione, costruita secondo il modello di Bollman [8], nutriti con dieta commerciale bilanciata ed abbeverati con soluzione fisiologica (NaCl 0,9%). La linfa veniva raccolta per due giorni consecutivi, per ogni animale, in recipienti sterili contenenti soluzione di Hank addizionata di antibiotici ed eparina, come suggerito da Gowans [9]; si eseguiva un «pool» di linfa di sei ratti differenti, il quale veniva centrifugato (per allontanare i linfociti) e scomplementato riscaldando a 56°C per 30'.

I risultati da noi ottenuti sono riportati nella Tabella.

Essi mostrano che la maggioranza dei tessuti normali produce acido lattico in condizioni aerobiche qualunque sia il medium impiegato e che l'entità della glicolisi è soddisfacentemente in accordo con quella riferita in Letteratura per gli stessi tessuti, studiati nei più svariati mezzi di incubazione [10].

I valori trovati sono sempre superiori a quelli recentemente riferiti da Warburg *et alii* [2], secondo i quali gli organi di ratto sospesi in siero mostrano i seguenti $Q_{\text{CO}_2/\text{O}_2}$: fegato, midollare del rene e milza = 0; sostanza bianca e grigia cerebrale, rispettivamente 1,3 e 2,4 e, retina = 13. Nessun altro tessuto è stato studiato da tali Autori.

Assume particolare rilievo la capacità dei tessuti normali, glicolizzanti in soluzione di Krebs-Henseleit e in siero, di mantenere tale prerogativa anche in linfa di dotto toracico, ossia in un mezzo di incubazione sufficientemente fisiologico perché ragionevolmente identificabile con la linfa interstiziale nella quale le cellule sono immerse.

Viene quindi confermata l'opinione di quanti ritengono, contrariamente ai postulati di Warburg, che la glicolisi aerobica non è una proprietà caratteristica ed esclusiva della malignità, essendo presente, anche se in misura variabile, nelle cellule normali sia dei tessuti vivacemente proliferanti che di quelli che si possono considerare relativamente inerti sotto il profilo mitotico.

La stessa Tabella mostra anche che i tumori sperimentali presi in considerazione mantengono, in linfa di ratto, tassi di produzione aerobica di acido lattico del tutto paragonabili a quelli riportati nella Letteratura in esperimenti di incubazione in comuni soluzioni fisiologiche [10] mentre sarebbe lecito attendersi, sempre sulla scorta delle affermazioni di Warburg, che la efficienza glicolitica sia inversamente proporzionale alla fisiologicità del mezzo di sospensione.

L'uso della linfa di ratto, invece che di quella di topo, è resa obbligatoria dal fatto che il topo produce, in media, 2 ml di linfa ogni 24 ore, contro i 20-40 circa del ratto [11]. Tuttavia ciò non dovrebbe rappresentare un serio inconveniente, data la vicinanza tassonomica delle due specie.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] O. WARBURG, « *Biochem. Z.* », *142*, 317 (1923).
- [2] O. WARBURG, K. GAWEHN e A. W. GEISSLER, *Weiterentwicklung der zellphysiologischen methoden*, p. 496, Thieme, Stuttgart (1962).
- [3] O. WARBURG, A. W. GEISSLER e S. LORENZ, *Ibidem*, p. 578.
- [4] R. SCHOLZ, H. SCHMUTZ, TH. BÜCHER e J. O. LAMPEN, « *Biochim. Z.* », *331*, 71 (1959).
- [5] H. A. KREBS e K. HENSELEIT, « *Z. Physiol. Chem.* », *210*, 33 (1932).
- [6] J. L. BOLLMAN, J. C. CAIN e J. H. GRINDLAY, « *J. Lab. clin. Med.* », *33*, 1349 (1948).
- [7] Cortesemente fornito dalla ETHICON, Inc., Somerville, N. J., U.S.A.
- [8] J. L. BOLLMAN, « *J. Lab. clin. Med.* », *33*, 1348 (1948).
- [9] J. L. GOWANS, « *Brit. J. exp. Path.* », *38*, 67 (1957).
- [10] A. C. AISENBERG, *The glycolysis and respiration of Tumours*, Academic Press, New York (1961).
- [11] G. F. MITCHELL e J. F. A. P. MILLER, comunicazione personale (1967).