
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIUSEPPE AMORE, VINCENZO BONAVITA

Latticodeidrogenasi ed aspartato aminotransferasi dell'encefalo di ratto nella intossicazione da nitrofurantoina

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.5, p. 533-538.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_5_533_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. — *Latticodeidrogenasi ed aspartato aminotransferasi dell'encefalo di ratto nella intossicazione da nitrofurantoina* (*). Nota di GIUSEPPE AMORE e VINCENZO BONAVIDA, presentata (**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY.—Lactate dehydrogenase of the brain exhibits a significant, reversible drop of LDH₁ in the intoxication by nitrofurantoin. The observed modification of the LDH pattern has been that occurring in the metabolic shift of the tissue from respiration to glycolysis.

The ratio between the pyridoxal and pyridoxamine form of aspartate aminotransferase has also shown a simultaneous shift toward the predominance of the "pyridoxal form" of the enzyme, as reported for immature and degenerating nervous tissues.

The metabolic significance of the data is briefly discussed.

La nitrofurantoina è un farmaco che deriva il suo interesse per il neurobiologo dal fatto che una polineuropatia periferica, responsabile talvolta di paralisi irreversibile, può insorgere nell'uomo per l'uso protratto di essa e può essere riprodotta sperimentalmente nel ratto (si vedano [1, 2, 3, 4]). D'altra parte, il farmaco può indurre anche lesioni del sistema nervoso centrale [5].

Un'osservazione accidentale sulla composizione multipla della LDH (latticodeidrogenasi) dell'encefalo di ratto, dopo iniezioni intramuscolari ripetute di nitrofurantoina, ha sollecitato la presente indagine. L'encefalo offre, in verità, all'analisi neurochimica un materiale molto più conveniente che non il nervo periferico. L'esposizione che segue riassume osservazioni sulla LDH, e dati sull'equilibrio dinamico tra la forma piridossalica e quella piridosaminica dell'aspartato aminotransferasi. Il rapporto tra le due forme catalitiche di questo ultimo enzima si è rivelato, infatti, un indice metabolico anche più sensibile che non la composizione isoenzimatica della LDH, dell'equilibrio tra glicolisi e respirazione nel tessuto nervoso. Gli esperimenti di Bonavita *et al.* [6] e di Amore e Bonavita [7] sull'encefalo in corso di sviluppo ed in varie condizioni sperimentali e quelli di Bonavita *et al.* [8] sul nervo periferico degenerante sono dimostrativi in proposito.

MATERIALI E METODI.

Ratti adulti (età tra 120 e 150 giorni), di sesso maschile, del peso di 200–300 g, appartenenti al ceppo Sprague-Dawley, sono stati sottoposti ad un numero variabile di iniezioni intramuscolari di nitrofurantoina (sale sodico),

(*) Questa indagine è stata eseguita nella Clinica delle Malattie Nervose e Mentali dell'Università di Palermo (Direttore: prof. Agostino Rubino) ed è stata resa possibile da un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Roma).

(**) Nella seduta del 13 maggio 1970.

come soluzione al 12 % in H₂O bidistillata (pH finale 9,2), in dosi di 50 mg/Kg. Ciascuna dose è stata suddivisa in due aliquote al fine di iniettare piccoli volumi. L'intervallo tra le iniezioni delle singole dosi è stato di 8 ore.

Subito dopo l'uccisione degli animali, eseguita due ore dopo l'ultima iniezione tranne che nei casi in cui è diversamente indicato, l'encefalo ed in alcuni esperimenti, anche il rene è stato rapidamente prelevato e sottoposto ad analisi.

Le condizioni sperimentali dell'elettroforesi su gel di amido e della misurazione spettrofotometrica della LDH, della determinazione della concentrazione proteica degli estratti di organi, e della determinazione dell'aspartato aminotransferasi sono state quelle descritte in articoli precedenti [9, 6].

RISULTATI.

La fig. 1 presenta il *pattern* elettroforetico della LDH dell'encefalo di ratto normale e dell'encefalo di ratto dopo sette e dopo trenta iniezioni i.m. di nitrofurantoina.

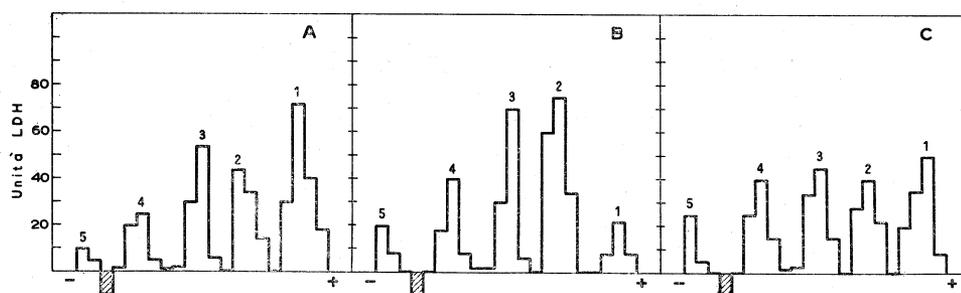


Fig. 1. - *Pattern* elettroforetico su gel di amido della LDH di encefalo di ratto adulto; A, controllo; B, dopo sette iniezioni intramuscolari di nitrofurantoina (50 mg/Kg); C, dopo trenta iniezioni di nitrofurantoina. Ciascun valore rappresenta la media di tre o più determinazioni. Per le condizioni sperimentali, si veda il testo.

I tre *patterns* rivelano la profonda modifica cui la LDH va incontro a seguito della somministrazione di nitrofurantoina. È interessante sottolineare, tuttavia, che il maggiore decremento dell'isoenzima 1 e la più cospicua variazione delle altre frazioni di LDH si verificano molto precocemente e che dopo la settima iniezione ha già inizio un parziale ritorno, verso le condizioni originarie, della distribuzione percentuale dell'attività LDH tra i vari isoenzimi.

Questo fatto, che appare con evidenza in fig. 1, risulta più chiaramente documentato in fig. 2, in cui le variazioni dell'attività percentuale di LDH₁, migrante velocemente verso l'anodo, sono presentate nella loro evoluzione temporale. La fig. 2 dimostra che, anche se le iniezioni di nitrofurantoina non vengono interrotte, l'attività percentuale di LDH₁ ed il *pattern* elettroforetico globale, pur tendendo inizialmente a ritornare verso i valori di base, non raggiungono tali valori ma si stabilizzano ad un livello inter-

medio. Al contrario, se la somministrazione di nitrofurantoina viene interrotta dopo la quinta iniezione, il ritorno della LDH alla norma è completo ed immediato (Tabella I).

TABELLA I.

Attività percentuale di LDH₁ di encefalo di ratto dopo somministrazione di nitrofurantoina ().*

Tempo (in ore dopo la 5 ^a iniezione)	Attività percentuale
2	12,0
24	26,0
48	30,5
72	36,5

(*). Per le condizioni sperimentali, si veda il testo. Ciascun valore rappresenta la media di tre o più determinazioni.

Il rene, che in questa indagine ha rappresentato un organo di riferimento, è andato incontro a variazioni similari, ma il *pattern* elettroforetico della LDH renale è ritornato completamente alla norma, anche proseguendo le iniezioni di nitrofurantoina oltre la quinta (fig. 3).

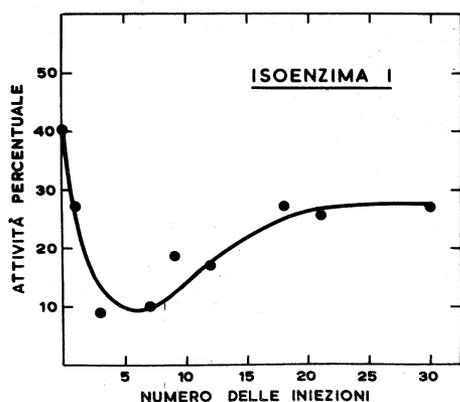


Fig. 2. - Variazioni percentuali dell'attività di LDH₁ dell'encefalo di ratto adulto in funzione del numero di iniezioni di nitrofurantoina. Per le condizioni sperimentali, si vedano il testo e la leggenda della fig. 1.

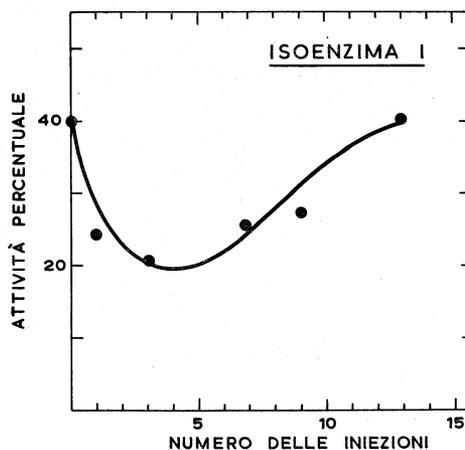


Fig. 3. - Variazioni percentuali dell'attività di LDH₁ del rene di ratto adulto in funzione del numero di iniezioni di nitrofurantoina. Per le condizioni sperimentali, si vedano il testo e la leggenda della fig. 1.

La fig. 4 dà un'immagine sintetica delle variazioni cui va incontro, dopo nitrofurantoina, il rapporto tra forma piridossalica e piridossaminica dell'aspartato aminotransferasi di encefalo. È interessante sottolineare che, mentre il

precoce incremento percentuale della forma piridossalica coincide con la rapida diminuzione iniziale di LDH₁, il decremento successivo non si sovrappone, nel tempo, alla variazione tardiva e parziale del *pattern* elettroforetico

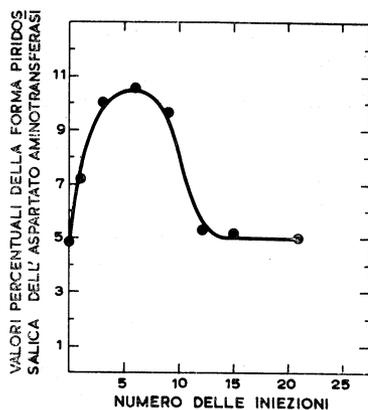


Fig. 4. - Variazioni del rapporto tra forma piridossalica e forma piridossaminica dell'aspartato aminotransferasi dell'encefalo di ratto in funzione del numero di iniezioni di nitrofurantoina. Per le condizioni sperimentali, si vedano il testo e la leggenda della fig. 1.

della LDH, ma è molto più veloce ed è completo. Non v'è, inoltre, una differenza significativa tra gli animali, cui la nitrofurantoina viene somministrata solo cinque volte, e gli animali in cui la somministrazione del composto continua fino alla trentesima iniezione.

DISCUSSIONE.

Il significato metabolico generale di variazioni nella composizione isoenzimatica della LDH è stato più volte discusso, anche con immediato riferimento a problemi neurochimici (si veda, ad esempio, [10]), dopo che Cahn *et al.* [11] hanno sostenuto, con sufficienti prove sperimentali, il rapporto tra composizione molecolare della LDH ed efficienza della glicolisi anaerobica in un tessuto.

Secondo Cahn *et al.* [11], l'incremento percentuale dell'isoenzima 5 e delle forme ibride correlate sta ad indicare uno *shift* dell'organizzazione metabolica del tessuto, in cui esso viene osservato, dalla respirazione alla glicolisi.

Poiché LDH₁ è fortemente inibita da eccesso di piruvato, mentre LDH₅ non lo è [12, 11, 13], si può supporre che ogni incremento di LDH₅ o delle forme ibride correlate si associ ad uno spostamento dell'encefalo verso quella organizzazione metabolica, che caratterizza tessuti, come il muscolo scheletrico, con elevata resistenza all'anossia, e non tessuti la cui efficienza funzionale è strettamente dipendente dall'apporto di ossigeno.

Il problema che è necessario porsi con riferimento all'encefalopatia metabolica da nitrofurantoina, e cui, peraltro, non è possibile dare risposta definitiva può essere formulato in questi termini: conseguono le variazioni osservate ad una compromissione selettiva o prevalente della sintesi delle

subunità H, costitutive della LDH₁, o sono riferibili esse ad un danno selettivo di gruppi cellulari in cui le subunità H prevalgono nettamente?

Un'analisi citopatologica solo iniziata potrà confermare o escludere la seconda ipotesi, che appare, in verità, la meno probabile se si tiene conto della pronta reversibilità dell'effetto osservato, dopo l'interruzione della somministrazione del farmaco.

A favore di una compromissione selettiva o prevalente della sintesi delle subunità H, v'è, invece, un'osservazione compiuta da Mac Calla [14], secondo cui i nitrofurani inibiscono la sintesi di DNA.

Se l'ipotesi di una inibizione selettiva o prevalente di subunità H è valida, i dati sperimentali descritti in questa Nota acquisiscono il merito di una dimostrazione duplice: 1) la sintesi di singoli isoenzimi della LDH encefalica è suscettibile di modifiche tramite fattori che inibiscono la sintesi di RNA messaggero; 2) il *turnover* degli isoenzimi è diverso in rapporto alla loro composizione subunitaria. Proprio quest'ultimo fatto, che ha avuto finora solo dimostrazione in modelli sperimentali più semplici (sistemi *in vitro*) [15, 16], rivela un potenziale meccanismo di regolazione metabolica ad opera di un composto come la nitrofurantoina, che pure può incidere profondamente sul livello energetico cellulare, in virtù della inibizione della sintesi di composti relativamente più semplici come l'acetilcoenzima A [17].

Un ultimo interessante problema, che i dati sperimentali sopra descritti pongono implicitamente, è il seguente: perché, dopo una più cospicua variazione iniziale, il *pattern* della LDH si stabilizza in una condizione intermedia tra quella dell'encefalo normale e quella che caratterizza l'encefalo di animali sottoposti ad un numero minore di iniezioni di nitrofurantoina?

La osservazione di questa bifasicità nell'effetto della nitrofurantoina aveva fatto supporre che, nel corso di somministrazioni ripetute di essa, si realizzasse un'inattivazione progressivamente maggiore del farmaco, cui conseguiva un decremento delle variazioni della LDH.

Questa ipotesi più semplice è stata, tuttavia, esclusa determinando la eventuale scomparsa di nitrofurantoina in presenza di estratti di fegato, ottenuti da animali sottoposti ad iniezioni i.m., in numero crescente, del composto stesso (Amore e Bonavita, osservazioni inedite).

BIBLIOGRAFIA.

- [1] C. T. UESU, « Ohio Med. J. », 58, 53 (1962).
- [2] C. J. RUBENSTEIN, « J. Am. Med. Ass. », 187, 647 (1964).
- [3] A. BEHAR, E. RACHMILEWITZ, R. RAHAMIMOFF e M. DENMAN, « Arch. Neurol. », 13, 160 (1965).
- [4] J. F. TOOLE, J. A. GERGEN, D. M. HAYES e J. A. FELTS, « Arch. Neurol. », 18, 680 (1968).
- [5] G. W. KLINGHARDT, « Acta Neuropathol. », 9, 18 (1967).
- [6] V. BONAVIDA, R. GUARNERI e V. SCARDI, « Life Sci. », 3, 889 (1964).
- [7] G. AMORE e V. BONAVIDA, « Life Sci. », 4, 2417 (1965).

- [8] V. BONAVITA, G. AMORE e M. SMORTO, «Acta Neurol.», 24, 125 (1968).
- [9] V. BONAVITA e R. GUARNERI, «J. Neurochem», 10, 743 (1963).
- [10] A. RUBINO e V. BONAVITA, *Atti del 15° Congresso Nazionale della Società Italiana di Neurologia*. Suppl. «Riv. Pat. Nerv. Ment.» (1965).
- [11] R. D. CAHN, N. O. KAPLAN, L. LEVINE e E. ZWILLING, «Science», 136, 962 (1962)
- [12] P. C. W. PLAGEMAN, K. F. GREGORY e F. WROBLEWSKI, «J. Biol. Chem.», 235, 2282 (1960 a).
- [13] C. L. MARKERT e H. URSPRUNG, «Develop. Biol.», 5, 363 (1962).
- [14] D. R. MAC CALLA, «Canad. J. Biochem.», 42, 1245 (1964)
- [15] D. DAWSON, T. GOODFRIEND e N. O. KAPLAN, «Science», 143, 929 (1962).
- [16] T. L. GOODFRIEND, D. M. SOKOL e N. O. KAPLAN, «J. Mol. Biol.», 15, 18 (1966).
- [17] M. F. PAUL, H. E. PAUL, F. KOPKO, M. J. BRYSON e C. HARRINGTON, «J. Biol. Chem.», 206, 491 (1954).