
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GUIDO PALLADINI, MASSIMO REITANO, GIORGIO
VENTURINI

**Riproduzione sperimentale delle modificazioni gliali
di Alzheimer, dello stato spongioso e della
rarefazione neuronale per alterazione del
metabolismo del rame nel ratto**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 54 (1973), n.3, p. 474-479.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_54_3_474_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. — *Riproduzione sperimentale delle modificazioni gliali di Alzheimer, dello stato spongioso e della rarefazione neuronale per alterazione del metabolismo del rame nel ratto.* Nota preliminare (*) di GUIDO PALLADINI, MASSIMO REITANO, GIORGIO VENTURINI (**), presentata (***) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The Authors treated parenterally albino rats with organic salt and sodium azide; the latter in order to prevent the copper chelation by seric ceruloplasmine and to maintain a high level of free hematic copper.

Within 30 days such a treatment to a status spongiosus of white matter, Alzheimer's II glia production, focus of fat granule cells and proliferation of capillaries.

As these lesions are peculiar to human Wilson disease the treatment in question may be considered as a valid experimental model.

The Authors discuss the meaning of these observations in copper neurobiology and in the pathogenesis of Wilson's disease.

Lo studio dell'azione del rame nel sistema nervoso presenta aspetti notevoli nel dominio della pura neurobiologia e della neuropatologia *sensu strictu*. È infatti noto come questo metallo, filogeneticamente il più antico trasportatore d'idrogeno nelle catene redox, entri anche nei Vertebrati superiori nella struttura di numerosi enzimi, quali le flavoproteine, numerose transeletttronasi aerobie ed anaerobie, talune aminoossidasi e la dopamin- β -idrossilasi (Howell e Davidson, 1958; Weinshilbom e Axelrod, 1971). Inoltre il rame, in concentrazioni non fisiologiche, è un potente inibitore di altri enzimi, in primo luogo dei sistemi —SH-attivi (lipoato, coenzima A. Walshe, 1961) e della ATPasi Na—K dipendente (Walshe, 1966).

Nell'organismo dei Mammiferi superiori, il metallo è veicolato nel plasma per la massima parte in forma « stabile », complessato ad una α_2 -globulina sintetizzata nel fegato, la « ceruloplasmina » (p.m. 151.000–160.000) (Owen e Hazelrig, 1968; Neifach *et al.*, 1969) ed in piccola parte (4 %) sotto forma diffusibile o « labile », legato ad una albumina. Nel sistema nervoso centrale il metallo è, per il 60 %, legato ad una altra proteina ancora, la « cerebrocupreina » di Porter e Folch (1957).

Dal punto di vista clinico, è nota una sindrome imperniata su rigidità, disturbi della parola e della scrittura, dell'intelligenza e della postura (« pose ginniche ») con crisi di anemia emolitica, tremore ed epatargie terminali gravi. Tale sindrome, originariamente descritta da Wilson (1912) è stata poi allargata comprendendovi la pseudosclerosi di Westphall e Strumpell ed altri quadri clinici (Fazio *et al.*, 1968).

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » e nella I Clinica di Malattie Nervose e Mentali dell'Università di Roma.

(**) Con la collaborazione di DANIELA TARQUINI e MARIA GRAZIA MELEGARI.

(***) Nella seduta del 10 marzo 1973.

L'anatomia patologica ha messo in evidenza in tali casi lesioni encefaliche, epatiche e renali. Mentre le lesioni epatiche si riportano ad un quadro di cirrosi multilobulare con infiltrazioni linfocitarie perivascolari, le lesioni encefaliche (prevalenti, anche se non esclusive, nel n. lenticolare) consistono in rarefazione neuronale, presenza di cellule gliali reattive (cellule di Alzheimer I e II) e elementi giganti di dubbia origine glio-istiocitaria (cellule di Opalsky) (Mussakowsky, 1965; 1971), in uno stato spongioso prevalentemente della sostanza bianca subcorticale ed in una proliferazione capillare (Peters, 1970; Greenfield, 1971). Il rame, cui viene riconosciuto un ruolo chiave nella patogenesi della malattia, si trova in effetti in eccesso nel s.n.c. (290% secondo Jakàb e Pànczél, 1952; 1490, 1336, 1502% secondo Porter e Folch, 1957) e sembra sia localizzato in prevalenza nel citoplasma neuronale (Cornelio *et al.*, 1970).

Tre sono le teorie patogenetiche avanzate per la m. di Wilson:

- la presenza di una abnorme proteina tissutale ipercuprofila;
- la carenza di ceruloplasmina epatica
- un deficit di ceruloplasmin-Cu-sintetasi.

In tutte queste teorie, in ultima analisi, sarebbe il rame libero a causare (Walshe, 1966) le lesioni caratteristiche.

Abbiamo ritenuto che il poter produrre una alterazione del metabolismo cuprico tale da mantenere per lungo tempo un elevato tasso di rame libero nell'organismo sarebbe stato un'utile via d'attacco per la risoluzione di alcuni problemi relativi e al significato fisiologico del rame nel sistema nervoso, tutt'ora poco noto, ed ai problemi relativi alla patogenesi della m. di Wilson, le cui numerose correlazioni umorali ed istologiche, rilevate in via clinica ed autoptica, non appaiono a tutt'oggi univoche. La semplice somministrazione di sali di rame, però, non riproduce alcun quadro comparabile alla m. di Wilson, sia perché avviene una iperproduzione di ceruloplasmina, sia per sequestrazione lisosomiale epatica del metallo (Cornelio *et al.*, 1970). Siamo pertanto ricorsi alla somministrazione contemporanea di sali organici di rame e di azide sodica, sostanza questa nota per la sua capacità di complessarsi *in vivo* e *in vitro* con la ceruloplasmina (Curzon e Cumings, 1966) impedendo il legame con il Cu esogeno in eccesso, che resta pertanto libero.

In questa sede riferiamo in via preliminare i dati ottenuti con tale metodica.

MATERIALE E METODI

La dose di azide sodica è stata determinata in via preliminare con il metodo dei probits (Cavalli-Sforza, 1961) come dose letale media 50% a 30 giorni di trattamento, ed è pari a mg 3.80 iniettati intraperitoneo ogni 3° giorno in ratti di 250 g. Il rame è stato somministrato alla massima dose tollerata come sale complesso di Werther (Giua, 1927) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, pari a mg 0.480 di Cu^{++} iniettato intraperitoneo ogni giorno in ratti di 250 g per 30 giorni.

Sono stati trattati 94 ratti di ceppo Wistar, maschi, di 250 g di peso iniziale, suddivisi in tre gruppi:

- I) sola azide, 3.80 mg sciolti in 3 ml di acqua distillata, intraperitoneo, ogni 3° giorno;
- II) solo rame, mg 0.480 di Cu^{++} come sale di Werther, in 1 ml di acqua distillata, intraperitoneo, ogni giorno;
- III) azide e rame, il secondo intramuscolo ogni giorno, la prima intraperitoneo ogni terzo giorno, entrambi alle dosi di c.s.;

Il periodo totale di trattamento è stato per tutti i tre gruppi di 30 giorni, allo scadere dei quali gli animali sopravvissuti sono stati sacrificati per anestesia eterea. All'autopsia, è stato prelevato un campione di sangue per via intracardiaca e il fegato, i reni e l'encefalo. Gli organi furono divisi in due metà longitudinali, l'una conservata a -80° per le determinazioni biochimiche e l'altra, fissata in formolo salato, è stata sezionata al congelatore e dopo inclusione in paraffina.

Il Cu ematico e tissutale è stato determinato con il metodo di Matsuba e Takahashi (1970) con lettura su spettrofotometro Beckmann D.B.G.

Sulle sezioni in paraffina sono state eseguite le colorazioni di v. Gieson, emallumeosina, Nissl e la reazione istochimica di Timm per il rame (Ganther e Jolles, 1970). L'identificazione topografica delle aree cerebrali del ratto è stata eseguita sui dati dell'atlante di Maitland-Innes e Zeman (1963). Tutti i prodotti chimici usati sono Merck, Analytical Grade.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

a) *Animali trattati con la sola azide sodica.* Gli animali mostrano marcata diminuzione della iniziativa motoria, arruffamento del pelo, alterazione del ritmo respiratorio. La mortalità è elevata nella I metà del trattamento, raggiungendo il 50 %.

Istologicamente, il *fegato* appare praticamente indenne, sia negli epatociti che nel disegno connettivale; parimenti indenne appare la morfologia *encefalica*. Il Cu plasmatico risulta aumentato in un solo caso (+ 600 %), in cui è aumentato anche il Cu encefalico (+ 250 %); altrimenti, tali parametri risultano invariati rispetto alla norma.

b) *Animali trattati con il solo sale di rame.* Non si è osservata modificazione veruna del comportamento e del peso. La mortalità è stata dello 0 %.

Istologicamente, il *fegato* in 2 casi su 7 ha mostrato piccole necrosi a focolaio del parenchima, con integrità del disegno connettivale. Focolai necrotici analoghi sono stati osservati in altri 2 animali nell'*encefalo*, che altrimenti non presenta alcuna alterazione di rilievo a carico neuronale o gliale. In un solo caso, in cui coesistevano numerosi focolai necrotici cerebrali, il Cu tissutale cerebrale è risultato elevato (+ 230 %), mentre il Cu plasmatico è aumentato in tutti i trattati, in media del 200 %.

c) *Animali trattati con l'azide ed il sale di rame.* Gli animali presentavano marcata diminuzione dell'iniziativa motoria, segni di paraparesi spastica, alterazioni del comportamento sociale (atteggiamenti di rabbia/aggressività immotivata). La mortalità è stata del 55 %.

Istologicamente, nell'*encefalo* si osservano alterazioni molto cospicue a carico della glia, con formazione di cellule reattive tipo Alzheimer II, iperplasia astrocitaria fino alla gemistocitosi, presenza di focolai di cellule granulose nel n. lenticolare e nel talamo (R 4 e R 9), spongiosi della sostanza bianca sottocorticale. Le cellule nervose presentano cromatolisi centrale, picnosi, degenerazione con quadri di neuronofagia. In un caso (R 4) si osserva anche intensa proliferazione capillare del n. lenticolare. Nella Tabella I sono precisate le lesioni neuronali e gliali, insieme con i livelli di rame tissutale e

plasmale, degli esemplari studiati. Le lesioni sono prevalenti nel n. lenticolare ma sono osservabili anche in vari nuclei grigi del tronco (n. III, n. vestibolare); non sono state osservate lesioni corticali. Il *fegato* presenta costantemente infiltrazione più o meno cospicua degli spazi del Kiernan e periportali, spesso necrosi a focolai (3 casi su 12) o necrosi cellulari sparse (4 casi su 12). In due casi si è osservato accentuazione del disegno connettivale con fini tralci intercellulari. Il metodo istochimico di Timm ha svelato fini granuli positivi nel citoplasma neuronale di 4 esemplari.

TABELLA I

	Lesioni neuron.	Rigonfiam. gliale	Cell. Alzh. II	Spongiosi	RAME		
					Encef.	Plasma	Timm.
R1	—	—	—	—	—	—	—
R2	+	o	o	+	+108%	0%	o
R3	+	+	±	+	+1000%	0%	...
R4	o	+	+	+	+83%	0%	+
R5	+	+	+	+	+43%	0%	+
R6	+	+	+	+	+117%	0%	+
R7	±	±	o	o	+31%
R8	±	+	+		+37%
R9	+	+	+	+	+8%
R10	o	o	o	+	0%
R11	±	±	o	+	+
R12	o	±	o	o	+62%

DISCUSSIONE

Il modello sperimentale da noi proposto, basato sugli stessi concetti di quello in precedenza tentato da Williams (1967) (mediante somministrazione orale continuata fino a 120 giorni di azide e rame acetato) fornisce dati morfologici che ricalcano strettamente quanto osservato nella patologia spontanea umana: status spongiosus della sostanza bianca sottocorticale e dei gangli della base, proliferazioni capillari, lesioni neuronali con neuronofagia, alterazioni gliali del tipo della glia epatica e di Alzheimer (Peters, 1970); in effetto, solo queste ultime alterazioni erano riprodotte dalla somministrazione orale, ma si tratta di alterazioni non specifiche, riprodotte anche da altri quadri tossici (biossido di manganese, Pentschew, 1970; ammonio,

Cavanagh e Ma Hta Kyu, 1971). È notevole l'osservazione, in due casi, di focolai di disintegrazione a cellule granulo-grassose, lesione osservata nella patologia spontanea umana (Ishino *et al.*, 1972). La stretta somiglianza morfologica tra il quadro spontaneo e quello sperimentale, tenendo altresì conto che quest'ultimo si sviluppa in un mese, mentre la m. di Wilson è eminentemente cronica, ci confortano nel ritenere confermata la teoria che riconduce la patogenesi della malattia, in ultima istanza, all'alto livello di rame libero tissutale; appare però evidente dai nostri dati che questa è una condizione non sufficiente, perché non vi è apparentemente alcuna correlazione tra il quantitativo di Cu determinato nel tessuto encefalico e gravità delle alterazioni, come del resto si è osservato anche nella patologia umana (Jakab e Pànczél, 1952; Porter e Folch, 1957). È verosimile, e gli studi sul nostro modello sono volti in questo senso, che il reale agente lesivo sia il rame legato agli enzimi e che quindi la proporzionalità debba ricercarsi fra lesioni ed attività enzimatiche; in questo senso parlano anche i dati di Porter e Folch (1957) che trovano il rame cerebrale nella m. di Wilson presente in una forma non dializzabile, non esistente negli encefali normali.

Mentre la sola azide non provoca danni di rilievo, il sale di rame si è mostrato capace di un danneggiamento epatico del tipo di necrosi a focolaio la cui patogenesi non è al momento chiarificabile; l'entità del danno essendo comunque modesta, sembra difficile poter attribuirgli molto valore nella genesi delle caratteristiche alterazioni gliali.

Dai dati in nostro possesso e che sono in approfondimento ultrastrutturale, appare che il rame viene a localizzarsi nel citoplasma neuronale, confermando così i dati di Uzman, 1956, e spiegando le lesioni neuronali osservate. Riteniamo interessante sottolineare la presenza dello status spongiosus, assai verosimilmente anche in questo caso come in altri, legato ad una inibizione dell'ATPasi di membrana (Venturini e Palladini, 1973).

Anche in questo caso, come già in passato (Bignami e Palladini, 1965) dobbiamo ripetere che se la malattia di Wilson è una malattia rara, di interesse pratico limitato, sono spesso appunto le malattie rare a permettere lo studio di fenomeni biologici fondamentali. Le ricerche enzimatiche, istochimiche, biochimiche ed EEGrafiche attualmente in corso sul nostro modello riteniamo possano quindi chiarire molti punti relativi alla discussa azione patologica e fisiologica del Cu nel sistema nervoso.

BIBLIOGRAFIA

- BIGNAMI A. e PALLADINI G., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 38, 253 (1965).
CAVALLI-SFORZA L., *Analisi statistica per medici e biologi*, Boringhieri, Torino (1961).
CAVANAGH J. B. e MA H. K., « J. Neurol. Sci. », 12, 63 (1971 a).
CAVANAGH J. B. e MA H. K., « J. Neurol. Sci. », 12, 241 (1971 b).
CORNELIÒ F., FRATTOLA L. e PELLEGRINI G., « Acta Neurol. », 5, 594 (1970).
CURZON G. e CUMINGS J. N., in « The Biochemistry of Copper » (Peisach J., Aisen P., Blumberg W. E. eds.), p. 545, Academic Press, New York (1966).
FAZIO C., AGNOLI A. e PERISSINOTTI G., « Minerva Medica », 59, 3359 (1968).

- GANTER P. e JOLLES G., *Histochimie normale et pathologique*, Gauthiers-Villars, Paris (1969).
- GIUA M., in «Nuova Enciclopedia di Chimica» (I. Guareschi, F. Garelli eds.), 13/3, 396 (1927).
- GREENFIELD J. D., *Neuropathology*, Arnold, London (1971).
- HOWELL J. e DAVIDSON A. N., «Neurology», 72, 365 (1958).
- ISHINO H., TAKASHI M., YASUAKI H., AKIRA S. e SABURO O., «Neurology», 22, 905 (1972).
- JAKAB I. e PÁNCZÉL M., «Acta Medica», 3, 341 (1952).
- MAITLAND-INNES J. R. e ZEMAN W., *Craigie's Neuroanatomy of the rat*, Academic Press, New York (1963).
- MATSUBA Y. e TAKAHASHI Y., «Analyt. Biochem.», 36, 182 (1970).
- MOSSAKOWSKY M. J., in «Proc. Vth Int. Congr. Neuropath.», p. 981, Exc. Medica, Amsterdam (1966).
- MOSSAKOWSKY, M. J., BOROWICZ J. W., KRASNICKA Z. e GAJKOWSKA J., «Acta Neuropath.», 19, 301 (1971).
- NEIFAKH S. A., MONAKOW N. K., SHAPOSHNIKOV A. M. e ZUBZHITSKI YU. N., «Experientia», 25, 337 (1969).
- OWEN C. H. e HAZELRIG J., «Am. J. Physiol.», 210, 1059 (1966).
- PENTSCHER A., in «Proc. VIth Int. Cong. Neuropath.», p. 7, Masson, Paris (1970).
- PETERS G. in «Trattato di Anatomia patologica speciale» (E. Kaufmann), 8/1, 859, Vallardi, Milano (1970).
- PORTER H. e FOLCH J., «A.M.A. Arch. Neurol. Psych.», 77, 8 (1957).
- UZMAN L. L., «Am. J. Med. Sci.», 231, 511 (1956).
- VENTURINI G. e PALLADINI G., «J. Neurochem.», 20, 237 (1973).
- WALSHE J. M., «Clin. Sci.», 20, 197 (1961).
- WALSHE J. M., in «The Biochemistry of copper» (J. Peisach, P. Aisen, W. E. Blumberg Eds), p. 475, Academic Press, New York (1966).
- WEINSHILBOUM R. e AXELROD J., «J. Circ. Res.», 28, 307 (1971).
- WILLIAMS O. A., «Brith. J. Exp. Path.», 48, 180 (1967).
- WILSON S.A.K., «Brain», 34, 295 (1912).

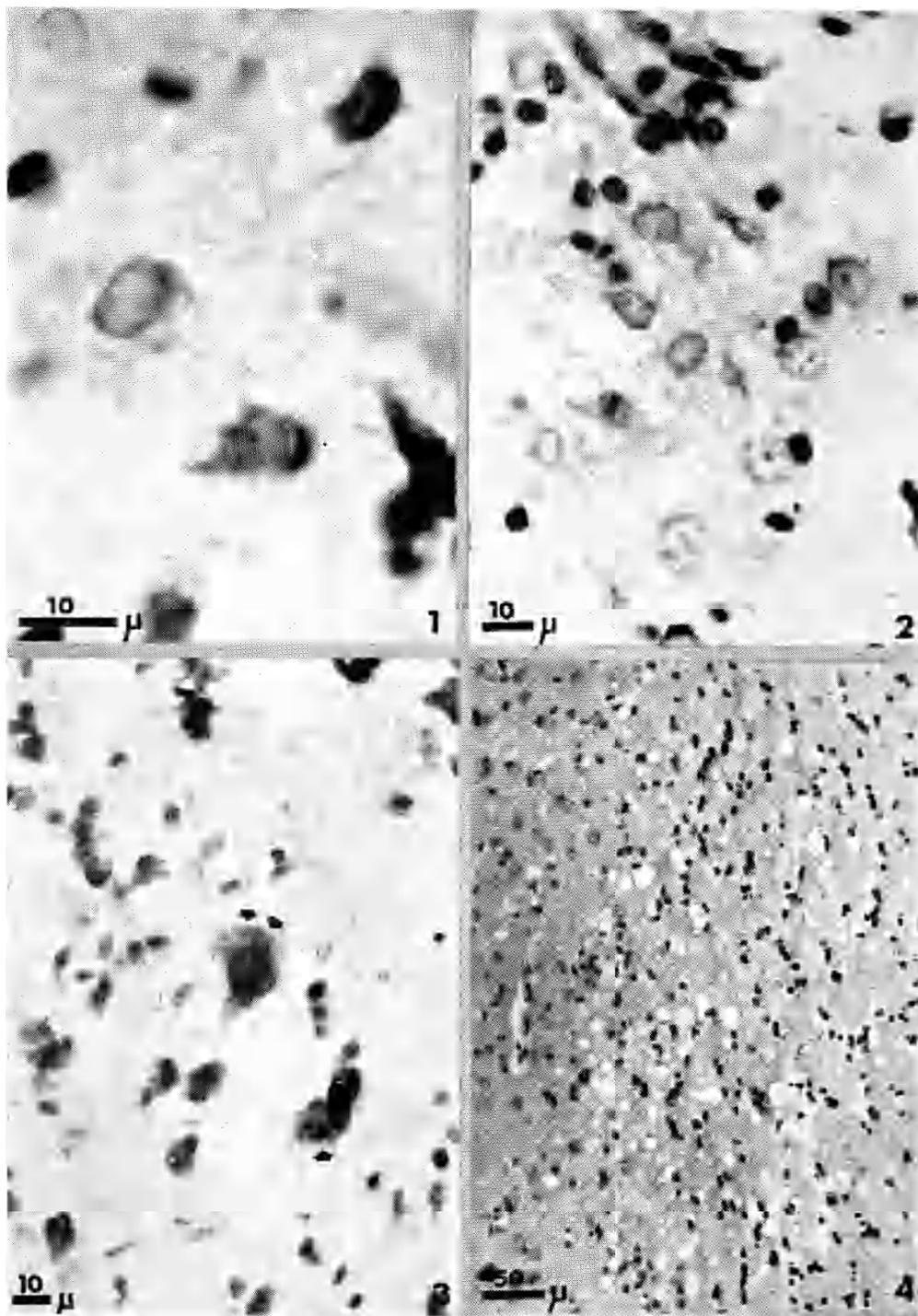


Fig. 1 e 2 - Nissl. N. lenticolare. Glia di Alzheimer II.

Fig. 3. - Timm. Granuli positivi (freccie) nel citoplasma di neuroni del globus pallidus.

Fig. 4. - Emat.-eosina. Stato spongioso della sostanza bianca subcorticale (la corteccia si trova a sinistra).