

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

ROBERTO COLOMBO, ERMINIO GIAVINI

## **Effetti biochimici del trattamento con ossamato di K su feti di ratto albino: Variazioni del livello di piruvato**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.6, p. 747-754.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1973\\_8\\_55\\_6\\_747\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_6_747_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/>



### SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

**Zoologia.** — *Effetti biochimici del trattamento con ossamato di K su feti di ratto albino: Variazioni del livello di piruvato*<sup>(\*)</sup>. Nota di ROBERTO COLOMBO e ERMINIO GIAVINI, presentata<sup>(\*\*)</sup> dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — Ten pregnant females of albino rats were treated with intrauterine injection of a 0,2M solution of K oxamate (0,25 ml/foetus) at 14<sup>th</sup> day of gestation.

The pyruvate rate was determined in foetuses omogenate.

A significant increase of pyruvate rate was observed in foetuses of ovarian district (Table I, fig. 2).

A interpretation of this process is suggested.

Il presente lavoro si inquadra nell'ambito di ricerche atte ad evidenziare l'importanza della glicolisi per il normale svolgimento dei processi morfogenetici nell'embrione di ratto albino (Colombo e Giavini, 1972).

L'ossamato di K era già stato usato con profitto da Boulekbache e Devil-  
lers (1969 e 1971) su uova di trota fecondate e da Papaconstantinou (1961) su cellule di tumori asciti. I succitati lavori misero in luce le potenti doti inibitrici e l'alto grado di specificità dell'ossamato stesso.

I dati ottenuti nel nostro precedente lavoro furono:

- 1) Esistenza di un valore soglia nell'azione dell'ossamato.
- 2) I feti dei diversi distretti uterini rispondono in maniera diversa all'azione dell'inibitore; più precisamente i feti del distretto uterino paraovarico (da molti Autori considerato il più ischemico) sono meno sensibili all'azione dell'ossamato.

Giunti a questo punto ritenemmo necessario determinare quantitativamente il livello di un metabolita importante per la comprensione, almeno parziale, del problema.

Scegliemmo all'uopo il piruvato ed allestimo così il primo esperimento.

Femmine gravide di ratto albino furono operate e trattate (in un solo dei due corni uterini, l'altro fu tenuto per controllo) con un'iniezione, nel lume uterino, di una soluzione di ossamato di K, 0,2M nella dose di 0,25 ml per feto, al 14° giorno di gestazione.

Le femmine furono sacrificate 18 ore circa dopo il trattamento ed i feti, tolti dal sacco amniotico, vennero immediatamente congelati in una miscela ghiaccio secco-acetone.

In seguito, per ogni femmina, si omogenavano separatamente i feti del corno trattato e quelli del corno uterino di controllo direttamente in HClO<sub>4</sub> (8,6 ml di HClO<sub>4</sub> al 70% diluiti a 100 ml).

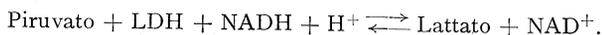
(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano.

(\*\*) Nella seduta del 15 dicembre 1973.

L'omogenato ottenuto veniva centrifugato a 3000 giri per 10 minuti circa.

Il supernatante veniva neutralizzato con una soluzione di  $K_3PO_4$  e quindi filtrato. Sul filtrato, addizionato di nicotinamide-adenin-dinucleotide ridotto (NADH) e lattico deidrogenasi (LDH), si effettuavano le prove fotometriche (lettura a 366 nm) per la determinazione del piruvato.

La reazione su cui si basa il metodo è la seguente:



La lettura fotometrica rileva la caduta di assorbimento della miscela in esame, a 366 nm, dovuta alla conversione del NADH in  $\text{NAD}^+$ .

I risultati ottenuti sono riassunti nella fig. 1.

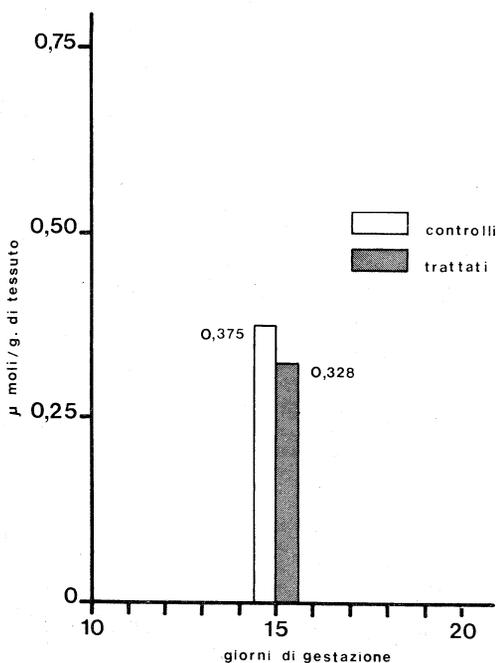


Fig. 1. - Tasso medio di piruvato rinvenuto, a 18 ore dal trattamento, in feti di ratto trattati con una soluzione di ossamato di K 0,2 M nella dose di 0,25 ml./feto (dosaggio eseguito senza prendere in considerazione i tre diversi distretti uterini).

Come facilmente rilevabile abbiamo evidenziato un tasso di piruvato dello stesso ordine di valori sia nei feti trattati che in quelli di controllo (il lieve decremento, 13 % circa, riscontrato nei feti trattati, non è risultato significativo). Ci si sarebbe aspettato il contrario, in quanto l'inibizione dell'ossamato si esplica a livello della LDH con impedimento al passaggio del piruvato a lattato.

I risultati ottenuti in questa prima serie di esperimenti non ci soddisfacevano sotto molti punti di vista e, in particolar modo, con il mancato ritrovamento di un accumulo di piruvato nei feti trattati è venuta a mancare la prova incontestabile dell'azione dell'inibitore.

Per questa ragione si è allestita una seconda serie di esperimenti nella quale sono stati nuovamente eseguiti i dosaggi del piruvato, avendo cura però di accorciare l'intervallo di tempo tra trattamento e sacrificio dell'animale (6 ore e non più 18) onde poter rilevare un eventuale accumulo precoce del

metabolita in esame e, inoltre, avendo cura di ripetere i dosaggi del piruvato nei tre distretti dell'utero (paraovarico, intermedio e paravaginale) i quali, secondo diversi Autori, posseggono differenti modalità di irradiazione e, quindi, un diverso ambiente periembrionale.

I risultati della seconda serie di esperimenti sono stati sintetizzati nella Tabella I e nella fig. 2.

TABELLA I

N. FEMMINE	Distr. Uterino	$\mu$ moli di piruvato/gr. di tess.	Diff. %
10	p. ovarico T.	$0,257 \pm 0,09$	81 %
	p. ovarico C.	$0,142 \pm 0,07$	
	Interm. T.	$0,169 \pm 0,07$	35 %
	Interm. C.	$0,125 \pm 0,04$	
	Paravag. T.	$0,216 \pm 0,08$	22,7 %
	Paravag. C.	$0,176 \pm 0,05$	

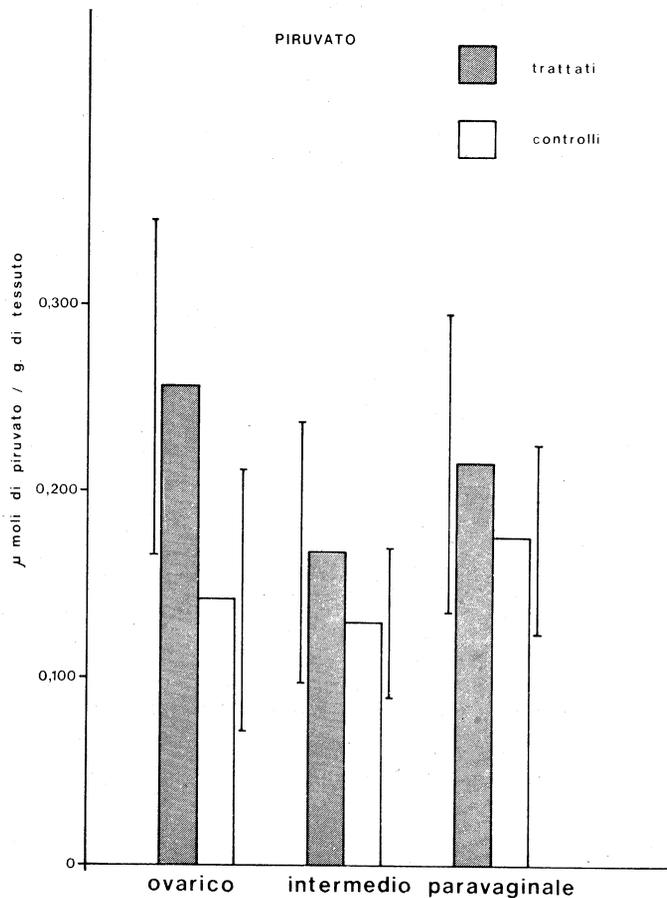


Fig. 2. - Tasso medio di piruvato, a 6 ore dal trattamento, rinvenuto in feti di ratto trattati con una soluzione di ossamato di K 0,2M nella dose di 0,25 ml./feto (dosaggio eseguito prendendo in considerazione i tre diversi distretti uterini).

Come si può chiaramente notare, a 6 ore dal trattamento, è stato notato un accumulo di piruvato in tutti e tre i distretti uterini in esame.

Il più ingente accumulo ed anche il solo statisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) è stato osservato nel distretto paraovarico; distretto che, come già accennato, è considerato il meno irrorato.

Nella fig. 3 i dati ottenuti sono stati integrati con i dati del precedente lavoro (Colombo e Giavini, 1972) onde evidenziare la relazione esistente tra mortalità fetale e tasso di piruvato; appare evidente la stretta relazione esistente fra tasso di piruvato e riassorbimenti fetali, più precisamente calando l'intensità di accumulo del metabolita, sotto inibizione da ossamato, aumenta il numero di riassorbimenti fetali.

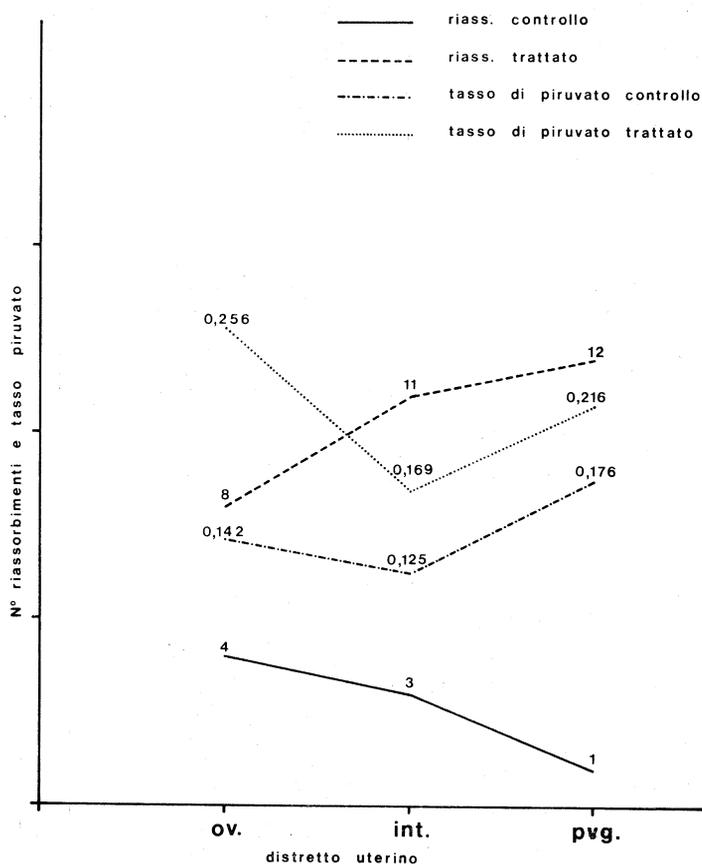


Fig. 3. - Andamento della mortalità fetale intrauterina, dovuta alla somministrazione di una soluzione di ossamato di K 0,2 M nella dose di 0,25 ml./feto in rapporto all'intensità di accumulo di piruvato, nei tre diversi distretti uterini.

I dati sul tasso di piruvato esposti nella Tabella II sono stati elaborati nelle Tabelle II, III e IV, non prendendo più in considerazione le differenze tra il tasso di piruvato nei distretti trattati ed i corrispondenti distretti di controllo, bensì comparando le differenze di livello di piruvato esistenti tra i diversi distretti uterini di controllo, con le differenze instauratesi nei detti distretti dopo il trattamento con ossamato.

Come facilmente si può osservare nelle Tabelle II e III il distretto paraovarico mostra, sotto l'inibizione da ossamato, un accumulo di piruvato (che abbiamo indicato, forse impropriamente, in Tabella come « differenza di attività glicolitica ») rispetto ai distretti sottostanti dello stesso ordine di valori.

TABELLA II

Distretto	Non trattati	Diff. %	Trattati	Diff. %	Diff. di att. glic.
p. ovarico . . . . .	0,142±0,07	13,6%	0,257±0,09	52%	+38,4%
intermedio . . . . .	0,125±0,04		0,169±0,07		

Questo, a nostro avviso, dovrebbe stare a significare che gli embrioni del distretto paraovarico possiedono meccanismi di accumulo del metabolita in questione (maggior produzione e/o minor drenaggio della sostanza) di un 40% circa superiori a quelli esistenti nei due distretti più bassi dell'utero (distretto intermedio e paravaginale).

TABELLA III

Distretto	Non trattati	Diff. %	Trattati	Diff. %	Diff. di Att. glic.
p. ovarico . . . . .	0,142±0,07	-19,4%	0,257±0,09	+18,9%	+38,3%
p. vaginale . . . . .	0,176±0,05		0,216±0,08		

La Tabella IV mostra invece che la differenza tra i livelli del piruvato normalmente esistente fra i feti del distretto intermedio e quelli del distretto paravaginale rimane praticamente inalterata anche sotto inibizione.

TABELLA IV

Distretto	Non trattati	Diff. %	Trattati	Diff. %	Diff. di att. glic.
intermedio . . . . .	0,125±0,04	40%	0,169±0,07	27%	-13%
p. vaginale . . . . .	0,176±0,05		0,216±0,08		

I valori riportati nelle Tabelle II, III e IV rappresentano sempre le  $\mu$ mol di piruvato/gr. di tessuto ritrovate nei feti dei diversi distretti uterini come dalla Tabella I.

## DISCUSSIONE

Prima di addentrarci nella vera e propria discussione dei dati ottenuti, è necessario accennare ad alcuni riferimenti bibliografici i quali ci saranno utili per l'inquadramento del problema.

Barr e Brent (1970) trovarono dati interessanti circa l'irrorazione dell'utero di ratto; i suddetti Autori scoprirono che, dei due grossi vasi che intervengono nell'irrorazione di detto organo (arteria ovarica e arteria uterina), l'arteria uterina è quella con la maggiore portata ematica.

Infatti, occludendo sperimentalmente il suddetto vaso, si provoca un drastico innalzamento della mortalità fetale (sia praticando l'occlusione a stadi precoci di gestazione, sia intervenendo a stadi più tardivi della gestazione stessa) che si manifestava in maniera particolarmente evidente in posizione paravaginale.

Con l'occlusione dell'arteria ovarica a stadi precoci non si notava, invece, alcun innalzamento della mortalità fetale intrauterina, mentre se l'operazione veniva effettuata a stadi più avanzati di gestazione si notava, e questo è molto interessante, un incremento di riassorbimenti (dallo 0,7% al 6,9%) non nella zona circostante la legatura vasale, ma sempre nella metà inferiore del corno uterino (paravaginale),

Questi dati suggeriscono che i feti impiantati nella regione alta del corno uterino sono i meno sensibili ad un'ischemia cronica sperimentale.

Inoltre Woollam e Millen (1962) notarono che, anche nel topo, i feti impiantati in posizione paraovarica risentono meno di quelli dei distretti uterini più bassi di una condizione di grave anossia materna.

McLaren e Michie (1960) trovarono che, sempre nel topo, il peso dei feti delle zone più alte dell'utero è nettamente inferiore a quello dei feti impiantati in posizione paravaginale. Supposero quindi che il maggiore fattore limitante della crescita fetale fosse l'entità dell'apporto ematico utero-placentare.

Anche da questi fatti risulterebbe quindi evidente la condizione di ischemia del distretto uterino paraovarico.

I dati ottenuti da Barr e Brent sul ratto e da Woollman e Millen, e da McLaren e Michie sul topo sembrano essere suffragati anche dai dati morfologici e biochimici da noi ottenuti.

Nei feti del distretto paraovarico, infatti, si è trovato un ingente accumulo di piruvato (81% circa) nei trattati rispetto ai controlli.

Questo accumulo sta ad indicare chiaramente l'avvenuta azione dell'inibitore sulla via glicolitica di Embden-Meyerhof-Parnas (E.M.P.).

Il fatto che l'accumulo sia stato evidenziato nel distretto paraovarico è, secondo noi, spiegabile essenzialmente attraverso un meccanismo del tipo di quello esposto di seguito che, peraltro, concorderebbe con tutti i dati sin qui ottenuti dagli altri Autori citati.

Nella parte alta dell'utero in cronica deficienza di O<sub>2</sub> a causa di una cattiva irrorazione ematica, i feti presenterebbero un maggior sfruttamento del glu-

cosio attraverso la via di E.M.P. (alta produzione di piruvato sotto inibizione da ossamato).

Nella parte bassa dell'utero, invece, dove i valori dell'irrorazione si aggirerebbero intorno alla normalità, i feti unirebbero un buon metabolismo ossidativo ad una discreta glicolisi anaerobia (la glicolisi anaerobia è sempre presente, nell'embrione di ratto: Van Rossum 1963).

Lo scarso apporto ematico utero-placentare presente nelle zone alte dell'utero provocherebbe anche una scarsa asportazione di cataboliti.

Da tutto questo risulterebbe che l'accumulo di piruvato riscontrato nei feti della zona paraovarica è dovuto sia ad una glicolisi anaerobia più elevata, sia ad una minor asportazione del metabolita in questione da parte del circolo sanguigno.

Ricordando le doti di inibitore competitivo dell'ossamato di K è facile comprendere come, a parità di concentrazione di ossamato, i feti della parte alta dell'utero riescano, in minor tempo di quelli impiantati nella parte bassa dello stesso, ad accumulare una quantità di piruvato tale da poter annullare agevolmente l'effetto inibitorio.

Un quadro metabolico siffatto potrebbe avvalorare i dati ottenuti da Barr e Brent, da Woollam e Millen e da McLaren e Michie in quanto, in questa situazione, i feti più sensibili ad una carenza di  $O_2$  sarebbero proprio quelli delle zone basse dell'utero che, a causa della legatura vasale, debbono sacrificare il loro metabolismo ossidativo; inoltre il diverso tipo di metabolismo tra i vari distretti uterini potrebbe anche spiegare il costante ritardo di crescita mostrato, in condizioni normali, dai feti impiantati nelle zone alte dell'utero rispetto a quelli impiantati in zone paravaginali.

A favore di questa ipotesi è bene ricordare che l'azione teratogena di molte sostanze, come ad esempio la vitamina A, è particolarmente evidente nella zona paravaginale dell'utero in quanto, presumibilmente, il maggior apporto ematico in questa zona sarebbe la causa di un maggior apporto di sostanza.

Ora, invertendo il ragionamento, il maggior apporto ematico utero-placentare della zona paravaginale può essere, verosimilmente, la causa della maggior asportazione del piruvato e quindi una delle cause del mancato accumulo del metabolita nei feti delle parti basse del corno uterino.

È da notare che le differenze di comportamento, rilevate nei feti dei diversi distretti uterini, nei confronti dell'inibizione da ossamato, sarebbe sempre spiegabile per mezzo del « modello » sopracitato anche se l'eterogeneità del comportamento fetale non fosse dovuta a differenze quantitative dell'apporto ematico utero-placentare ma a differenze qualitative nella placentazione.

Ci sembra quindi di poter concludere affermando che, entrando in possesso di dati circa l'intensità del metabolismo ossidativo nei diversi distretti uterini e circa le modalità di sfruttamento del piruvato prodotto e accumulato sotto inibizione (magari mediante l'uso di glucosio marcato), si potrà fare un grosso passo avanti verso la comprensione totale del fenomeno.

## BIBLIOGRAFIA

- BARR M. e BRENT R. L. (1970) - *The relation of uterine vasculature to fetal growth and the intrauterine position. Effect in rats*, «Teratology», 3, 251-260.
- BOULEKBACHE H., DEVILLERS C., ROSEMBERG A. K. e JOLY C. (1969) - *Correlation entre la consommation d'oxygene et l'activité de la LDH et de la glucose-6-deshydrogenase au cours des premiers stades du developpement de l'oeuf de truite (Salmo irideus)*, «C. R. Acad. Paris», 268.
- BOULEKBACHE H., DEVILLERS C., ROSEMBERG A. J. e JOLY C. (1971) - *Action de l'acide oxamique, inhibiteur spécifique de la LDH, sur les premiers stades de developpement de l'oeuf de la truite (Salmo irideus)*, «C. R. Acad. Paris», 272.
- COLOMBO R. e GIAVINI E. (1972) - *L'azione dell'ossamato di K sullo sviluppo e sull'accrescimento intrauterino degli embrioni di ratto albino*, «Rend. Ist. Lombardo», 106, 221.
- MCLAREN e MICHE D. (1960) - *Control of prenatal growth in mammals*, «Nature», 4735, 363.
- PAPACONSTANTINO J. e COLOWICK S. P. (1961) - *The role of glycolysis in the growth of tumor cells. I*, «J. of Biol. Chem.», 236.
- PAPACONSTANTINO J. e COLOWICK S. P. (1961) - *The role of glycolysis in growth of tumor cells. II*, «J. of Biol. Chem.», 236, n. 2.
- VAN ROSSUM G. D. V. (1963) - *Respiration and glycolysis in liver slices prepared from rats of different foetal and post-natal ages*, «Biochimica et Biophysica Acta», 74, 15-23.
- WOOLLAM D. H. M. e MILLEN J. W. - *Influence of uterine position on the response of the mouse embryo to anoxia*, «Nature», 194, 990-991.