

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

AMICO BIGNAMI, GUIDO PALLADINI

**Ricerche sull'inibizione in vivo dell'ATPasi di  
membrana nel ratto. Riproduzione sperimentale  
dello stato spongioso cerebrale e di scariche  
elettro-encefalografiche pseudoritmiche continue**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.2, p. 253–258.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_38\\_2\\_253\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_2_253_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.** — *Ricerche sull'inibizione in vivo dell'ATPasi di membrana nel ratto. Riproduzione sperimentale dello stato spongioso cerebrale e di scariche elettro-encefalografiche pseudoritmiche continue*<sup>(\*)</sup>. Nota di AMICO BIGNAMI e GUIDO PALLADINI, presentata<sup>(\*\*)</sup> dal Corrisp. A. STEFANELLI.

In questi ultimi anni il trasporto attivo di membrana delle cellule è stato oggetto di particolari studi ed è stato identificato un complesso enzimatico, l'ATPasi di membrana, alla cui attività è deputata la permeabilità della membrana cellulare all'acqua ed agli elettroliti. Mentre sono ben noti gli effetti biochimici prodotti dal blocco di questa funzione enzimatica (Naidoo e Pratt 1953 [1]; Becker e coll. 1960 [2]; Torack e Barnett 1963-64 [3, 4]; Gàrdos 1964 [5]) *in vitro*, nessun dato è offerto dalla letteratura sugli effetti a livello organismico e morfocitologico quando il bloccaggio enzimatico sia effettuato *in vivo*. Una ricerca *in vivo* degli effetti del blocco di questo enzima presenta un particolare valore specialmente a livello del s.n.c. ove i rapporti fra i liquidi nutritivi ed i neuroni sono complicati dalla presenza della glia, ritenuta oggi come indispensabile tramite tra i capillari e le cellule nervose (Meyer 1963 [6]; Torack e Barnett 1963-64 [3,4]). È nota alla patologia spontanea umana una rara condizione morbosa presenile, l'encefalopatia spongiforme subacuta, considerata da taluni Autori come una varietà della malattia di Jakob-Creutzfeld (per una rassegna sull'argomento cfr. Alemà e Bignami 1959 [7]; Nevin e coll. 1960 [8]; Siedler e Malamud 1963 [9]), a patogenesi ed etiologia ignote, in cui si osservano fenomeni a carico del sistema nervoso (*stato spongioso*) variamente interpretati dagli Autori (vedi oltre), che abbiamo pensato potessero essere in relazione con un edema cellulare per un disturbo del trasporto di acqua e ioni.

Il quadro clinico di questa malattia è caratterizzato da demenza organica, mioclonie, rigidità, disturbi della coscienza fino al coma e reperto elettroencefalografico (EEG) di tipo particolare; anatomopatologicamente il reperto più caratteristico consiste in uno *stato spongioso* (formazione di piccole cavità rotondeggianti otticamente vuote nella cosiddetta « sostanza fondamentale ») della corteccia cerebrale e dei gangli della base, con perdita di cellule nervose e gliosi astrocitaria di entità variabile da caso a caso. Lo stato spongioso della corteccia è stato interpretato in modo vario: Bielschowsky 1910 [10] riteneva che tale lesione fosse indotta da imbibizione sierosa del tessuto cerebrale, nel corso di malattie infiammatorie o degenerative; Spielmeyer 1922 [11] indicava con questo termine il formarsi di cavità per distruzione di tessuto nervoso indotta da processi degenerativi; più recentemente ancora (1954), Jones e Nevin [12] ritengono che esso sia legato ad una « insufficienza vascolare funzionale ».

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Patologica diretto dal prof. L. Ajello e nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » diretto dal prof. A. Stefanelli.

(\*\*) Nella seduta del 13 febbraio 1965.

Nel discutere i mezzi per una ricerca sperimentale atta a delucidare la patogenesi di quest'alterazione tissutale ed a permetterne una disamina morfologica anche ultrastrutturistica, come utile via d'attacco per portare nuovi dati al problema del trasporto attivo cellulare, è sorta l'idea di produrre questo disturbo metabolico inibendo l'ATPasi di membrana mediante un glucoside cardioattivo, la *uabaina*, la cui potente azione in tal senso era già stata dimostrata *in vitro* da molti Autori (Schatzmann 1953 [13]; Judah e coll. 1962 [14]; Gàrdos 1964 [5]); a questi lavori siamo stati indirizzati da un suggerimento del dott. Bruno Bertolini, dell'Istituto di Anatomia Comparata, che ringraziamo vivamente.

#### MATERIALE E METODI.

Dopo anestesia eterea la uabaina era introdotta direttamente nel cranio del ratto con un ago molto corto, in modo da forare osso e dura madre senza penetrare nella sostanza cerebrale. Sono state impiegate dosi varianti da 0,3 a 0,6 mg in 0,25 ml di soluzione fisiologica (pH della soluzione del glucoside = 6,8). L'iniezione era fatta attraverso la squama dell'osso frontale di destra, in prossimità della linea mediana. Nei controlli abbiamo iniettato 0,25 ml di soluzione fisiologica (pH 6,7). Per la registrazione EEG sono stati fissati due elettrodi sulle ossa parietali prima di praticare l'iniezione. Un terzo elettrodo veniva fissato al naso al momento della registrazione. Per lo studio istologico, i cervelli sono stati fissati in formalina salata ed inclusi in paraffina; le sezioni seriate sono state colorate con le comuni tecniche. La uabaina è stata anche iniettata nel sacco durale della cauda equina (1-3 mg in 0,5 ml di soluzione fisiologica) e nel cavo peritoneale (2-7 mg).

Sono state eseguite riprese cinematografiche del comportamento dell'animale dopo il trattamento.

#### DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Non abbiamo notato nulla di rilevante nei controlli: il ratto appariva normale poco dopo l'iniezione intracranica di soluzione fisiologica. L'esame dello encefalo dimostrava in genere un minuto punticino emorragico sulla convessità dell'emisfero cerebrale in sede di iniezione. Quando la uabaina era iniettata nel peritoneo il ratto diveniva notevolmente tachicardico ed apparentemente affannato, ma in seguito l'animale riprendeva il suo stato normale, anche quando erano state impiegate dosi massive. Se per un errore di tecnica la sostanza veniva iniettata nella corrente sanguigna, si aveva la morte immediata.

Nessun risultato degno di nota veniva prodotto dall'iniezione lombare, se si eccettua in alcuni casi e con dosi elevate, qualche mioclonia facciale assai dubbia.

Quando al contrario la uabaina era iniettata nel cranio, si aveva un risposta drammatica, sempre eguale nei singoli casi e nei vari lotti di ratti impiegati: passato l'effetto dell'anestesia, l'animale presentava una vivacissima attività motoria; correva rapidamente senza curarsi degli ostacoli, girava in tondo, spiccava altissimi salti. Questi periodi di iperattività motoria si alternavano con altri in cui l'animale stava perfettamente immobile, per poi riprendere a correre ed a saltare, come un giocattolo a molla. Queste manifestazioni duravano una mezza ora circa e poi cominciavano convulsioni tonico-cloniche generalizzate in genere con prevalente fase tonica. Le convulsioni divenivano sempre più frequenti, sino a che una convulsione seguiva l'altra con breve intervallo di tempo, verificandosi uno *status* epilettico. Dopo 2-3 ore le convulsioni divenivano più rare fino a scomparire del tutto. In questo stadio il ratto giace in coma, con scosse pressoché continue degli arti. La sopravvivenza in queste condizioni era molto variabile; alcuni ratti morivano 3-4 ore dopo l'iniezione, altri erano ancora vivi dopo 2-3 giorni e sono stati sacrificati con l'etere. Abbiamo avuto l'impressione

che la durata della sopravvivenza non fosse tanto in rapporto con la dose iniettata, quanto con le cure a cui l'animale veniva sottoposto (sommministrazione di ossigeno, soluzione fisiologica intraperitoneale).

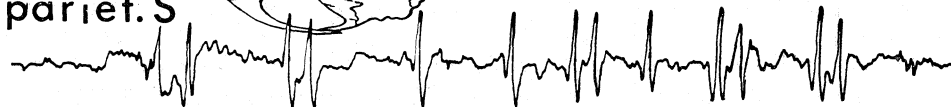
Dal punto di vista EEG si avevano i seguenti reperti nelle diverse fasi dell'esperimento:  
tracciato di riposo, senza particolari caratteri, con non ben distinguibile attività di 16-18 c/s di scarsissima ampiezza;

fenomeni convulsivi recidivanti (successivi in tempi diversi) con i comuni caratteri di tali anomalie nella fase parossistica conclamata, alternata ad attività a 3-5 c/s di note-

**pariet. D**



**pariet. S**



**el. nasale**



**Due ore dopo l'iniezione**

**respiro**

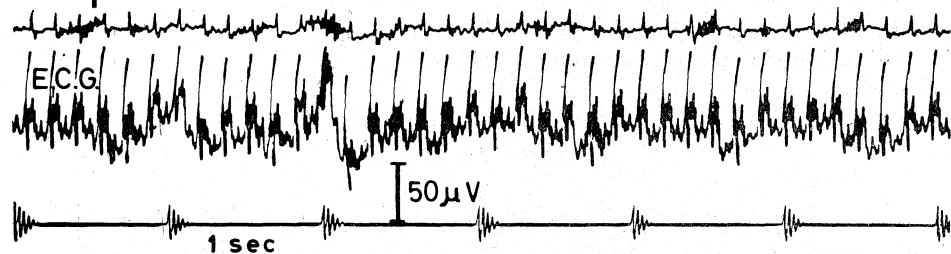


Fig. 1. - Elettroencefalogramma due ore dopo l'iniezione intracranica di uabaina.

(Per l'interpretazione vedi il testo).

I tondini neri corrispondono alla posizione degli elettrodi.

vole voltaggio e, raramente, a punta/onda. In questa fase si osservava per la prima volta la comparsa dell'attività caratteristica (vedi la 4<sup>a</sup> fase) ma senza una vera e propria continuità;

attività lenta intervallare, di vario tipo e grado, in genere costituita da onde lente a 2-3 o 3-4 c/s di mediocre ampiezza, sovrapposte talora a qualche artefatto osservabile per lunghi periodi di tempo ed in genere intramezzati alle manifestazioni convulsive;

attività pseudoritmica caratterizzata da grandi punte e complessi di- e trifasici di grande voltaggio, predominanti nella fase negativa (sui 100-200 microvolt) di frequenza irregolare, ma corrispondente in genere a 50-70 al minuto. Tale attività appariva talora sovrapposta ad onde lente di 3-4 c/s, notevolmente ampie, talora si confondeva quasi con il trac-

ciato, ma in genere era sempre evidente e caratterizzata da una continuità sorprendente. Essa si manifestava anche quando l'animale appariva perfettamente immobile ed in coma e perdurava, solo riducendosi di ampiezza e frequenza, fino alla fase immediatamente precedente la morte.

Nei ratti dove era stato iniettato il glucoside l'encefalo appariva notevolmente pallido; era in genere visibile un punticino emorragico sulla convessità dello emisfero corrispondente alla sede dell'intervento.

In due ratti è stato condotto l'esame istologico dell'encefalo mediante sezioni seriate; il primo (U7) era stato sacrificato con etere 55 ore dopo l'iniezione endocranica di uabaina, il secondo (U8) era morto spontaneamente 65 ore dopo la somministrazione. Nei due casi si è osservata una grave perdita di neuroni nella corteccia cerebrale, con spopolamento pressoché completo in alcuni tratti. In un caso (U8) dove è stato eseguito l'esame istologico dei due emisferi, le alterazioni prevalevano a S, lato dell'inoculazione (in U7 l'emisfero destro era stato tagliato al congelatore per la ricerca dei grassi, ricerca che non dimostrava reperti patologici). Numerosi neuroni residui, inoltre, presentavano lesioni del tipo ischemico, con picnosi del nucleo, raggrinzamento ed eosinofilia del citoplasma. Il corno di Ammone appariva ben conservato nei due lati. Sia dove esisteva uno spopolamento cellulare, sia dove la corteccia era ben conservata, vi era vacuolizzazione della « sostanza fondamentale »; ai margini dei vacuoli spesso si osservano cellule nervose e nuclei di cellule gliali, che sembrano spostate da un ipotetico liquido sotto tensione contenuto all'interno dei vacuoli stessi. I vacuoli talora confluivano fra loro, con formazione di cavità più grandi, il cosiddetto *stato spongioso*.

Non vi erano alterazioni di rilievo del nucleo caudato, del nucleo lenticolare e del *globus pallidus*, salvo una lieve vacuolizzazione della « sostanza fondamentale » nello striato. Gravissime le alterazioni talamiche in un caso (U8), con spopolamento cellulare pressoché completo in alcune parti e stato spongioso. Nel cervelletto si osservava una perdita di cellule del Purkinje con formazione di piccole cavità nello strato granulare superficiale; numerose cellule residue presentavano lesioni ischemiche ed omogeneizzanti. Queste alterazioni cerebellari erano particolarmente gravi in un caso (U7). Non abbiamo osservato alterazioni rilevanti nel tronco dell'encefalo.

Nessuna alterazione degna di nota abbiamo osservato nei controlli iniettati con soluzione fisiologica né in un ratto in cui il glucoside era stato iniettato in dosi massive per via peritoneale.

#### DISCUSSIONE.

I quadri citologici osservati negli encefali degli animali trattati con l'inibitore enzimatico, sono complessi; essi però possono ricevere spiegazione se si ammette che l'effetto di bloccaggio degli enzimi di membrana da parte dei glucosidi cardioattivi, ben accertato *in vitro*, avvenga anche *in vivo*; per la prima volta, quindi, una malattia neurologica umana è stata riprodotta sperimentalmente inibendo un sistema enzimatico cerebrale. Benché, infatti, non sia agevole paragonare una malattia umana, l'encefalopatia spongiforme subacuta, che decorre in genere in un periodo di tempo variante da un mese ad un anno, ad una condizione prodotta sperimentalmente nel ratto, dove l'intero ciclo delle manifestazioni morbose si compie nello spazio di poche ore, riteniamo che esistano alcuni dati importanti che rendono questo confronto possibile.

L'aspetto clinico del ratto, quando le convulsioni sono cessate, è assai simile a quello dell'uomo nelle fasi terminali della malattia. Nell'uno e nel-

l'altro caso l'individuo giace in coma, con mioclonie quasi continue degli arti, sino alla morte. Dal punto di vista EEG abbiamo ottenuta una attività pseudoritmica costituita da grandi punte o complessi difasici da 100 a 200 microvolt con la frequenza di circa 60 al minuto e pertanto pressoché sovrapponibile all'attività descritta come « eine Sekunde Typus » nella encefalopatia spongiosa subacuta. Questo reperto compariva dopo un periodo di tempo non eccessivamente lontano dall'iniezione (2 ore circa), durante il quale l'attività elettrica cerebrale dell'animale attraversava varie fasi conformi in genere allo stato clinico (tracciato di base normale, tracciato lento, punta-onda di breve durata, grandi punte o polipunte, onda convulsiva prolungata, tracciato piatto per estinzione post-convulsiva).

Alcune delle alterazioni istologiche osservate possono verificarsi nello stato di male epilettico. Così ad esempio le gravi perdite di cellule nervose nella corteccia cerebrale e nel talamo, con spopolamento pressoché completo in alcuni tratti, la sparizione in talune zone delle cellule del Purkinje, le numerose lesioni « ischemiche » ed « omogeinizzanti » dei neuroni corticali e delle cellule di Purkinje. Sorprende però l'assenza di alterazioni di rilievo nel corno di Ammone, selettivamente colpito nella encefalopatia epilettica.

Vi sono altre alterazioni che non rientrano nel quadro dell'encefalopatia post-epilettica e che sono simili a quelle osservate nella encefalopatia spongiosa spontanea. Esiste infatti una diffusa vacuolizzazione della corteccia cerebrale e dei gangli della base, e soprattutto nel talamo. I vacuoli hanno sede nella cosiddetta « sostanza fondamentale » ossia quella zona che nei comuni preparati è situata fra le cellule nervose e gliali e che dalla microscopia elettronica sappiamo essere costituita da prolungamenti di queste cellule. È frequente il reperto di elementi nervosi e gliali alla periferia dei vacuoli, come se queste cellule fossero respinte da un ipotetico liquido sotto tensione all'interno dei vacuoli stessi; per la confluenza di più vacuoli si ha in alcuni tratti la formazione dello stato spongioso come nella malattia umana.

Questi reperti morfologici sono in buon accordo con la nostra ipotesi iniziale di un edema delle cellule nervose e gliali, anche se ci è al momento impossibile, essendo la ricerca ancora in pieno svolgimento, precisare se questo edema sia a carico dell'uno o dell'altro (o di entrambi) questi tipi cellulari; l'identità dei reperti morfologici e dei tracciati EEG, considerati patognomonicamente della malattia, è in favore dell'ipotesi che anche la malattia umana sia legata ad un disturbo degli enzimi di membrana nelle cellule nervose e gliali; la encefalopatia spongiosa è una malattia rara, di interesse pratico limitato, ma sono spesso le malattie rare a permettere lo studio di fenomeni biologici fondamentali. In questo caso, infatti, essa ci permette di portare nuovi dati al complesso problema del trasporto attivo nelle cellule del s.n.c.

Abbiamo in corso numerose ricerche tendenti ad acclarare il comportamento istochimico dell'ATPasi di membrana in queste condizioni, l'attività della droga e di sostanze ad azione analoga (*Promethazina*-Judah e Ahmed 1965 [15]) nei vari tipi di corteccia della scala filogenetica e su cellule gliali e

nervose coltivate *in vitro* ed infine la morfologia dello stato spongioso al microscopio elettronico.

Ci ripromettiamo, con la tecnica da noi messa a punto, di indagare i comportamenti *in vivo* di altri inibitori enzimatici nervosi.

Desideriamo esprimere i nostri ringraziamenti al sig. Francesco Borghi, studente in medicina, interno dell'Istituto di Anatomia Comparata, che ci ha fornito un volenteroso e prezioso aiuto, alla prof. Maccagnani che ha eseguito i tracciati EEG ed in particolare al prof. G. Alemà che ha interpretato i tracciati EEG e le alterazioni comportamentali dei soggetti trattati e ci ha costantemente incoraggiati e consigliati nel corso della ricerca.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] D. NAIDOO e O. E. PRATT, « *Enzymologica* », *16*, 91 (1953).
- [2] N. H. BECKER, S. GOLDFISCHER, W. Y. SHIN e A. B. NOVIKOFF, « *J. Bioph. Bioch. Cytol.* », *8*, 649 (1960).
- [3] R. M. TORACK e R. J. BARNETT, « *J. Hystoch. Cytochem.* », *11*, 763 (1963).
- [4] R. M. TORACK e R. J. BARNETT, « *J. Neur. Exper. Neurol.* », *23*, 46 (1964).
- [5] G. GARDOS, « *Experientia* », *20*, 127 (1964).
- [6] A. MEYER, in *Greenfield's Neuropathology*. Arnold, London (1963).
- [7] G. ALEMÀ e A. BIGNAMI, « *Riv. Sper. Freniatr.* », *83* suppl., 1491 (1959).
- [8] S. NEVIN, W. H. MCMENEMEY, S. BERHMAN e D. D. JONES, « *Brain* », *83*, 519 (1960).
- [9] H. SIEDLER e N. MALAMUD, « *J. Neuropath. Exper. Neur.* », *22*, 381 (1963).
- [10] M. BIELSCHOWSKY, « *J. Psych. Neur.* », *25*, 72 (1919).
- [11] W. SPIELMEYER, *Histopathologie des Nervensystems*, Springer, Berlin (1922).
- [12] P. JONES e S. NEVIN, « *J. Neur. Neurosurg. Psychiat.* », *17*, 148 (1954).
- [13] H. J. SCHATZMANN, « *Helv. Physiol. Acta* », *11*, 346 (1953).
- [14] J. D. JUDAH, K. AHMED e A. E. M. MCLEAN, « *Nature* », *196*, 484 (1962).
- [15] J. D. JUDAH e K. AHMED, « *Bioch. Biophys. Acta* », *57*, 245 (1962).

#### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Foto *a*) - Vacuolizzazione della « *sostanza fondamentale* » nella corteccia cerebrale. Emat. eos. × 140.

Foto *b*) - Grave perdita (tra le frecce) di cellule nervose nella corteccia cerebrale con spopolamento pressoché completo. Nissl (tionina).

Foto *c*) - Perdita (tra le frecce) di cellule di Purkinje nella corteccia cerebellare. Emat. eos. × 70.

Foto *d*) - Stato spongioso del talamo. Emat. eos. × 270.



