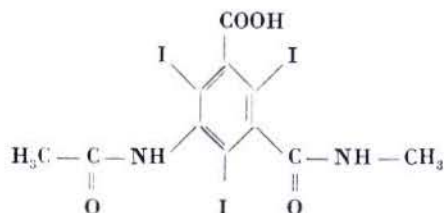


Effetto sensibilizzante dell'acido iotalamico sul danno da radiazioni alla membrana eritrocitaria

Precedenti ricerche hanno dimostrato la capacità di alcuni composti iodurati inorganici e alifatici di potenziare, nei sistemi biologici costituiti da cellule isolate, tanto l'effetto letale dei raggi X o γ quanto il danno da radiazioni alla membrana cellulare responsabile della perdita del contenuto intracellulare di potassio. Nella irradiazione con raggi U. V., i composti iodurati proteggono le cellule di *E. coli* sia nei riguardi dell'effetto letale che del danno di membrana^{1,2}. Viceversa, questo secondo effetto è nettamente esaltato dagli stessi composti quando le cellule esposte *in vitro* alla luce U. V. siano globuli rossi di coniglio^{3,4}.

Si ritiene oggi da vari AA. che gli effetti radiosensibilizzanti dei composti suddetti siano dovuti all'azione dei prodotti di radiolisi di essi, contenenti lo iodio o costituiti esclusivamente da esso⁵. È stato ritenuto, perciò, opportuno estendere le ricerche ai composti organici ciclici iodurati per ottenere ulteriori informazioni sul ruolo dello iodio nei meccanismi di radiosensibilizzazione. A tale scopo occorre composti stabili, onde evitare la loro idrolisi spontanea in assenza di radiazioni, idrosolubili e a bassa tossicità. Tali caratteristiche sono specifiche dei mezzi di contrasto iodurati per uso radiologico ai quali quindi è stata rivolta l'attenzione. Una prima serie di esperienze è stata eseguita con il sale sodico dell'acido iotalamico o acido 5-acetamide-2,4,6-triiodo-N-metil isoftalamico la cui formula di struttura è riportata qui appresso.



Il composto è notevolmente stabile in conseguenza del fatto che tutti i gruppi CH dell'anello benzenico sono bloccati.

Il test biologico impiegato è stato quello della perdita del contenuto intracellulare di potassio da globuli rossi di coniglio irradiati *in vitro* con raggi X e raggi U. V.

La tecnica sperimentale impiegata è quella che è stata già descritta in una precedente pubblicazione⁴.

La sostanza in esame, come è dimostrato dai dati presentati in Fig. 1, è risultata molto attiva nel rendere i globuli di coniglio più sensibili all'azione dei raggi X e dei raggi U. V. che provocano il rilascio del contenuto intracellulare di ione potassio. La figura si riferisce alle concentrazioni di iotalamato indicate in didascalìa. Tali concentrazioni sono quelle che determinano l'effetto ottimale, cioè a dire l'effetto che non aumenta ulteriormente di intensità con l'aumentare della concentrazione.

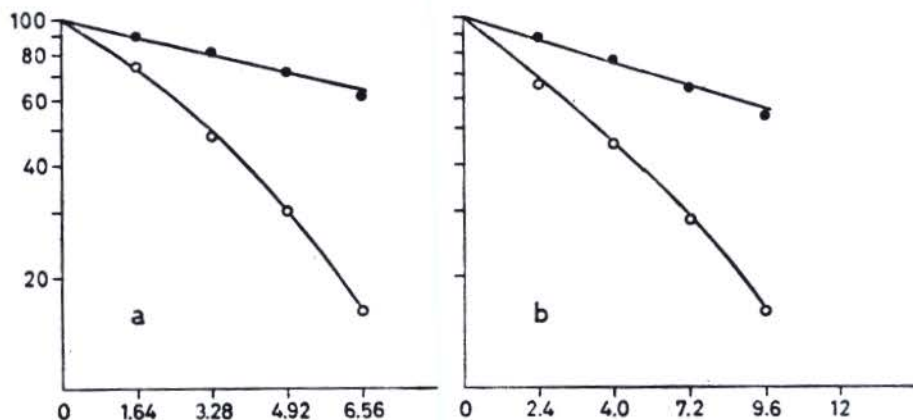


Fig. 1. — Curve dose-effetto per la perdita di K^+ da eritrociti di coniglio, esposti *in vitro* alle radiazioni X (a) e U.V. (b) in presenza di acido iotalamico. La concentrazione dell'additivo è: 10^{-3} M nell'esposizione ai raggi X; $5 \cdot 10^{-3}$ M nell'esposizione alla luce ultravioletta. Ascisse: erg/mm². Ordinate: % del contenuto di K^+ .

—●—●—●—●— controlli irradiati senza additivo
 —○—○—○—○— con aggiunta di additivo
 (ogni punto è la media di 12 esperimenti).

Tanto nella irradiazione X che in quella U. V. l'effetto sensibilizzante dello iotalamato ha dimostrato una tendenza ad aumentare di intensità in funzione della dose di radiazione ed è risultato superiore a quello di concentrazioni equimolecolari di ioduro di sodio o di composti iodurati alifatici^{6,7}. I valori del « Dose Modifying Factor » calcolati a livello della DE_{50} sono risultati 0,32 per l'irradiazione con raggi X e 0,37 per quella con raggi U. V.

Analogamente a quanto osservato con gli altri composti iodurati, anche l'acido iotalamico è attivo soltanto se presente nel sistema al momento dell'irradiazione. È stato infatti osservato che l'effetto sensibilizzante era del tutto assente se i globuli rossi erano lasciati per 30 min in contatto con la sostanza iodurata, poi lavati per centrifugazione e risospesi in soluzione tampone fresca subito prima dell'irradiazione con raggi X o con raggi U. V. Del pari, nessuna modificazione dell'effetto delle radiazioni è stata osservata quando si aggiungeva l'acido iotalamico a globuli rossi subito dopo l'irradiazione.

È stato escluso l'intervento di specie tossiche stabili o a lunga durata, in quanto i globuli rossi non trattati aggiunti a soluzioni di iotalamato irradiate rispettivamente con 6.500 rad di raggi X o con $9,6 \cdot 10^5$ erg/mm² di raggi U. V. non mostravano, dopo 24 ore di conservazione a 4°C, una maggior perdita di K^+ rispetto alle cellule di controllo.

I risultati sopra riportati danno ulteriore conferma all'ipotesi che lo iodio sia principalmente responsabile dell'attività radiosensibilizzante dei composti iodurati e che tale attività sia dovuta a un meccanismo che opera attraverso i prodotti transienti di radiolisi, a vita media breve, formati dalle radiazioni a spese dello iodio stesso. Appare lecito ritenere che la struttura molecolare alla quale lo iodio è legato abbia un ruolo relativamente secondario, quello cioè di mantenere l'alogeno in soluzione e di permettere che esso si trovi nel sito adatto perchè i suoi prodotti di radiolisi possano efficacemente operare i meccanismi di radiosensibilizzazione.

L'A. ringrazia la Società Bracco per aver gentilmente fornito il sale sodico dell'acido iotalamico, il Prof. M. Quintiliani per i suggerimenti e le discussioni in merito al presente lavoro, e il Sig. V. Puocio per l'intelligente assistenza tecnica.

Ricevuto il 31 gennaio 1972.

MARIA ANTONIETTA ORTU-BUSELLU
 Laboratori di Chimica Biologica

- ¹ SAPORA, O. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **6**, 293 (1970).
- ² MISITI-DORELLO, P., G. CANCELLIERI, M. A. ORTU-BUSELLU & O. SAPORA. *Abstracts IV Congress Radiation Research*, Evian, 1970, p. 147.
- ³ ORTU-BUSELLU, M. A., M. QUINTILIANI & O. SAPORA. *Intern. J. Radiation Biol.*, **16**, 393 (1969).
- ⁴ ORTU-BUSELLU, M. A.. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **6**, 302 (1970).
- ⁵ MULLENGER, L., B. B. SINGH, M. ORMEROD & C. J. DEAN. *Nature*, London, **216**, 372 (1967).
- ⁶ QUINTILIANI, M., E. STROM, M. BIANCHI & M. BOCCACCI. *International Atomic Energy Agency*, Vienna, 1962, p. 295.
- ⁷ BIANCHI, M. R., M. BOCCACCI, P. MISITI-DORELLO & M. QUINTILIANI. *Intern. J. Radiation Biol.*, **8**, 329 (1970).

Rapporti tra teoria del bersaglio e teoria dell'affidabilità

La teoria del bersaglio (*target theory*), proposta molti anni fa da Crowther¹ e ampiamente sviluppata da Lea², si occupa degli effetti delle radiazioni sui microorganismi e sui sistemi di cellule indipendenti.

Partendo dall'ipotesi che la morte della cellula (in genere intesa come morte riproduttiva) dipenda dalla ionizzazione prodotta in qualche suo punto critico, detto bersaglio, o nelle vicinanze di questo, la teoria riesce a descrivere ed interpretare un certo numero di fatti sperimentali. Più precisamente, è possibile in alcuni casi prevedere il comportamento della sopravvivenza (definita come il rapporto tra il numero di cellule sopravvissute e il numero di cellule presenti inizialmente) in funzione della dose di irraggiamento ed ottenere dai dati sperimentali utili informazioni (p. es., dimensioni e numero dei bersagli presenti nella cellula).

Le formule (1), (2) e (3) mostrano i risultati più conosciuti della teoria:

$$S(D) = e^{-kD} ; \quad (1)$$

$$S(D) = 1 - (1 - e^{-kD})^n ; \quad (2)$$

$$S(D) = e^{-kD} \sum_{i=0}^{m-1} \frac{(kD)^i}{i!} . \quad (3)$$

La prima formula è ricavata nell'ipotesi che in ogni cellula sia presente un solo bersaglio, il quale, una volta colpito, determina la morte della cellula stessa.

La costante k che ivi compare è l'inverso della D_{37} , cioè della dose che riduce al 37 % la popolazione iniziale.

La seconda formula si ottiene supponendo che siano presenti n bersagli e che la morte sopravvenga solo dopo che l'ultimo di essi viene colpito. Il parametro n , che compare nell'esponente, è uguale al numero di bersagli che si suppongono esistenti nella cellula.

La terza formula si ricava dall'ipotesi che sia presente un solo bersaglio, il quale, però, ha bisogno di essere colpito più volte per dar luogo all'effetto letale.

Il parametro m , che compare come indice nel sommatorio, è appunto il numero di volte che bisogna colpire il bersaglio per avere la morte della cellula.

La teoria dell'affidabilità (*reliability theory*) è stata sviluppata per trovare le soluzioni migliori da adottare nella progettazione di complessi ad alto grado di sicurezza e per poter scegliere con obiettività tra complessi svolgenti le stesse funzioni. L'affidabilità di un complesso è definita come « la probabilità che questo funzioni senza guastarsi per un fissato periodo di tempo e in determinate condizioni di lavoro e ambientali »³.

Supponendo che il generico guasto sia a carattere catastrofico (cioè, improvviso e totale) e che la probabilità istantanea di guasto rimanga costante nel tempo, si trovano, per opportune configurazioni, i seguenti risultati:

$$R(t) = e^{-\lambda t} ; \quad (4)$$

$$R(t) = 1 - (1 - e^{-\lambda t})^n ; \quad (5)$$

$$R(t) = e^{-\lambda t} \sum_{i=0}^{m-1} \frac{(\lambda t)^i}{i!} . \quad (6)$$

Mentre dalla (4), relativa al componente semplice, si vede che la probabilità di funzionamento decresce esponenzialmente nel tempo (λ è la probabilità istantanea di guasto), la (5) mostra come sopravvivono quei complessi di n elementi che funzionano finché opera almeno un elemento (nell'ipotesi che tutti gli elementi del complesso lavorino contemporaneamente).

La (6) rappresenta invece la legge di affidabilità per quei complessi di m elementi in cui funziona un solo elemento alla volta: quando l'elemento in funzione si guasta, un commutatore (di cui si suppone infinita l'affidabilità) ne mette in funzione un altro; e così via, fino al guasto dell'ultimo elemento rimasto, che segna la « morte » del complesso.

Le leggi di sopravvivenza e di affidabilità riportate sono a due a due formalmente analoghe. Tuttavia, è bene notare che questa analogia non è causale, ma sostanziale. Essa è conseguenza diretta delle ipotesi sotto cui sono state ricavate le due serie di formule, ipotesi a due a due equivalenti.

D'altra parte, le leggi di affidabilità sono soggette ad ulteriori esplicite restrizioni (guasto a carattere catastrofico, costanza della probabilità istantanea di guasto). Si può, perciò considerare la teoria del bersaglio come un caso particolare della teoria dell'affidabilità, in quanto quest'ultima tratta più generalmente di sistemi e del loro funzionamento sotto certe condizioni.

È quindi ragionevolmente presumibile che i risultati della teoria dell'affidabilità possano essere trasferiti in campo radiobiologico e che si possa ottenere anche qualche informazione intorno ai meccanismi di riparazione, sfruttando le conoscenze di affidabilità dei complessi autoriparativi (complessi con linee di guasto ed eventuali automi autoriparantisi).

Desidero ringraziare il Dott. A. Costantini per le utili discussioni.

FRANCO TAGGI (*)

Ricevuto il 5 aprile 1972.

Laboratori di Chimica (Radiochimica)

¹ CROWTHER, J. A. Some considerations relative to the action of X-rays on tissue cells. *Proc. Roy. Soc. (London)* **B96**, 207-211 (1924).

² LEA, D. E. *Actions of radiations on living cells*, 2^a ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1955.

³ CARLUCCI, A., C. PEDICINO & A. SERRA. Affidabilità di un complesso elettronico. *CNEN, RT/EI* (66) 16 (1966).

(*) Ospite dei Laboratori di Chimica.

Distribuzione della radioattività del glucosio ^{14}C in vari organi di *Carassius auratus*

Introduzione

Negli ultimi anni sono state fatte numerose ricerche sul metabolismo glucidico degli animali eterotermi^{1,2}. Dalla letteratura esaminata, tuttavia, risulta che i dati relativi a studi del genere in *Carassius auratus* sono notevolmente scarsi. Ci siamo perciò proposti di esaminare l'utilizzazione di substrati glucidici marcati con isotopi radioattivi nei vari organi del suddetto animale, a diverse temperature di acclimatazione. La prima fase della ricerca, cui si riferisce il contenuto della presente nota, è consistita nell'indagare sulla incorporazione e distribuzione, in vari organi e tessuti, della radioattività da glucosio ^{14}C , somministrato per iniezione intramuscolare.

Metodo

Sono stati utilizzati due gruppi di quattro pesci ciascuno, uno a 24°C e l'altro a 16°C. Ogni animale è stato sacrificato dopo un'ora dall'iniezione, per via intramuscolare, di 10 μl di una soluzione di glucosio uniformemente marcato con ^{14}C , contenente a 10 μc in 60 m μmoli . Da ciascun pesce sono stati isolati a freddo e pesati cuore, rene, fegato, cervello, muscolo e la carcassa residua, privata degli altri organi interni.

Per ogni tessuto è stato allestito un estratto idro-alcoolico con la tecnica descritta da Beloff-Chain *et al.*⁴ e la radioattività totale è stata misurata in una apparecchiatura a scintillazione liquida usando micro aliquote dei campioni addizionati a 10 ml di liquido di Bray. Una parte del tessuto muscolare è stata invece estratta con una miscela di cloroformio: metanolo 2:1, allo scopo di evidenziare una eventuale incorporazione della radioattività dal glucosio nella frazione lipidica⁵.

Risultati e conclusioni

Nella Tab. 1 si sono riportati i risultati relativi alla incorporazione del substrato marcato nei vari organi e tessuti, espressi come: radioattività totale per ciascun organo; radioattività specifica, in dpm/mg di tessuto; percentuale della radioattività iniettata. Dalla tabella si osserva che l'incorporazione più elevata, fra gli organi interni, è a carico del fegato, con valori oscillanti fra l'1% e il 7% della radioattività totale iniettata. Seguono cervello e rene, con valori assai simili per i due organi, varianti fra lo 0,4% e lo 0,7%. Ultimo è il cuore, con un valore medio di incorporazione pari allo 0,2%. Nella stessa tabella si osserva anche che è assente qualunque effetto della temperatura sulla incorporazione: i valori percentuali non cambiano infatti in modo significativo per uno stesso organo, al variare della temperatura. Il muscolo sembra essere il tessuto che incorpora la maggior parte della radioattività, in quanto la carcassa, che è costituita in gran parte da tessuto muscolare, la cui attività metabolica è inoltre assai più elevata di quella degli altri costituenti, ne contiene all'incirca il 52%. La frazione lipidica estratta dalla carcassa si rivela scarsamente radioattiva (0,6% della radioattività totale inoculata); in

essa, per cromatografia su strato sottile⁶, si identificano fosfolipidi, acidi grassi, colesterolo libero e digliceridi, trigliceridi, colesterolo estere, β carotene. L'analisi chimica quantitativa indica la presenza di 9 mg di lipidi per grammo di tessuto esaminato.

TABELLA I

Temperature °C	CERVELLO			RENE			CUORE			FEGATO		
	dpm totali	dpm/mg	%	dpm totali	dpm/mg	%	dpm totali	dpm/mg	%	dpm totali	dpm/mg	%
24°C	317.040	4.060	0,7	322.350	2.518	0,7	—	—	—	1.489.190	3.971	3,7
	155.440	2.775	0,4	224.840	2.614	0,5	69.269	2.740	0,1	681.885	1.671	1,7
	284.050	2.990	0,6	132.300	2.646	0,3	56.345	2.449	0,1	473.000	2.832	1,1
	338.300	3.844	0,7	126.360	1.452	0,3	84.240	4.955	0,2	776.028	3.576	1,9
16°C	314.510	4.430	0,7	366.280	2.953	0,8	476.050	9.334	1,0	2.897.280	8.092	7,2
	298.710	3.556	0,7	264.280	3.775	0,6	80.710	6.208	0,2	623.120	4.046	1,5
	218.240	3.520	0,5	229.842	2.444	0,5	140.431	3.600	0,3	689.031	2.159	1,7
	298.280	3.389	0,7	197.107	2.463	0,4	89.520	4.096	0,2	667.320	4.094	1,6

L'estratto alcolico della carcassa è stato dapprima analizzato mediante cromatografia su carta⁴. In tal modo però si evidenziano soltanto due macchie radioattive corrispondenti al glucosio e all'acido lattico, pertanto l'analisi è stata ripetuta mediante

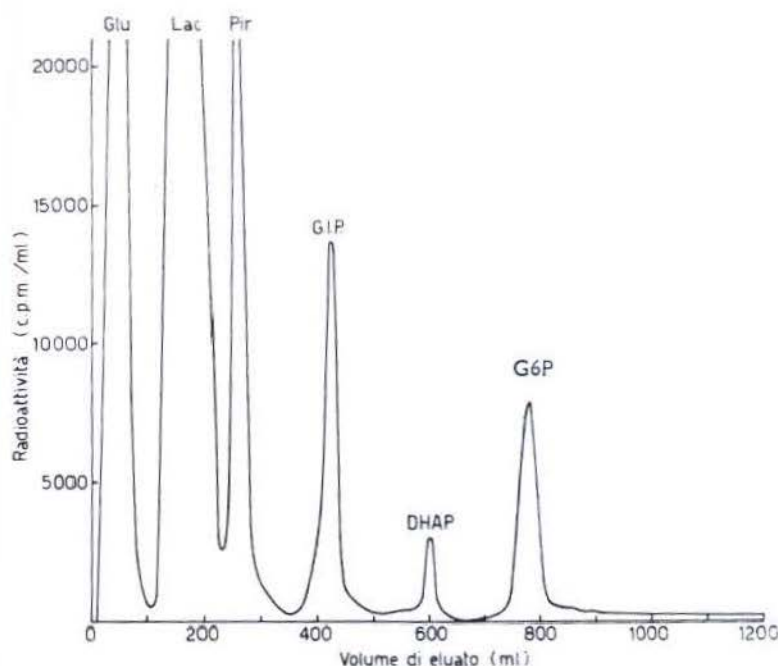


Fig. 1. — Separazione per cromatografia su resina anionica degli intermedi glicolitici presenti nell'estratto alcolico della carcassa di *Carassius auratus*.

(Glu = glucosio; Lac = acido lattico; Pir = acido piruvico; G1P = glucosio-1-fosfato; DHAP = diidrossiacetonfosfato; G6P = glucosio-6-fosfato).

cromatografia su colonna a scambio anionico⁷. Con tale tecnica si evidenziano tutti gli intermedi della glicolisi come è dimostrato nella Fig. 1, nella quale si nota che la radioattività del glucosio-1-fosfato è più elevata di quella del glucosio-6-fosfato. Su questa interessante osservazione si stanno attualmente sviluppando le ulteriori indagini.

Gli AA. ringraziano il Sig. Carlo Cantello per la collaborazione tecnica prestata.

Ricevuto il 15 febbraio 1972.

RAFFAELLA CATANZARO e GIOVANNA DE BENEDICTIS (*)
Laboratori di Chimica Biologica

- ¹ YAMAMOTO, M. *Can. J. Bioch.*, **46**, 423 (1968).
- ² HOCHACHKA, P. W. & F. R. MAYES. *Can. J. Zool.*, **40**, 261 (1962).
DEAN, J. M. & C., GOODNIGHT. *Physiol. Zool.*, **37**, 280 (1964).
- ⁴ BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI, F. POCCHIARI & C. ROSSI.
Proc. Royal Soc. Sez. B, **143**, 481 (1955).
- ⁵ CAVINA, G., M. T. AJELLO, G. CASPARBINI, A. D'ANTONA, L. MORETTA & G. MORETTI.
Ann. Ist. Super. Sanità, **1**, 566 (1965).
- ⁶ FOLCH, J. & M. LEES. *J. Biol. Chem.*, **497**, 226 (1957).
- ⁷ BEDETTI, G., G. D'AGNOLO & F. POCCHIARI. *J. Chromatog.*, **49**, 53 (1970).

(*) Il esista dei Laboratori di Chimica Biologica.

Effetto dell'acclimatazione termica sugli enzimi della glicolisi in *Salmo gairdneri*

La velocità di utilizzazione del glucosio nei tessuti di animali pecilotermi è controllata, tra gli altri fattori, dalla temperatura ambientale ¹⁻³. Tuttavia, le informazioni attualmente disponibili sull'azione esercitata dalla temperatura sul metabolismo dei carboidrati in animali pecilotermi sono piuttosto frammentarie.

Abbiamo voluto perciò esaminare l'attività degli enzimi glicolitici in tessuti di trota iridea (*Salmo gairdneri*), acclimatata a freddo (4°C) e a caldo (20°C), allo scopo di individuare alcuni dei fattori limitanti la glicolisi nei processi di acclimatazione termica.

Le trote, fornite da un allevamento locale, sono state acclimate per due settimane in vasche munite di termostato, pompa d'aerazione e filtri della Acquari di Bologna. Il cervello, il fegato ed il muscolo dorso-laterale, prelevati rapidamente in ghiaccio e pesati, sono stati omogeneizzati in Potter-Elyehjem in tampone fosfato 0,04 M, pH 7,0, in modo da avere una concentrazione finale di 100 mg/ml. Dopo centrifugazione a 23.000 × g per 20 minuti a 4°C in una centrifuga MSE 25, sul supernatante sono stati misurati, alla temperatura d'acclimatazione, gli enzimi della glicolisi con i metodi di Bergmeyer ⁴. Le attività enzimatiche sono state determinate con uno spettrofotometro Gilford mod. 2400.

L'acclimatazione a caldo ha come risultato un aumento generico di tutti gli enzimi della glicolisi nel cervello (Tab. 1), nel muscolo (Tab. 2) nel fegato (Tab. 3) di *Salmo gairdneri*.

TABELLA 1

**Effetti dell'acclimatazione sull'attività *in vitro* degli enzimi glicolitici
del cervello di *Salmo gairdneri***

E N Z I M I	Temperatura di acclimatazione	
	4°C	20°C
Fosfoglucomutasi	0,24 ± 0,03	2,0 ± 0,5
Esocinasasi	tracce	tracce
Glucosio-6-fosfato deidrogenasi	0,30 ± 0,05	0,9 ± 0,1
Fosfoglucoisomerasi	1,24 ± 0,03	2,4 ± 0,3
Fosfofruttochinasi	0,20 ± 0,05	0,6 ± 0,1
Aldolasi	3,2 ± 0,5	9 ± 1
Triosofosfatoisomerasi	43 ± 1	25 ± 1
Glicerofosfato deidrogenasi	1,5 ± 0,05	1,0 ± 0,1
Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	6 ± 1	11 ± 2
Fosfoglicerocinasasi	14 ± 2	25 ± 2
Fosfogliceromutasi	2,2 ± 0,5	1,9 ± 0,4
Enolasi	6,2 ± 0,4	8,6 ± 0,7
Piruvato chinasi	11 ± 1	34 ± 5
Lattico deidrogenasi	18 ± 3	40 ± 6

I risultati, espressi in $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$ di tessuto fresco, sono le medie di sette esperimenti \pm s.e.m. Le misure sono state eseguite a 4°C e 20°C rispettivamente, in dipendenza dalla temperatura di acclimatazione.

TABELLA 2

**Effetti dell'acclimatazione sull'attività *in vitro* degli enzimi glicolitici
del muscolo di *Salmo gairdneri***

E N Z I M I	Temperatura di acclimatazione	
	4°C	20°C
Fosfoglucomutasi	0,9 ± 0,2	4,2 ± 0,5
Esocinasi	tracce	tracce
Glucosio-6-fosfato deidrogenasi	0,22 ± 0,04	0,20 ± 0,02
Fosfoglucoisomerasi	7,5 ± 0,5	25 ± 2
Fosfofruttochinasi	1,7 ± 0,4	6,9 ± 0,5
Aldolasi	21 ± 3	39 ± 5
Triosofosfatoisomerasi	32 ± 4	42 ± 4
Glicerofosfato deidrogenasi	14,8 ± 0,1	13,4 ± 0,3
Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	9 ± 1	17 ± 3
Fosfoglicerochinasi	28 ± 2	68 ± 11
Fosfogliceromutasi	7,5 ± 0,3	13 ± 1
Enolasi	15 ± 2	25 ± 3
Piruvato chinasi	30 ± 3	63 ± 9
Lattico deidrogenasi	154 ± 36	172 ± 26

I risultati, espressi in $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$ di tessuto fresco, sono le medie di nove esperimenti \pm s.e.m. Le misure sono state eseguite a 4°C e 20°C rispettivamente, in dipendenza dalla temperatura di acclimatazione.

TABELLA 3

**Effetti dell'acclimatazione sull'attività *in vitro* degli enzimi glicolitici
del fegato di *Salmo gairdneri***

E N Z I M I	Temperatura di acclimatazione	
	4°C	20°C
Fosfoglucomutasi	1,04 ± 0,06	8,7 ± 0,5
Esocinasi	0,48 ± 0,05	1,2 ± 0,3
Glucosio-6-fosfato deidrogenasi	3,1 ± 0,1	9,6 ± 0,8
Fosfoglucoisomerasi	1,7 ± 0,3	26 ± 2
Fosfofruttochinasi	1,0 ± 0,2	2,7 ± 0,6
Aldolasi	2,4 ± 0,4	3,3 ± 0,3
Triosofosfatoisomerasi	20 ± 2	54 ± 5
Glicerofosfato deidrogenasi	18 ± 3	23 ± 2
Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	11 ± 2	26 ± 1
Fosfoglicerochinasi	15 ± 2	38 ± 3
Fosfogliceromutasi	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,3
Enolasi	7,4 ± 0,1	10 ± 1
Piruvato chinasi	6 ± 1	4,4 ± 0,1
Lattico deidrogenasi	109 ± 6	250 ± 27

I risultati, espressi in $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$ di tessuto fresco, sono le medie di nove esperimenti \pm s.e.m. Le misure sono state eseguite a 4°C e 20°C rispettivamente, in dipendenza dalla temperatura di acclimatazione.

Nel considerare il significato delle misure da noi effettuate, dobbiamo tener presenti alcune limitazioni sulle quali conviene richiamare l'attenzione. Abbiamo effettuato, ad es., le nostre misure su organi *in toto* senza preoccuparci della topografia eterogenea degli enzimi, nè ci siamo curati di distinguere tra le diverse componenti catalitiche dei tessuti per uno stesso substrato. Poichè misuravamo le attività degli enzimi sul sovrannatante abbiamo verificato se nel residuo, che rimaneva dopo aver centrifugato l'omogenato, restava dell'attività enzimatica, legata alle membrane mitocondriali, e di quale entità essa fosse. Abbiamo così constatato che tale attività non era mai superiore al 10% rispetto a quella del sovrannatante. Nel cervello e nel fegato, tuttavia, i valori dell'attività dell'esochinasi erano, sia nel sovrannatante che nel precipitato risospeso in tampone fosfato, inferiori alla sensibilità del metodo impiegato (0,2 μ mol/min/g di tessuto fresco).

La determinazione quantitativa degli enzimi glicolitici individuali, ottenuta dall'analisi in condizioni ottimali di concentrazione di substrati e coenzimi, non darà ovviamente informazioni rispetto alla loro operazione in un sistema multienzimatico vivente. Tali determinazioni permetteranno però di rivelare le capacità dei singoli enzimi. L'aumento dell'attività degli enzimi della glicolisi dopo acclimatazione a caldo è probabilmente dovuto ad una questione di carattere termodinamico. Si ha un aumento omogeneo, a caldo, delle attività enzimatiche e si può, in linea generale, affermare che tra le capacità degli enzimi dei pesci acclimatati a freddo e di quelli acclimatati a caldo esiste un rapporto di 1 : 2. Eccezione interessante a questo aumento omogeneo della capacità degli enzimi glicolitici a caldo è la fosfoglucomutasi che a 18°C ha una capacità 8 volte maggiore che a 4°C, suggerendo un'attivazione della glicogenolisi negli animali acclimatati a caldo. L'attivazione della glicogenolisi è confermata sia dall'aumento dell'attività della fosfofruttochinasi che dalla diminuzione del contenuto di glicogeno, osservata a caldo da Dean³.

L'effetto sulla fosfoglucomutasi osservato nei tre tessuti esaminati suggerisce un unico punto chiave del processo di acclimatazione a livello del glucosio-6-fosfato. Quest'ultimo è infatti il substrato di quattro enzimi in competizione: glucosio-6-fosfato deidrogenasi, fosfoglucoisomerasi, glucosio-6-fosfato fosfatasi, fosfoglucomutasi.

A prima vista il *pathway* favorito sembrerebbe essere quello della ossidazione degli esosofosfati dato che, fra i quattro enzimi, la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, proveniente da diverse origini, possiede il Km più basso per il glucosio-6-fosfato⁵. Tuttavia, un fattore particolarmente importante è la specificità anomera dei quattro enzimi sopracitati⁶. La fosfoglucomutasi e la fosfoglucoisomerasi agiscono sull' α -glucopiranosio-6-fosfato, mentre la glucosio-6-fosfato deidrogenasi agisce sul β -glucopiranosio-6-fosfato⁷. Secondo Sols *et al.*⁷, la velocità di anomerizzazione spontanea del glucosio è il fattore limitante nella utilizzazione dello *shunt* dei pentoso fosfati; tale velocità è di 0,01 μ mol/sec di glucosio-6-fosfato a 4°C ed è circa quattro volte più grande a 20°C. La temperatura d'acclimatazione potrebbe, perciò, agire direttamente sull'uso alternativo o contemporaneo della glicolisi e dello *shunt* semplicemente aumentando o diminuendo in base alla legge di Arrhenius la velocità di anomerizzazione del glucosio-6-fosfato.

Ricevuto il 30 marzo 1972.

ANNA ROMANO (*) e CECILIA BEDETTI (*)

Laboratori di Chimica Biologica

(*) Ospite dei Laboratori di Chimica Biologica.

- ¹ KANUNGO, M. S. & C. L. PROSSER. *J. Cellular Comp. Physiol.*, **54**, 265 (1959).
- ² HOCHACHKA, P. W. & F. R. HAYES. *Can. J. Zool.*, **40**, 261 (1962).
- ³ DEAN, J. M. *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**, 185 (1969).
- ⁴ BERGMAYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis*, Academic Press, New York, 1963.
- ⁵ MAHLER, H. R. & E. H. CORDES. *Biological Chemistry*, Harper and Row, New York, 1968.
- ⁶ SALAS, M., E. VINUELA & A. SOLS. *J. Biol. Chem.*, **240**, 561 (1965).
- ⁷ SOLS, A. & R. K. CRANE. *J. Biol. Chem.*, **210**, 581 (1954).

Effect of some antiarrhythmic 1,5-diphenyl bispidin derivatives(*) on *in vitro* oxygen uptake and glucose utilization of rat heart muscle

An antiarrhythmic activity of some 1,5-diphenyl-3,7-bis(hydroxyalkyl)- and 1,5-diphenyl-3,7-bis(methoxyalkyl)-bispidin-9-ones and -ols synthesized by one of us^{1,2} in this laboratory has been previously demonstrated by Cartoni, Figini and Carpi³.

It is well known that some antiarrhythmic drugs, particularly quinidine, are capable of inhibiting a number of enzymes involved in the oxidation of glucose^{4,5} and it has been suggested that the prolonged recovery period of heart muscle may be dependent upon the depression of the energy-yielding reactions of carbohydrate metabolism.

In the present work the *in vitro* effect of the 1,5-diphenyl bispidin derivatives on the oxygen uptake and glucose utilization in rat heart muscle will be compared with that of quinidine.

Materials and methods

Male Wistar rats weighing approx. 220 ± 20 g were used. The conditions of incubation were the same as those described by Mathur and Mokler⁶. Two or three heart slices of 0.5 mm thickness weighing about 300 mg were prepared with a Stadie Riggs microtome and placed in Warburg vessels containing 3.0 ml of the medium described by Hess and Haugaard⁵ (NaCl 88 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM) and glucose 10 mM, pH 7.4. All substances studied were dissolved in distilled water and subsequently neutralized (except 2099 I. S. dissolved in water with Tween 80; the same amount of Tween 80 and sodium perchlorate were added in its control experiments) and added from the side arm at a final concentration 0.5 mM. The reaction vessels, gassed for 5 min with oxygen, were incubated at 37° C for 2 hours. The thermobarometric control vessel contained medium with glucose but no drugs or tissue. The reaction was stopped at the end of two hours after removing the tissue slices by adding 0.15 ml of perchloric acid 6.6 N, then the samples were centrifuged for 10 min at 3000 g. The supernatant was analyzed for glucose content by the enzymatic method of Bergmeyer and Bernt⁷ based on the oxidation of glucose, with a Beckman DK-2 spectrophotometer. The total volume in a cuvette was 1.3 ml, in which 0.05 ml was the sample diluted 1:15. The values of extinction at 450 nm were used to calculate the glucose content in each sample. The tissue utilization of glucose was considered the difference between the initial glucose content in the thermobarometric control vessel and the glucose content in each vessel after incubation.

(*) Abbreviations: 2099 I. S., 1,5-diphenyl-3,7-bis(β -diethylaminoethyl)-bispidin 9-ol triperchlorate; 3224 I. S., 1,5-diphenyl-3,7-bis(2' methoxyethyl)-bispidin-9-one; 3225 I. S., 1,5-diphenyl-3,7-bis(3' methoxypropyl)-bispidin-9-one; 3 231 I. S., 1,5-diphenyl-3,7-bis(2' methyl-3' hydroxypropyl)-bispidin-9-one; 3232 I. S., 1,5-diphenyl-3,7-bis(3' hydroxypropyl)-bispidin-9-one.

Results and discussion

The effects of quinidine sulfate and 1,5-diphenyl bispidin derivatives at concentration 0.5 mM on oxygen uptake and glucose utilization are presented in Table 1.

The control values for oxygen uptake in heart slices are in agreement with the results of Matur and Mokler⁶: 3.9 μ l/mg dry tissue/hr in the present experiments(*) and 3.6 to 4.1 μ l/mg dry tissue/hr in their experiments. The inhibitory effect of quinidine sulfate on the

TABLE I

Effect of quinidine sulfate and 1,5-diphenyl bispidin derivatives on oxygen uptake and glucose utilization in rat heart slices

Drugs	No. of experiments	Oxygen uptake		Glucose utilization	
		μ moles/g of tissue, wet weight/2 hr			
			P		P
No drug	16	70.9 \pm 3.3		40.7 \pm 2.6	
Quinidine sulfate	7	40.9 \pm 4.1	< 0.001	27.4 \pm 4.7	< 0.05
2099 I. S. *	5	69.0 \pm 4.8	N. S.	27.8 \pm 3.5	N. S.
3224 I. S.	4	70.8 \pm 4.2	N. S.	35.3 \pm 6.0	N. S.
3225 I. S.	6	87.7 \pm 8.4	< 0.05	34.7 \pm 5.8	< 0.1
3231 I. S.	8	54.4 \pm 3.9	< 0.01	30.4 \pm 3.9	< 0.05
3232 I. S.	6	71.6 \pm 2.4	N. S.	39.9 \pm 2.0	N. S.

Experimental conditions: tissue (about 300 mg) was incubated in 3.0 ml of medium (NaCl 88 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM and glucose 10 mM), pH 7.4 at 37°C in O₂ for 2 hours. The concentration of compounds, when present was, 0.5 mM. The glucose content was determined with Bergmeyer and Bernu⁷ method. Mean values \pm standard deviation.

* 2099 I. S. was dissolved in water with Tween 80, the control values with the same amount of Tween 80 and equimolar amount of sodium perchlorate were respectively 67.5 \pm 4.9 and 28.7 \pm 2.4 for oxygen uptake and glucose utilization as means of 5 experiments.

oxygen uptake (42%) was similar to that found by Hess and Haugaard⁵ (44%) but larger than that reported by Matur and Mokler⁶ (27%). Among the 1,5-diphenyl bispidin derivatives 3231 I. S., the compound with a branched carbon chain, inhibits the oxygen uptake (24%, p < 0.01) and behaves similarly to quinidine sulfate. The inhibitory effect of 3231 I. S. is apparent from the beginning of the incubation and remains constant during the incubation period. Compound 3225 I. S. has a slight but significant (p < 0.05) stimulatory effect on the oxygen uptake. The other compounds were found to have no effect on the *in vitro* oxygen uptake of rat heart slices.

It may be seen from Table I that quinidine sulfate inhibits the glucose utilization by heart slices. In the present experiments this effect is, however, less pronounced (33%) than that found by other authors^{5,6}. 3231 I. S., the compound which depressed the oxygen uptake, inhibited to the same degree (25%) glucose utilization (p < 0.05). 3225 I. S., the compound which stimulated the oxygen uptake may have an inhibitory effect on the glucose utilization (p < 0.1).

It may be concluded that among the 1,5-diphenyl bispidin derivatives the active compound, in the present *in vitro* experiments, is 3231 I. S. Its inhibitory effect on oxygen

(*) to convert μ moles of O₂/g wet weight/2 hrs into μ l/mg dry weight/hr, the values must be multiplied by the factor 0.056⁸.

uptake and glucose utilization is similar, at the same molar concentration, as that of quinidine but less pronounced. It should be noted that Cartoni, Figini and Carpi³ reported that 3231 I. S. had the best ratio toxic/antiarrhythmic concentration of this series of compounds on isolated rabbit auricle, similar to that of quinidine. Compound 2099 I. S., inactive in the present *in vitro* experiments was demonstrated by the same authors to be very active in the *in vivo* experiments and about 10 times less active than quinidine in the *in vitro* experiments.

The other antiarrhythmic compounds are without effect on the *in vitro* oxygen uptake and glucose utilization. However, it should be noted that several potent antiarrhythmic drugs such as chlorquine and procaine amide at equal molar concentration (0.5 mM) are also inactive⁵.

The results of the present work indicate that there is not a clear correlation between the antiarrhythmic activity of 1,5-diphenyl bispidin derivatives and their biochemical effects. In fact, compounds 3224 I. S. and 3232 I. S. which are without effect on the oxygen uptake and glucose utilization have *in vitro* antiarrhythmic effects and are toxic at equal or lower concentrations than 3231 I. S. while 3225 I. S., which is more active as an antiarrhythmic agent than 3231 I. S., causes an increase in oxygen uptake.

These results seem to support the hypothesis suggested by several authors^{5,6} that the depression of carbohydrate metabolism is rather a toxic effect of antiarrhythmic drugs not associated with their therapeutic action.

Received May 4, 1972.

STEFANO CHIAVARELLI, RENATA DEL CARMINE (*) and HANNA MICHAŁEK
Department of Therapeutic Chemistry

- ¹ CHIAVARELLI, S., H. F. TÖFFLER, R. LANDI VITTORY & P. MAZZEO. *Farmaco, Ed. Sci.*, **20**, 421 (1965).
- ² CHIAVARELLI, S. & G. SETTIMJ. *Gazz. Chim. Ital.*, **88**, 1253 (1958).
- ³ CARTONI, C., A. FIGINI & A. CARPI. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **4**, 333 (1968).
- ⁴ UYEKI, E. M., E. M. K. GEILING & K. P. DU BOIS. *Arch. Intern. Pharmacodyn. Thér.*, **97**, 191 (1954).
- ⁵ HESS, M. E. & N. HAUGAARD. *Circulation Res.*, **6**, 256 (1958).
- ⁶ MATHUR, P. P. & C. M. MÖKLER. *Arch. Intern. Pharmacodyn. Thér.*, **178**, 285 (1969).
- ⁷ BERGMAYER, H. U. & E. BERNI. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmeyer, Ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1963, p. 123.

(*) Guest in the Department of Therapeutic Chemistry.