Effetto del triperidolo sul metabolismo del glucosio e dell'acido piruvico in fettine di corteccia cerebrale di ratto

GIANLUIGI GATTI, HANNA MICHALEK (*) e FRANCESCO POCCHIARI

Laboratori di Chimica Terapeutica e Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — È stato studiato l'effetto del triperidolo alla concentrazione 2×10^{-4}M sul metabolismo intermedio del glucosio e del piruvato uniformemente marcati ^{14}C in fettine di corteccia cerebrale di ratto, usando una tecnica quantitativa di radiocromatografia su carta.

Il triperidolo riduce il consumo di ossigeno di circa 35 %. Esso inoltre riduce l'incorporazione della radioattività di entrambi i substrati nella CO_2, nell'acido glutammico e nell'acido γ-amminobutirrico mentre non ha alcuna influenza sulla formazione di acido aspartico, alanina ed acido lattico radioattivo.

Summary. (*The effect of triperidol on the glucose and pyruvate metabolism in rat cerebral cortical slices*). — It was studied the effect of a potent neuroleptic, triperidol, a butyrophenone derivative, on the glucose and pyruvate metabolism in rat cerebral cortical slices using uniformly ^{14}C-labelled substrates and a quantitative radiochromatographic technique. After 1 hour incubation the substrates metabolized by tissue were accounted for as lactate, aspartate, glutamate, γ-aminobutyrate, alanine (Fig. 1) and CO_2. It was found that triperidol at a concentration 2×10^{-4} M decreased the oxygen uptake at a constant rate (Fig. 3) and the substrates' utilization (Table 2). It decreased the incorporation of both substrates into glutamate, γ-aminobutyrate and CO_2, whereas it was without effect on lactate, aspartate and alanine production (Fig. 2, Table 3 and 4).

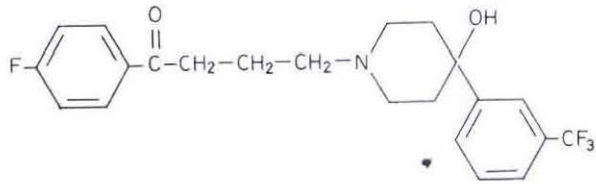
INTRODUZIONE

In precedenti ricerche eseguite da uno di noi (GATTI, 1965; 1966) era stata messa in evidenza una differenza non solo quantitativa ma anche qualitativa tra gli effetti farmacologici dei neurolettici fenotiazinici e quelli

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica Terapeutica.

butirrofenonici. Poichè una abbondante letteratura è disponibile sugli effetti farmacologici (per referenze vedi BRADLEY, 1963, SCHENKER & HERBST, 1963) e biochimici (per referenze vedi: GUTH & SPIRTES, 1964; RICHTER, 1961) dei derivati fenotiazinici mentre scarsa è la raccolta dei dati sugli effetti biochimici dei butirrofenoni (SOEP & JANSSEN, 1961; CARLSSON & LINQUIST, 1963), si è deciso di proseguire da un lato le ricerche farmacologiche con nuove tecniche (GATTI, 1966) e dall'altro di iniziare le ricerche biochimiche.

MC ILWAIN (1964) aveva trovato che l'aloperidolo inibiva parzialmente la respirazione e la formazione dell'acido lattico in fettine di corteccia cerebrale di cavia incubate con glucosio. È sembrato pertanto interessante estendere queste ricerche e studiare l'effetto del triperidolo, il neurolettico più attivo



e meno tossico della serie, sul quadro completo del metabolismo intermedio del glucosio e del piruvato.

PARTE SPERIMENTALE

Materiali

Il glucosio e il piruvato sodico uniformemente marcati ^{14}C sono stati ottenuti dal *Radiochemical Centre*, Amersham (Gran Bretagna). Essi venivano diluiti con substrato inerte in modo da ottenere rispettivamente un'attività specifica di 12 μC/mg e 8,3 μC/mg.

Il triperidolo è stato fornito dai *Research Laboratories* Dr. C. Janssen, Beerse (Belgio).

Metodi

Preparazione ed incubazione del tessuto. — Sono stati usati ratti Wistar allevati in questo Istituto, di peso compreso tra 150 e 200 g. Il metodo usato per la preparazione e per l'incubazione del tessuto con i substrati radioattivi è stato quello descritto in precedenti lavori (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955*a*; *b*; 1959).

Fettine del peso di circa 100 mg venivano messe nella vaschetta di Warburg contenente 1,0 ml di tampone di fosfato a pH 7,4 (ELLIOTT & HENDERSON, 1948), ma ad una concentrazione maggiore del 20 % in quanto, dopo

aver gassato per 5 min.' con O_2, venivano aggiunti dal braccio laterale 0,2 ml di una soluzione di triperidolo 1,2 mM in acido lattico 2,9 mM o di una soluzione di acido lattico 2,9 mM. Nel tampone era disciolto il glucosio o l'acido piruvico alla concentrazione finale dello 0,1 %. L'aggiunta dell'acido lattico alla concentrazione usata non provocava variazioni del pH del mezzo di incubazione e non aveva alcuna influenza sul metabolismo del glucosio e del piruvato.

In tutte le esperienze, fettine di cervello dello stesso ratto venivano incubate in assenza e in presenza del farmaco.

Trattamento del tessuto dopo incubazione e preparazione dei campioni per le misure di radioattività. — La preparazione dell'estratto del tessuto e la separazione dei metaboliti nell'estratto e nel mezzo di incubazione venivano eseguite come precedentemente descritto (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955 *a*; *b*; 1959). Per la separazione dell'acido lattico si eseguiva la cromatografia monodimensionale usando come solvente alcool butilico normale, acido acetico, acqua (40 : 11 : 25) nelle esperienze con glucosio e alcool butilico terziario, acido acetico, acqua (40 : 11 : 25) nelle esperienze con il piruvato.

La CO_2 veniva raccolta e precipitata come $BaCO_3$ nel modo precedentemente descritto (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955 *a*).

Misure radioattive. — La radioattività del ^{14}C presente nei radiocromagrammi su carta era determinata con l'apparecchiatura automatica precedentemente descritta (FRANK *et al.*, 1959) e quella presente nel $BaCO_3$ era misurata con un contatore Geiger a finestra di mica.

RISULTATI

La presenza del triperidolo nel mezzo di incubazione alla concentrazione 2×10^{-4}M non modifica qualitativamente il quadro metabolico del glucosio e del piruvato nelle fettine di corteccia cerebrale di ratto. Come già precedentemente dimostrato (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955 *b*; 1959) la radioattività scomparsa dal mezzo di incubazione si ritrova nell'acido aspartico, nell'acido glutammico, nell'acido γ ammino-butirrico, nell'acido lattico, nella CO_2 e, con glucosio come substrato, anche nella glutammina (CHAIN, *et al.*, 1960). Una mappa numerica di un tipico cromatogramma di un estratto di tessuto incubato per 1 ora con glucosio (U) ^{14}C in presenza e in assenza del triperidolo è mostrata nelle Figure 1 e 2. La cromatografia del mezzo di incubazione eseguita in maniera analoga a quella usata per l'analisi dell'estratto ha rivelato presenza di radioattività oltre che nel substrato non utilizzato, nell'acido lattico, nell'acido glutammico, nella glutammina e nella alanina.

Consumo di O_2 e produzione di CO_2. — L'effetto della concentrazione del triperidolo sul consumo di O_2 di fettine di corteccia cerebrale di ratto, incubate con glucosio per 1 ora è mostrato nella Tabella 1. Da essa appare chiaramente che il triperidolo inibisce il consumo di O_2; tale inibizione incomincia già a manifestarsi alla concentrazione di 10^{-6}M ed è di circa 40 %

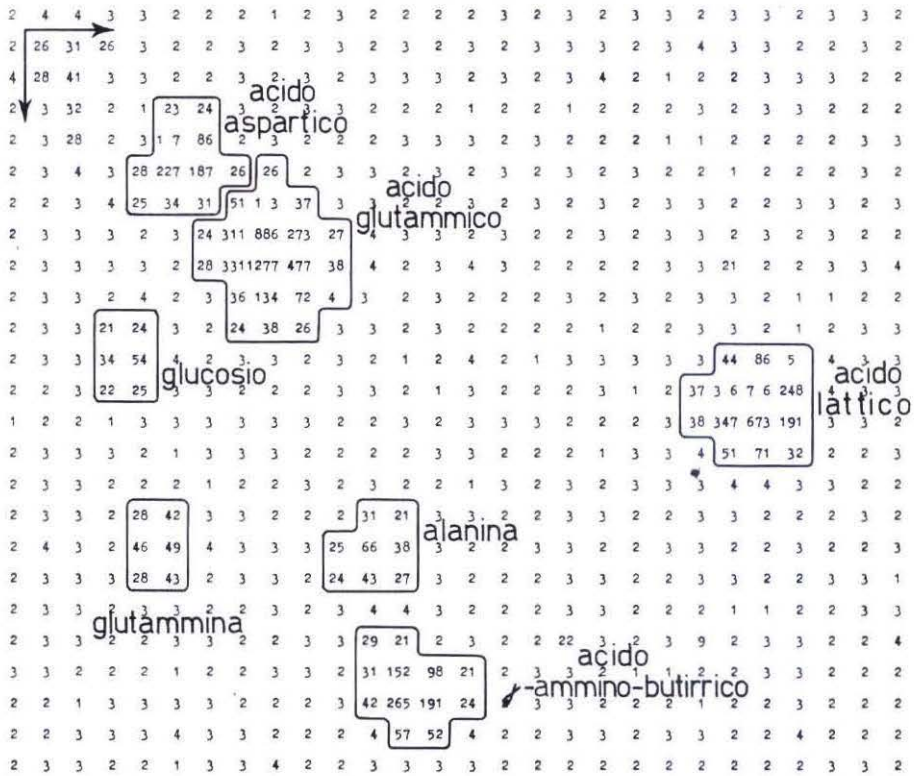


Fig. 1. — **Mappa numerica di radiocromatogramma bidimensionale su carta di estratto di fettine di corteccia cerebrale di ratto incubate con glucosio (U)—^{14}C in assenza di triperidolo.**

Solventi → alcool butilico secondario, acido formico 85 %, acqua, 75 : 15 : 10 :
↓ fenolo, acqua, idrato di ammonio d = 0.886, 80 : 20 : 1.

alla concentrazione 2×10^{-4}M. Dato che un ulteriore aumento nella concentrazione del triperidolo non influenza in modo significativo tale inibizione, è stata scelta la concentrazione 2×10^{-4}M per studiare l'effetto del farmaco sul quadro metabolico del glucosio e del piruvato.

Tale effetto inibitorio sul consumo di O_2 si osserva fin dall'inizio del periodo di incubazione ed è costante nel tempo (Fig. 3).

Come mostrato nella Tabella 2, il triperidolo inibisce anche il consumo di O_2 di fettine di corteccia cerebrale di ratto incubate con piruvato. Tale inibizione è del 30 % ed è simile a quella osservata con glucosio come substrato.

L'inibizione del consumo di O_2 si riflette sulla produzione di $^{14}CO_2$; infatti in presenza di triperidolo si è trovata una diminuzione del 44 % e del

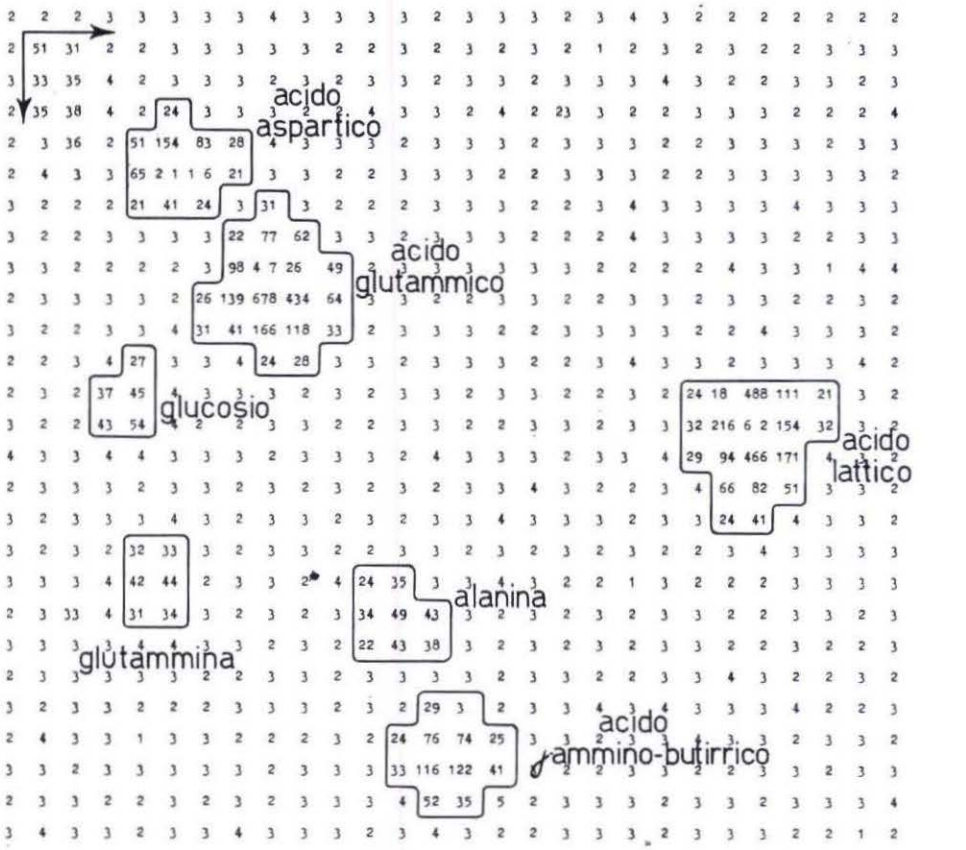


Fig. 2. — **Mappa numerica di radiocromatogramma bidimensionale su carta di estratto di fettine di corteccia cerebrale di ratto incubate con glucosio (U)—^{14}C in presenza di triperidolo.**

Solventi come in fig. 1.

31 % nella radioattività incorporata nella anidride carbonica rispettivamente da glucosio e da piruvato (Tabelle 3 e 4), in ottimo accordo con l'inibizione del consumo di O_2.

Utilizzazione dei substrati. — Per le ragioni ampliamente discusse in precedenti lavori (Beloff-Chain, *et al.*, 1955 *a*, *b*) l'utilizzazione del sub-

strato è stata calcolata come somma della radioattività ritrovata nei singoli metaboliti.

Dalla Tabella 2 risulta che dopo 1 ora di incubazione le fettine di corteccia cerebrale di ratto utilizzano 1007 μg di glucosio e 735 μg di piruvato, pari rispettivamente a 91 % e 61 % del substrato inizialmente presente.

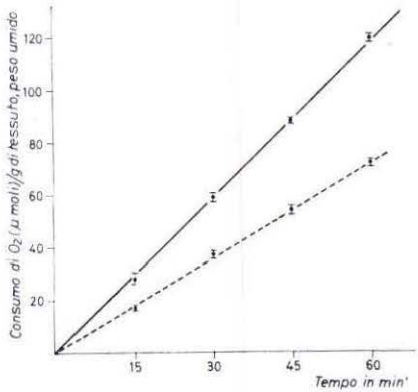


Fig. 3. — **Effetto del triperidolo sul consumo di O_2 da parte di fettine di corteccia cerebrale di ratto incubate con glucosio.**

Valori medi di 6 esperienze ± errore standard. Linea continua: senza triperidolo; linea tratteggiata: con triperidolo 2 x 10^{-4}M.

In presenza di triperidolo l'utilizzazione del glucosio viene ridotta a 814 μg e quella del piruvato a 597 μg e pertanto il farmaco inibisce l'utilizzazione di ambedue i substrati del 18 %.

TABELLA 1.

Effetto della concentrazione del triperiodo sul consumo di O_2 da parte di fettine di corteccia cerebrale di ratto incubate con glucosio

Triperidolo nel mezzo (moli/l)	N. esperienze	Consumo di O_2 (μmoli/g di tessuto peso umido/h)
0	15	119,9 ± 2,0
10^{-6}	3	112,7 ± 2,8
5×10^{-6}	3	107,7 ± 4,0
10^{-5}	5	95,5 ± 4,6
2×10^{-5}	3	85,1 ± 3,9
10^{-4}	2	75,6 ± 0,4
2×10^{-4}	6	72,0 ± 2,1
4×10^{-4}	2	68,2 ± 0,3

100 mg di fettine di corteccia cerebrale di ratto sono stati incubati in 1,2 ml di tampone di fosfato pH 7,4 a 37° in O_2. Concentrazione del glucosio 0,1 %. Valori medi ± errore standard.

Formazione di acido lattico e di ammino acidi. — La formazione di acido lattico da glucosio è circa 2,5 volte maggiore di quella da piruvato. Per entrambi i substrati il rapporto tra le radioattività ritrovate nel mezzo e quelle nell'estratto è circa 11. La formazione di acido glutammico da glucosio è risultata uguale a quella da piruvato; la formazione di alanina e di acido aspartico da piruvato è risultata circa 3 e 2,5 volte rispettivamente più grande di quella da glucosio, la glutammina si forma soltanto da glucosio e l'acido γ-amminobutirrico prodotto da piruvato è inferiore a quello ottenuto da glucosio. I rapporti tra la radioattività ritrovata nel mezzo e nell'estratto sono 0,17 e 0,08 per l'acido glutammico ottenuto rispettivamente da glucosio e da piruvato; 2,0 per l'alanina ottenuta da entrambi i substrati; 3,0 per la glutammina ottenuta da glucosio. L'acido aspartico e l'acido γ-amminobutirrico sono stati determinati, nelle condizioni sperimentali usate, soltanto nelle cromatografie degli estratti.

TABELLA 2.

Effetto del triperiodo sul consumo di O_2 e sull'utilizzazione del glucosio e dell'acido piruvico in fettine di corteccia cerebrale di ratto

Substrato	Radioattività per vaschetta (μC)	Consumo di O_2 (μmoli/g di tessuto, peso umido/h)		Utilizzazione del substrato (μg/100 mg di tessuto, peso umido/h)	
		senza triperidolo	con triperidolo (2×10^{-4}M)	senza triperidolo	con triperidolo (2×10^{-4}M)
Glucosio . . . . . (0,1%)	15	120,0 ± 4,9	72,0* ± 2,1	1007 ± 34	814* ± 31
Acido piruvico . . (0,1%)	10	111,9 ± 2,6	79,4* ± 2,7	735 ± 19	597* ± 20

Condizioni sperimentali come in Tabella 1. Valori medi di 6 esperienze ± errore standard.

* Differenza significativa : $p < 0,01$.

Il triperidolo non ha alcun effetto statisticamente significativo sulla produzione di acido lattico, di acido aspartico e di alanina sia da glucosio che da piruvato; non ha alcun effetto sulla formazione di glutammina da glucosio; inibisce invece in modo significativo la formazione di acido glutammico e di acido γ-amminobutirrico da entrambi i substrati (Tabelle 3 e 4).

TABELLA 3.

Effetto del triperidolo sul metabolismo del glucosio in fettine di corteccia cerebrale di ratto

Metaboliti	Glucosio metabolizzato (μg/100 mg di tessuto, peso umido/h)	
	senza triperidolo	con triperidolo (2×10^{-4}M)
Acido aspartico	10,9 ± 0,2	10,1 ± 1,0
Acido glutammico	84,8 ± 3,9	54,9* ± 1,7
Glutammina	11,5 ± 2,8	9,1 ± 0,8
Acido γ-amminobutirrico	14,3 ± 0,9	8,2* ± 0,7
Alanina	9,3 ± 1,0	10,1 ± 0,6
Acido lattico	647,9 ± 24,2	592,4 ± 29,0
CO_2	228,5 ± 15,4	129,6* ± 6,0

Condizioni sperimentali come in Tabella 1. Valori medi di 6 esperienze ± errore standard.

* Differenza significativa : $p < 0,01$.

TABELLA 4.

Effetto del triperidolo sul metabolismo dell'acido piruvico in fettine di corteccia cerebrale di ratto

Metaboliti	Acido piruvico metabolizzato (μg/100 mg di tessuto, peso umido/h)	
	senza triperidolo	con triperidolo (2×10^{-4}M)
Acido aspartico	26,4 ± 1,8	25,7 ± 1,2
Acido glutammico	79,6 ± 2,5	59,2* ± 3,3
Acido γ-amminobutirrico	9,4 ± 0,6	5,1* ± 0,7
Alanina	31,0 ± 0,4	29,0 ± 1,0
Acido lattico	252,0 ± 6,6	251,0 ± 8,6
CO_2	335,7 ± 19,7	230,3 ± 15,9

Condizioni sperimentali come in Tabella 1. Valori medi di 6 esperienze ± errore standard.

* Differenza significativa : $p < 0,01$.

È interessante a questo proposito far notare che la quantità di glucosio trasformato in acido glutammico che si ritrova nel mezzo di incubazione è μg 12,2 $\pm$ 1,8 in assenza di triperidolo e 11,4 $\pm$ 1,4 in sua presenza, mentre nell'estratto essa è 72,6 $\pm$ 4,6 e 43,5 $\pm$ 1,5 rispettivamente in assenza ed in presenza del triperidolo. Un comportamento analogo si osserva con il piruvato. Pertanto il triperidolo inibisce la formazione di acido glutammico presente nel tessuto mentre lascia inalterata quella nel mezzo.

DISCUSSIONE

Dai dati riportati nel presente lavoro risulta che il triperidolo alla concentrazione 2×10^{-4} M ha un netto effetto sul metabolismo intermedio del glucosio e del piruvato in fettine di corteccia cerebrale di ratto. Esso infatti riduce il consumo di ossigeno e l'incorporazione della radioattività di entrambi i substrati nella CO_2, nell'acido glutammico e nell'acido γ-amminobutirrico, mentre non influenza la formazione di acido lattico, di alanina e di acido aspartico.

L'effetto del triperidolo sulla diminuzione del consumo di ossigeno è simile a quello dell'aloperidolo trovato da Mc Ilwain (1964) in fettine di corteccia cerebrale di cavia stimolate con la corrente elettrica; il fatto che esso si manifesti fin dall'inizio del periodo di incubazione, rimanendo costante nel tempo (Fig. 1), mostra che sotto questo aspetto i butirrofenoni hanno un comportamento diverso da quello della cloropromazina. Infatti Lindan, Quastel & Syed (1957) in fettine di corteccia cerebrale di ratto hanno trovato che l'inibizione del consumo di ossigeno ad opera della cloropromazina incomincia a manifestarsi soltanto dopo la prima mezz'ora di incubazione.

Come conseguenza della inibizione del consumo di ossigeno dovrebbe risultare anche ridotta l'incorporazione della radioattività del piruvato negli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici e quindi negli ammino acidi con esso collegati, quali l'acido glutammico e l'acido aspartico. In accordo a ciò i dati ottenuti chiaramente indicano che il triperidolo riduce in modo notevole l'incorporazione della radioattività del glucosio e del piruvato nell'acido glutammico. Il fatto che invece rimanga invariata la radioattività incorporata nell'acido aspartico si potrebbe spiegare assumendo che la diminuita formazione di acido aspartico radioattivo venga bilanciata da una maggiore formazione causata da una più grande disponibilità di ossalacetato non utilizzato per la condensazione ad acido citrico per la diminuita quantità di acetil—Co A.

Questa però è soltanto un'ipotesi di lavoro; infatti non va dimenticato che il triperidolo non ha alcun effetto sulla incorporazione della radioattività nell'acido glutammico presente nel mezzo di incubazione. Ulteriori

ricerche sulla determinazione dell'attività specifica dei due amminoacidi potranno forse meglio chiarire questo punto.

Un altro importante effetto del triperidolo è la riduzione dell'incorporazione della radioattività sia del glucosio che del piruvato nell'acido γ-amminobutirrico: ciò potrebbe essere o una diretta conseguenza della diminuita incorporazione della radioattività nell'acido glutammico o una azione specifica del triperidolo (JANSSEN, 1965). Esperienze in corso con glutammato radioattivo come substrato permetteranno di accertare se la diminuita incorporazione della radioattività nell'acido γ-amminobutirrico sia dovuta o meno ad un effetto del triperidolo.

Gli autori desiderano esprimere il loro ringraziamento ai sigg. Gianfranco Bedetti e Gianfranco Tarsitani per l'apprezzata assistenza tecnica.

2 aprile 1966.

BIBLIOGRAFIA

BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI, F. POCCHIARI & C. ROSSI, 1955 *a*. *Proc. Roy. Soc. B*, **143**, 481.

BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI & F. POCCHIARI, 1955 *b*. *Proc. Roy. Soc. B*, **144**, 22.

BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI & F. POCCHIARI, 1959. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **2**, 122.

BRADLEY, P. B., 1963 In *Physiological Pharmacology*, W. S. ROOT & F. G. HOFMANN, Eds., vol. I, p. 417.

CARLSSON, A., & M. LINQUIST, 1963. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 140.

CHAIN, E. B., M. CHIOZZOTTO, F. POCCHIARI, C. ROSSI & R. SANDMAN, 1960. *Proc. Roy. Soc. B*, **152**, 290.

ELLIOTT, K. A. C. & N. HENDERSON, 1948. *J. Neurophysiol.*, **11**, 473.

FRANK, M., E. B. CHAIN, F. POCCHIARI & C. ROSSI, 1959. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **2**, 75.

GATTI, G. L., 1965. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **41**, estratto 83.

GATTI, G. L. 1966. *Excerpta Med.*, in corso di stampa.

GUTH, P. S. & M. A. SPIRTES, 1964. *Intern. Rev. Neurobiol.* **7**, 231.

JANSSEN, P. A. J., 1965. *Neuro-Psychopharmacology* **4**, 151.

LINDAN, O., J. H. QUASTEL & S. SVED, 1957. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **35**, 1135.

MCILWAIN, H., 1964. *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 523.

RICHTER, D., 1961. *Neuro-Psychopharmacology*, **2**, 422.

SCHENKER E. & H. HERBST, 1963. *Fortschr. Arzneimittelforsch.* **5**, 269.

SOEP, H. & P. A. J. JANSSEN, 1961. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 81.

Metabolismo del glucosio nella ghiandola sottomascellare di ratto *in vitro*. Effetto dell'insulina

INES MASI, FRANCESCO POCCHIARI e TERESA SZYMCZYK (*)

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — Il metabolismo del glucosio nella ghiandola sottomascellare di ratto è stato studiato *in vitro*, usando come substrato glucosio-U-^{14}C. È stato messo in evidenza che dopo 1 h di incubazione la radioattività è incorporata in CO_2, acido lattico ed ammino acidi, e in prodotti di sintesi quali oligosaccaridi e mucoproteina. La mucoproteina, identificata come tale in seguito al risultato di analisi cromatografiche di idrolizzati del prodotto parzialmente purificato mediante dialisi, è risultata marcata sia nella parte prostetica che in quella proteica. L'insulina stimola l'incorporazione della radioattività del glucosio nella mucoproteina mentre non ha alcun effetto sulla formazione degli altri metaboliti.

Summary. (*Glucose metabolism in rat submaxillary gland* in vitro. *Effect of insulin*). — The fate of uniformly labelled ^{14}C glucose in the rat submaxillary gland was studied *in vitro* by a quantitative application of the radio paperchromatographic technique. After 1 h of incubation of tissue slices in O_2 at 37°C at pH 7,4 in Krebs-Henseleit phosphate medium containing 0,1 % and 10 μc of glucose-U-^{14}C, about one third of the radioactivity of the initial substrate was incorporated into CO_2, lactate, malate, alanine, glutamate, aspartate, serine, glycine, maltose, maltotriose and a substance which is presumably a mucoprotein, since, after acid hydrolysis of this substance, the radioactivity was recovered as sialic acid, hexosamine, hexose and amino acids. Some radioactivity was also incorporated into the insoluble residue of the tissue after extraction. In the presence of insulin, the synthesis of mucoprotein was significantly stimulated, whereas the production of oligosaccharides as well as the incorporation of the radioactivity in the other compounds was not affected.

(*) Ospite dei Laboratori di Chimica Biologica. Attuale indirizzo: Zaklad Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Warszawa (Polonia).

È ben noto già da alcuni anni che nella ghiandola sottomascellare di vari animali è contenuta una mucoproteina, il cui gruppo prostetico è essenzialmente formato da quantità equimolecolari di acido sialico e di N-acetil-galattosammina e da quantità minori da glucosammina, galattosio e fucosio (Blix, 1936; Odin, 1958; Gottschalk & Graham, 1959; Graham & Gottschalk, 1960; Tsuiki, Hashimoto & Pigman, 1961).

Più recentemente inoltre, Eichberg & Karnovski (1963), incubando fettine di ghiandola sottomascellare di ovino con glucosio marcato ^{14}C in differenti posizioni, hanno mostrato che la radioattività del glucosio è incorporata nella molecola di acido N-acetil-neurammico (NAN) libero, confermando così che anche in tale tessuto la via metabolica per la biosintesi del NAN da glucosio è simile a quella messa in evidenza da Roseman (1959; 1962 *a*) in sistemi liberi da cellule. Quest'ultimo autore ha trovato che nella ghiandola sottomascellare di suino esiste un enzima capace, in presenza di citidina-trifosfato, di convertire il NAN libero in acido citidin-5′-monofosfo-N-acetil-neurammico (CMP-5′-NAN) (Roseman, 1962*b*) e successivamente che in quella di pecora esiste una sialiltransferasi (Roseman, 1964) capace di aggiungere acido sialico dal CMP-5′-NAN ad una mucina trattata con neuraminidasi, ed ha pertanto suggerito che il trasferimento del NAN al polimero rappresenti presumibilmente l'ultimo gradino nella biosintesi della mucoproteina (Roseman, 1964).

È sembrato pertanto interessante iniziare delle ricerche allo scopo di vedere se nella ghiandola sottomascellare di ratto il glucosio venisse incorporato nella mucoproteina e soprattutto se l'insulina avesse un effetto sulla sintesi della mucoproteina. Ciò è stato fatto anche in considerazione di quanto riportato da Schiller & Dorfman (1957) i quali, sulla base di risultati ottenuti in esperienze *in vivo*, avevano suggerito la partecipazione dell'insulina nel metabolismo dei mucopolisaccaridi acidi e da Sandhu, Gessert & Mc Intyre (1964) i quali avevano mostrato che in fettine di ghiandola sottomascellare di ratto l'insulina stimolava in modo notevole l'utilizzazione del glucosio.

PARTE SPERIMENTALE

Materiali.

Il glucosio uniformemente marcato ^{14}C è stato ottenuto dal *Radiochemical Centre, Amersham* (Gran Bretagna) ed è stato utilizzato dopo diluizione con glucosio non radioattivo in modo da avere una attività specifica di 16,6 μc/mg.

L'insulina esente da glucagone è stata ottenuta dai Lilly Laboratories, Indianapolis (U.S.A.).

Metodi.

Preparazione ed incubazione del tessuto. — Ratti Wistar maschi allevati in questo Istituto, di peso compreso fra 120 e 180 g, erano uccisi mediante un colpo alla nuca; da essi la ghiandola sottomascellare veniva rapidamente rimossa, ed i due lobi separati. Da ciascun lobo, lavato in soluzione di NaCl 0,9 % raffreddata in ghiaccio e poi asciugato su carta da filtro, veniva prelevata una fettina di spessore 0,5 mm circa, usando l'affettatore di Stadie-Riggs. La fettina corrispondente a 50 mg circa di tessuto veniva posta in una vaschetta di Warburg raffreddata in ghiaccio contenente 0,6 ml di tampone di fosfato a pH 7,4 preparato secondo KREBS & HENSELEIT (1932) in cui erano sciolti il glucosio-U-^{14}C alla concentrazione dello 0,1 % e, quando presente, l'insulina alla concentrazione di 0,1 U.I./ml. L'incubazione del tessuto veniva eseguita a 37°C in O_2 per 60 min' usando l'apparecchio di Warburg; al termine del periodo di incubazione il contenuto delle vaschette veniva rapidamente raffreddato immergendo queste ultime in ghiaccio.

L'effetto dell'insulina è stato misurato incubando le due fettine corrispondenti a due lobi di una stessa ghiandola una in assenza ed una in presenza dell'ormone.

Trattamento del tessuto dopo incubazione. — Dopo incubazione il tessuto veniva lavato, omogeneizzato ed estratto come precedentemente descritto (BELOFF-CHAIN *et al*, 1955*a*). L'estratto così ottenuto era portato a secco sotto vuoto a 25-30°C usando l'evaporatore *Rotary Evapo-Mix* della Buchler Instr., New York (U.S.A.), disciolto in 0,5 ml di H_2O e infine centrifugato

Separazione e determinazione dei metaboliti radioattivi. — La separazione dei metaboliti era eseguita su appropriate aliquote di mezzo di incubazione e di estratto del tessuto, mediante cromatografia discendente su carta Whatman n. 1:

— per la separazione dell'acido lattico il solvente era costituito da alcool butilico normale-acido acetico-acqua (40:11:25); il cromatogramma, appena tolto dal solvente, era immerso in atmosfera di ammoniaca per fissare l'acido lattico come sale ed eliminare quindi le perdite per evaporazione;

— per la separazione del glucosio dagli oligo- e poli-saccaridi il solvente era costituito da alcool butilico terziario: acqua (80:20) in cui erano disciolti 2 g di acido picrico;

— per la separazione degli ammino acidi, che era eseguita in due direzioni, il primo solvente era costituito da alcool butilico secondario: acido formico 85 %: acqua (75:15:10) ed il secondo solvente era costituito da fenolo: acqua: idrato di ammonio d = 0,886 (80:20:1). La quantità di radioattività presente nei cromatogrammi su carta era determinata con l'apparecchiatura automatica precedentemente descritta (FRANK *et al*, 1959).

Il residuo dell'estrazione, dopo un ulteriore lavaggio con 10 ml di H_2O, veniva trasferito quantitativamente in scodellino di alluminio, asciugato

con raggi infrarossi e misurato per il contenuto in ^{14}C con un contatore Geiger a finestra di mica.

La CO_2 veniva raccolta e precipitata come $BaCO_3$ nel modo precedentemente descritto (BELOFF-CHAIN *et al.* 1955*a*) e la radioattività del ^{14}C presente nel $BaCO_3$ era misurata con un contatore di Geiger a finestra di mica.

RISULTATI

Nella Fig. 1 è mostrata la autoradiografia di un cromatogramma su carta tipico dell'estratto di ghiandola sottomascellare di ratto dalla quale

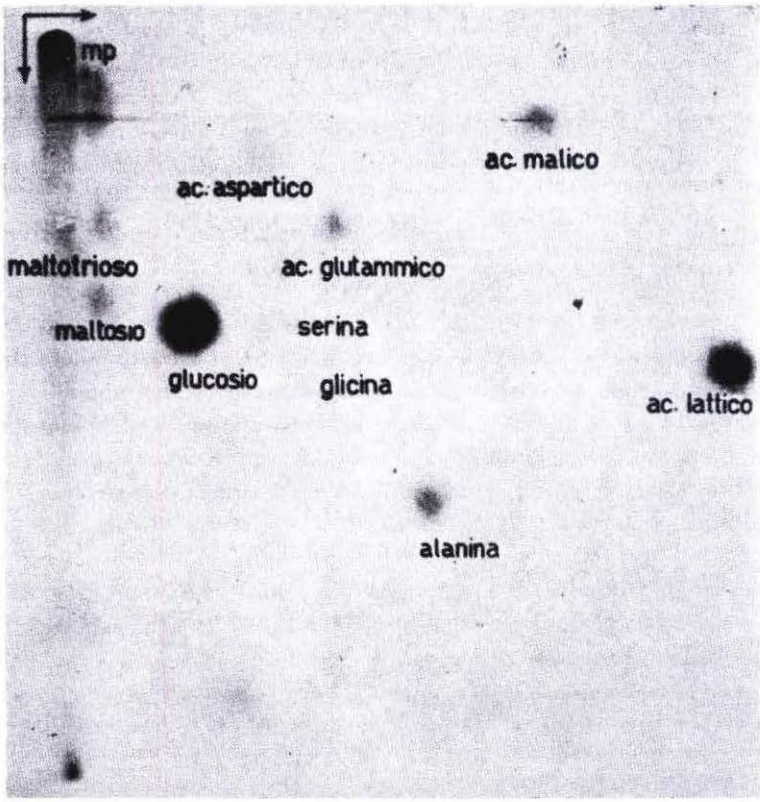


Fig. 1. — Autoradiografia di un cromatogramma bidimensionale dell'estratto di ghiandola sottomascellare di ratto dopo incubazione per 1 h con glucosio–U-^{14}C. (Solventi alcool butilico secondario: acido formico: acqua (75:15:10); fenolo: acqua: NH_4OH (80:20:1).

appare che dopo incubazione la radioattività del glucosio è incorporata in una zona avente in entrambi i solventi Rf = 0, indicata con mp, negli oligosaccaridi maltosio e maltotrioso, negli amminoacidi aspartico, glutammico,

serina, glicina ed alanina, negli acidi malico e lattico ed in piccole quantità anche in altri composti non identificati.

L'estratto è stato inoltre sottoposto a dialisi in tubo di cellulosa della Visking Corp., Chicago (U.S.A.) contro acqua per 12 ore a 4° C. In seguito a tale trattamento è stato possibile isolare la sostanza mp in quanto, a differenza di tutti gli altri metaboliti radioattivi, non dializzava.

La sostanza così parzialmente purificata presentava le seguenti caratteristiche:

1) dopo idrolisi con HCl 0,1 N per 1 h a 80 °C e successiva dialisi contro acqua come sopra indicato, parte della radioattività si ritrovava nel dializzato. Quest'ultimo era pertanto portato a secco sotto vuoto per allontanare l'acido cloridrico, ripreso con acqua e cromatografato in alcool butilico normale: piridina: acqua (6:4:3); la radioattività si ritrovava in una zona corrispondente agli acidi sialici.

2) la parte non dializzabile dopo idrolisi con HCl 0,1N come indicato al punto 1 era nuovamente sottoposta ad idrolisi con HCl 2N per 18 h a 110 °C. Dopo tale trattamento la soluzione veniva evaporata sotto vuoto per allontanare l'acido cloridrico ed il residuo ottenuto era sciolto in acqua e cromatografato in due dimensioni usando come primo solvente alcool butilico secondario : acido formico 85 % : acqua (75 : 15 : 10) e come secondo solvente fenolo : acqua : idrato di ammonio d = 0.886 (80 : 20 : 1). La radioattività si ritrovava nell'acido aspartico, nell'acido glutammico, nella serina, nell'alanina nella zona delle esosoammine, ed in quella degli esosi.

Dai risultati ottenuti si ritiene di poter identificare la sostanza mp come una mucoproteina.

Gli altri metaboliti sono stati identificati come descritto in precedenti lavori (BELOFF-CHAIN *et al.* 1955*a*; 1955*b*; 1959).

Le radiocromatografie del mezzo di incubazione hanno rivelato presenza di radioattività, oltre che nel substrato non utilizzato, anche nell'acido lattico e nell'alanina.

Il consumo di ossigeno dopo 1 h di incubazione in presenza di glucosio, in accordo con quanto trovato da GOLDMAN *et al.* (1964), è 73 ± 4 μmoli/g di tessuto, peso umido, e non differisce significativamente dal valore ottenuto incubando il tessuto in assenza di substrato; ciò è stato osservato anche per le concentrazioni di glucosio 0,2 e 0,5 %.

La produzione di $^{14}CO_2$ dopo un'ora di incubazione in presenza di glucosio, calcolata dai dati riportati in Tab. 1, è 19 μmoli/g di tessuto peso umido/h e ciò indica che il glucosio, pur non stimolando il consumo di ossigeno, sostituisce per il 26 % il materiale endogeno che è normalmente ossidato quando il tessuto è incubato senza substrato nelle stesse condizioni sperimentali.

Il glucosio utilizzato dal tessuto in 1 h di incubazione è di 216 ± 26 μg e l'85 % circa di esso risulta incorporato nei vari metaboliti come indicato nella Tab. 1, con la seguente ripartizione: il 12,7 % nei prodotti di sintesi (mucoproteina e oligosaccaridi) e nel residuo insolubile, il 13,1 % negli amminoacidi, il 47,2 % nell'acido lattico ed il 16,0 % nella CO_2.

TABELLA 1.

Metabolismo del glucosio nella ghiandola sottomascellare di ratto

Prodotti di trasformazione del glucosio	Glucosio trasformato * (μg/50 mg/h)
CO_2	29,0 ± 1,2
Acido lattico	85,6 ± 7,3
Acido malico	0,8 ± 0,1
Alanina	20,7 ± 3,9
Acido glutammico	2,1 ± 0,2
Acido aspartico	0,9 ± 0,1
Glucosio	19,0 ± 1,6 **
Oligosaccaridi	2,6 ± 0,4
Mucoproteina	15,4 ± 1,5
Residuo insolubile	5,3 ± 0,7
TOTALE	181,4 ± 13,7

* Risultati espressi in μg di glucosio trasformato (*o rimasto inalterato nel tessuto*) per 50 mg di ghiandola, peso umido, dopo 1 h di incubazione a 37°C in O_2 in 0,6 ml di tampone di fosfato a pH 7,4 contenente 0,1 % e 10 μc di glucosio-U-^{14}C. Valori medi di 6 ratti ± errore standard.

** Contiene piccole quantità di esosofosfati.

Ad eccezione dell'acido lattico e dell'alanina, che erano presenti anche nel mezzo in quantità rispettivamente 4,8 ± 1,2 e 3,5 ± 1,2 maggiori che nell'estratto, tutti gli altri metaboliti erano presenti in quantità misurabili soltanto nelle cromatografie degli estratti. La glicina e la serina contenevano radioattività a un livello troppo basso per una misura quantitativa.

Effetto dell'insulina. — Il quadro metabolico del glucosio in presenza di insulina subisce variazioni dal punto di vista quantitativo, mentre qualitativamente rimane inalterato. In particolare, l'insulina stimola la sintesi della mucoproteina, mentre non ha alcun effetto sulla formazione degli oligosaccaridi, sulla produzione di acido lattico, sulla quantità di glucosio presente nel tessuto alla fine dell'incubazione e, in accordo con quanto riportato da SANDHU, GESSERT & MC INTYRE (1964), sul consumo di O_2 e sulla produzione di CO_2 (Tab. 2).

TABELLA 2.

Effetto dell'insulina sul metabolismo del glucosio nella ghiandola sottomascellare di ratto

Esperimento (N.)	PRODOTTI DI TRASFORMAZIONE DEL GLUCOSIO* (Glucosio trasformato: µg/50 mg di tessuto, peso umido/h)										CONSUMO DI O_2 (µmoli/g di tessuto, peso umido/h)	
	Mucoproteina		Oligosaccaridi		Glucosio		Acido lattico		CO_2			
	senza insulina	con insulina	senza insulina	con insulina	senza insulina	con insulina	senza insulina	con insulina	senza insulina	con insulina	senza insulina	con insulina
1	21,6	19,7	2,8	2,7	19,4	11,7	100,2	91,1	—	—	76	55
	17,7	19,8	1,6	2,8	15,6	18,0	112,8	104,0	32,4	37,4	70	69
2	19,6	23,4	4,9	3,5	13,9	9,2	94,3	131,4	—	—	60	68
	20,6	32,0	5,1	3,5	14,3	12,3	86,7	95,6	—	—	61	68
	16,3	30,3	3,3	4,6	9,9	12,4	96,5	91,3	—	—	57	91
3	12,0	10,0	2,4	1,9	14,1	12,2	98,5	106,6	14,0	28,5	52	68
	12,5	16,2	2,0	3,8	8,1	9,3	116,4	74,0	18,2	41,7	50	91
4	21,6	39,3	5,9	7,1	16,0	19,5	98,0	87,8	33,1	52,1	61	80
	25,2	37,1	6,8	6,5	17,5	18,0	93,0	79,9	35,9	57,9	70	85
5	7,7	11,5	2,7	2,5	9,2	10,8	66,9	93,2	23,1	25,7	75	86
	14,8	8,8	2,5	2,4	8,0	9,0	102,2	89,0	39,8	32,0	97	84
6	12,2	26,8	4,5	6,2	11,5	11,8	58,3	69,2	34,2	26,3	57	63
	17,5	26,0	6,2	5,8	13,1	15,7	66,8	68,1	36,2	32,0	59	77
7	13,3	14,4	3,3	3,3	15,2	14,2	85,5	96,9	34,2	26,3	108	76
	31,7	33,1	4,7	3,9	15,9	10,9	53,5	82,8	36,0	32,0	106	90
	11,0	10,0	2,8	2,3	10,8	5,1	50,1	46,3	21,4	31,8	—	—
media . .	17,2	22,4	3,8	3,9	13,2	12,5	86,2	88,0	29,9	35,3	70	76
± e. s. .	± 1,5	± 2,5	± 0,4	± 0,4	± 0,9	± 1,0	± 5,2	± 4,8	± 2,5	± 3,0	± 5	± 3

* Condizioni sperimentali come in Tab. 1; insulina, quando presente, 0,1 U. I./ml.

L'influenza dell'insulina è sempre stata studiata incubando due fettine di ghiandola dello stesso ratto in presenza ed in assenza dell'ormone. Dalla elaborazione statistica dei dati eseguita applicando il « t » test di Student per differenze a coppie è risultato che l'effetto dell'insulina sull'aumento della sintesi della mucoproteina pur essendo nullo in vari ratti è statisticamente significativo.

DISCUSSIONE

I risultati riportati in questo lavoro mostrano innanzitutto che il glucosio è attivamente metabolizzato dalla ghiandola sottomascellare di ratto: infatti dopo 1 h di incubazione ne veniva utilizzato circa un terzo della quantità inizialmente presente e la radioattività si ritrovava incorporata nella CO_2, nell'acido lattico, negli ammino acidi alanina, acido glutammico, acido aspartico, serina e glicina sia liberi che legati, negli oligosaccaridi maltosio e maltotrioso e infine negli acidi sialici e nelle esosammine, contenuti entrambi nella mucoproteina.

La formazione della CO_2 e dell'acido lattico è in accordo con quanto precedentemente trovato da GOLDMAN *et al.* (1964) e da SANDHU, GESSERT & MC INTYRE (1964) mentre il dato concernente la radioattività ritrovata nella mucoproteina conferma ed estende i risultati di EICHBERG & KARNOVSKY (1963) e dimostra che il tessuto dispone dei meccanismi necessari per sintetizzare da glucosio sia la parte proteica che quella prostetica della mucoproteina. La presenza di radioattività incorporata negli oligosaccaridi sta ad indicare che nella ghiandola sottomascellare di ratto il glucosio viene anche presumibilmente metabolizzato a glicogeno (CATANZARO *et al.*, 1966); quest'ultimo potrebbe essere contenuto in tracce nella zona indicata con mp nel cromatogramma dell'estratto (Fig. 1) ed in maggiori quantità nel residuo insolubile.

L'insulina, aggiunta al mezzo di incubazione, stimola notevolmente la sintesi della mucoproteina, anche se in alcune esperienze tale effetto non si manifesta affatto; la variabilità dei dati ottenuti, che non trova al momento una plausibile spiegazione, non pregiudica però il significato del risultato che forse mette in evidenza un nuovo effetto dell'insulina. Dato infatti che la radioattività del glucosio incorporata nella mucoproteina si ritrova sia nel gruppo prostetico che nella parte proteica e che tale sostanza potrebbe essere impura da proteina (TSUIKI, HASHIMOTO & PIGMAN, 1961) un ulteriore studio è necessario prima di poter trarre delle chiare indicazioni su quale sia il componente sensibile all'azione dell'insulina.

È interessante notare che nella ghiandola sottomascellare di ratto l'insulina, che pur manifesta la sua azione stimolando la sintesi della mucoproteina, non mostra alcun effetto nella incorporazione della radioattività nel glucosio negli oligosaccaridi, a differenza di quanto avviene nel muscolo diaframma (BELOFF-CHAIN *et. al.*, 1955*a*) e nel tessuto adiposo bruno di ratto

(BELOFF-CHAIN *et al.*, 1956). La via metabolica per la biosintesi della parte prostetica della mucoproteina da glucosio implica la formazione di glucosio -6-fosfato (ROSEMAN, 1962); pertanto l'aver trovato nello stesso tessuto l'effetto dell'insulina sulla incorporazione della radioattività del glucosio nella mucoproteina e non negli oligosaccaridi non è facilmente spiegabile con le attuali conoscenze sui meccanismi di sintesi di tali sostanze in quanto, secondo gli schemi noti, anche la biosintesi degli oligosaccaridi comporta la formazione di glucosio-6-fosfato come precursore. È interessante a questo riguardo ricordare che BELOFF-CHAIN *et al.* (1964), sulla base di dati sperimentali ottenuti incubando il diaframma di ratto con glucosio-6-fosfato, avevano suggerito che tale sostanza non fosse un intermedio nella sintesi di glicogeno da glucosio.

Gli autori desiderano esprimere il loro ringraziamento ai Signori Gianfranco Bedetti e Franco Gramenzi per l'apprezzata assistenza tecnica.

4 aprile 1966

BIBLIOGRAFIA

BELOFF-CHAIN, A., P. BETTO, R. CATANZARO, E. B. CHAIN, L. LONGINOTTI, I. MASI & F. POCCHIARI, 1964. *Biochem. J.*, **91**, 620.

BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI, F. POCCHIARI & C. ROSSI, 1955*a*. *Proc. Roy. Soc. B* **143**, 481.

BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI, & F. POCCHIARI, 1955*b* *Proc. Roy. Soc. B*, **144**, 22.

BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI & F. POCCHIARI, 1956. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **1**, 345.

BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI & F. POCCHIARI, 1959. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **2**, 122.

BLIX, G., 1936. *Z. Physiol Chem.*, **240**, 43.

CATANZARO, R., L. LONGINOTTI, I. MASI & F. POCCHIARI, 1966. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **2**, 408.

EICHEBERG, J. Jr. & M. L. KARNOVSKY, 1963. *J. Biol. Chem.*, **238**, 3827.

FRANK, M., E. B. CHAIN, F. POCCHIARI & C. ROSSI, 1959. *Selected Sci. Papers Ist. Superiore Sanità* **2**, 75.

GOLDMAN, J., F. ROSALES, M. VILLAVICENCIO & R. L. GUERRA, 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 303.

GOTTSCHALK, A. & E. R. B. GRAHAM, 1959. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 380.

GRAHAM, E. R. B. & A. GOTTSCHALK, 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 513.

KREBS, H. A. & K. HENSELEIT, 1932. *Z. Physiol Chem.*, **210**, 33.

ODIN, L., 1958. *Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, p. 234.

ROSEMAN, S., 1959. *Ann. Rev. Biochem.*, **28**, 545.

ROSEMAN, S., 1962*a*. *Fed. Proc.*, **21**, 1075.

ROSEMAN, S., 1962*b*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **48**, 437.

ROSEMAN, S., 1964. *VI Intern. Congr. Biochem.*, New York. Abstr. **6**, 467.

SANDHU, R. S., C. F. GESSERT & A. R. MCINTYRE, 1964. *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 1100.

SCHILLER, S. & A. DORFMAN, 1957. *J. Biol. Chem.*, **227**, 625.

TSUIKI, S., Y. HASHIMOTO & W. PIGMAN, 1961. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2172.

Gluconeogenesi renale. II - Effetto del glucosio sul metabolismo dell'acido piruvico in fettine di corteccia renale di coniglio

MARIA ANTONIETTA BUSELLU e FRANCESCO POCCHIARI

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — Si è studiato il destino del piruvato nelle fettine di corteccia renale di coniglio e si è trovato che la radioattività presente negli atomi di carbonio 1 o 3 del piruvato veniva incorporata nella CO_2, nell'acido lattico, nell'alanina, nell'acido glutammico, nella glutammina, nel glucosio e, in tracce, nel glicogeno.

Nel tampone di bicarbonato la formazione di glucosio, glutammato e glutammina era di gran lunga superiore a quella trovata nel tampone di fosfato, mentre quella di acido lattico ed alanina non risentiva della composizione ionica del mezzo di incubazione. Il glucosio non radioattivo aggiunto al mezzo di incubazione non aveva alcun effetto sul metabolismo del piruvato quando il tessuto era incubato nel tampone di bicarbonato; in tampone di fosfato invece esso stimolava la produzione di lattato e di glucosio da piruvato.

Summary. (*Renal gluconeogenesis. II. The effect of glucose on pyruvate metabolism in rabbit kidney cortex slices*). — The fate of pyruvate-1-^{14}C and -3-^{14}C in rabbit kidney cortex slices was followed by a quantitative application of a chromatographic technique, in the presence and absence of non-radioactive glucose. The radioactivity of carbon atoms 1 and 3 of pyruvate, which disappeared from the medium after 60 mins. of incubation of the tissue in a phosphate or bicarbonate buffer, was accounted for as CO_2, lactate, alanine, glutamate, glutamine, glucose and, in traces, glycogen (Fig. 1).

It was found that the amount of $^{14}CO_2$ from pyruvate-1-^{14}C was about three times higher than that from pyruvate-3-^{14}C; the radioactive glucose formed from pyruvate-1-^{14}C was one third of that from pyruvate-3-^{14}C, while the radioactive glutamate from pyruvate-1-^{14}C was much lower than that from pyruvate-3-^{14}C (Table 1).

In the bicarbonate buffer, glucose, glutamate and glutamine were formed from pyruvate to a much higher degree than in phosphate buffer;

the formation of lactate and alanine was not affected by the ionic composition of the incubation medium. The presence of non-radioactive glucose as co-substrate has no effect on pyruvate metabolism when the kidney cortex slices were incubated in the bicarbonate medium, whereas in the phosphate medium glucose increased the conversion of pyruvate into glucose and lactate.

Era stato in precedenza dimostrato in questo Laboratorio che il glucosio stimola la gluconeogenesi da glutammato in fettine di corteccia renale di coniglio e che tale stimolo avviene sia in presenza che in assenza di ioni calcio (BUSELLU & POCCHIARI, 1965).

Allo scopo di avere maggiori dati per poter chiarire in che modo e in quale stadio della gluconeogenesi agisca il glucosio, sono state eseguite ricerche usando come substrato piruvato marcato ^{14}C in differenti atomi di carbonio.

La tecnica di radiocromatografia quantitativa su carta adoperata per tale scopo ha anche permesso di ampliare la conoscenza sul metabolismo del piruvato in fettine di corteccia renale di coniglio, già studiato in precedenza da LEE, VERNON & CAHILL (1962).

PARTE SPERIMENTALE

Prodotti. — Piruvato sodico marcato ^{14}C nell'atomo di carbonio 1 o 3 ad attività specifica media di 29 $\mu C/\mu mole$ è stato ottenuto dal *Radiochemical Centre, Amersham* (Gran Bretagna). Esso è stato diluito con piruvato potassico non radioattivo fino ad avere un'attività specifica di 0,29 $\mu C/\mu mole$ di substrato; in tal modo la quantità di piruvato sodico era trascurabile rispetto a quella del piruvato potassico.

Preparazione ed incubazione del tessuto. — Sono stati usati conigli adulti nutriti *ad libitum* essenzialmente con crusca ed avena fino a due ore prima dell'esperimento. La tecnica di prelievo e di preparazione del tessuto è stata uguale a quella precedentemente descritta (BUSELLU & POCCHIARI, 1965). 200 mg circa di corteccia renale sono stati incubati in 3 ml di tampone di fosfato preparato secondo ELLIOTT & HENDERSON (1948) o di tampone di bicarbonato preparato secondo KREBS & HENSELEIT (1932) per 1 h a 37° usando come fase gassosa rispettivamente O_2 o O_2+CO_2 (95:5). La concentrazione del piruvato era 11,2 mM: quella del glucosio, quando presente, era 5,5 mM.

Trattamento del tessuto dopo incubazione, preparazione dei campioni e misura della radioattività. — Sono stati usati i metodi precedentemente descritti (BUSELLU & POCCHIARI, 1965) per la preparazione dell'estratto

del tessuto per la cromatografia su carta di aliquote dell'estratto e dei mezzi di incubazione, nonchè per la determinazione della radioattività presente nella CO_2 e negli altri metaboliti.

Inoltre per la determinazione dell'acido lattico, campioni degli estratti e dei mezzi sono stati cromatografati in alcool butilico normale: acido acetico: acqua (40:11:25).

RISULTATI

Consumo di O_2 e produzione di $^{14}CO_2$.

Il consumo di O_2 e la formazione di $^{14}CO_2$ sono stati misurati soltanto quando il tessuto è stato incubato nel tampone di fosfato.

In tali condizioni sperimentali il consumo di O_2 è risultato uguale a 106 ± 10 μmoli/g di tessuto peso umido/h e la produzione di CO_2 da piruvato 1-^{14}C e da piruvato 3-^{14}C rispettivamente 748.000 ± 14.000 e 265.000 ± 9.000 colpi per minuto per 200 mg di tessuto peso umido, riferiti a 3×10^6 colpi per minuto inizialmente presenti nel mezzo di incubazione. Come chiaramente appare da questi risultati la radioattività incorporata nella CO_2 da piruvato 1-^{14}C è circa 3 volte quella che proviene dal piruvato 3-^{14}C.

Quadro metabolico del piruvato.

Il quadro metabolico del piruvato nella corteccia renale di coniglio non risente della composizione ionica del mezzo di incubazione. I principali metaboliti presenti nell'estratto del tessuto sono: acido lattico, acido glutammico, glutammina, alanina, glucosio e, in tracce, glicogeno (Fig. 1). Gli stessi metaboliti, ad eccezione del glicogeno, si ritrovano nelle cromatografie del mezzo di incubazione.

La riduzione dell'acido piruvico ad acido lattico e la transaminazione ad alanina non sono influenzate dalla composizione ionica del mezzo di incubazione. Le quantità di acido lattico e di alanina radioattivi formati rappresentano rispettivamente il 27 % ed il 4 % del piruvato iniziale. I rapporti tra la radioattività ritrovata nel mezzo e quella nell'estratto sono stati $17,7 \pm 0,5$ per l'acido lattico e $29,0 \pm 0,3$ per l'alanina, il che indica che ambedue queste sostanze diffondono per la maggior parte nel mezzo di incubazione.

La formazione di acido glutammico e di glutammina da piruvato risente invece della composizione ionica del mezzo di incubazione: infatti la quantità di tali sostanze nel tampone di bicarbonato è circa doppia di quella che si osserva nel tampone di fosfato (Tab. 1). Questo effetto è evidente quando il piruvato è marcato ^{14}C in posizione 3; con il piruvato marcato

^{14}C in posizione 1, è difficile trarre delle conclusioni in quanto, in tali condizioni, la formazione di acido glutammico radioattivo è molto piccola.

È interessante far notare che anche la radioattività presente nel carbonio 1 del piruvato viene incorporata nell'acido glutammico, segno evidente della carbossilazione del piruvato e della successiva utilizzazione dell'ossalacetato attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici. L'acido glutammico radioattivo ottenuto incubando il tessuto con piruvato-3-^{14}C è distribuito nel mezzo e nell'estratto con un rapporto medio 1,3 $\pm$ 0,1, mentre la glutammina è stata ritrovata quasi esclusivamente nel mezzo di incubazione.

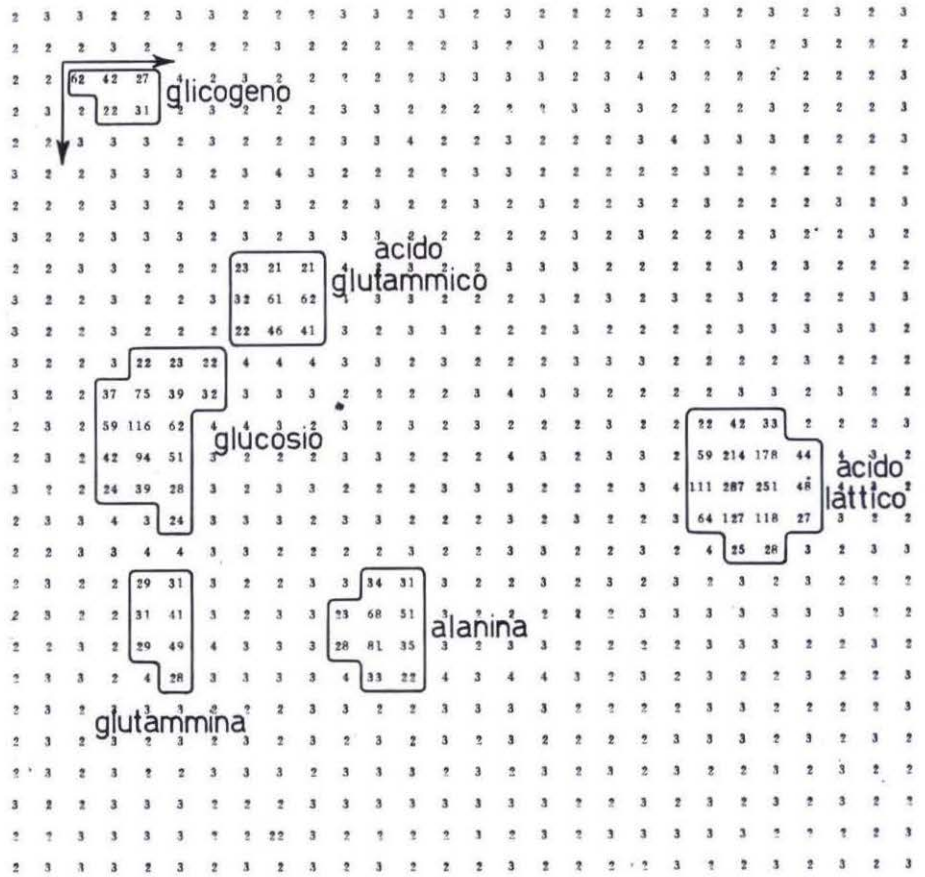


Fig. 1. — Mappa numerica di un radiocromatogramma bidimensionale su carta di un estratto acquoso di corteccia renale di coniglio incubato con piruvato-3-^{14}C, in un tampone di fosfato.

Solventi $\longrightarrow$ alcool butilico secondario: acido formico 85 %: acqua (75 : 15 : 10)
$\downarrow$ fenolo : acqua : idrato di ammonio d = 0,886 (80 : 20 : 1).

TABELLA 1.

Effetto del glucosio sul metabolismo del piruvato nelle fettine di corteccia renale di coniglio

Mezzo di incubazione	Prodotti di trasformazione del piruvato	SUBSTRATO *			
		Piruvato-1-^{14}C		Piruvato-3-^{14}C	
		senza glucosio (c.p.m.)	con glucosio (c.p.m.)	senza glucosio (c.p.m.)	con glucosio (c.p.m.)
Tampone di bicarbonato	Acido lattico	859 ± 63	783 ± 35	850 ± 21	961 ± 42
	Glucosio	121 ± 3	130 ± 2	324 ± 12	360 ± 25
	Acido glutammico	9 ± 2	8 ± 2	295 ± 17	275 ± 41
	Alanina	124 ± 3	137 ± 5	128 ± 11	115 ± 9
	Glutammina	—	—	107 ± 11	97 ± 8
Tampone di fosfato	Acido lattico	734 ± 34	1282 ± 79	873 ± 21	1358 ± 17
	Glucosio	—	—	43 ± 5	155 ± 14
	Acido glutammico	7 ± 1	7 ± 3	140 ± 12	141 ± 6
	Alanina	133 ± 5	119 ± 6	170 ± 10	120 ± 7
	Glutammina	—	—	40 ± 3	43 ± 9

* Risultati espressi come colpi per minuto (in migliaia) riferiti a 3 x 10^6 colpi per minuto inizialmente presenti nel mezzo di incubazione, per 200 mg di tessuto, peso umido, per 1 h a 37°C in tampone di bicarbonato o di fosfato a pH 7,4. Concentrazione dell'acido piruvico 0,1%; radioattività nell'atomo di carbonio 1 o 3 3,3 μC. Concentrazione del glucosio, quando presente, 0,1%. Valori medi di 6 esperienze ± errore standard.

In accordo con quanto precedentemente riportato da KREBS & YOSHIDA (1963), si è trovato che una notevole parte di piruvato viene trasformata in glucosio nelle fettine di corteccia renale di coniglio. Infatti dopo 1 h di incubazione con piruvato 3-^{14}C o con piruvato 1-^{14}C nel tampone di bicarbonato rispettivamente 324.000 e 121.000 colpi per minuto (Tab. 1) vengono incorporati nel glucosio. Nel tampone di fosfato invece la radioattività del piruvato ritrovata nel glucosio è molto bassa; nelle nostre condizioni sperimentali essa è stata trovata in quantità dosabile (43.000 colpi al minuto) soltanto quando il tessuto veniva incubato con piruvato 3-^{14}C.

Il rapporto tra la radioattività del glucosio presente nel mezzo e quello presente nell'estratto è circa 20 il che indica che il glucosio radioattivo si ritrova per la maggior parte nel mezzo di incubazione.

Effetto del glucosio come co-substrato.

In presenza di glucosio la via metabolica del piruvato nelle fettine di corteccia renale di coniglio rimane qualitativamente inalterata in entrambi i mezzi di incubazione.

La distribuzione della radioattività nei singoli metaboliti varia quantitativamente soltanto nel caso in cui il tessuto è incubato nel tampone di fosfato (Tab. 1). Le variazioni consistono in un aumento nella incorporazione della radioattività in acido lattico e nel glucosio ed in una diminuzione nella CO_2 e nell'alanina radioattiva.

La radioattività incorporata nell'acido lattico viene quasi raddoppiata e quella incorporata nel glucosio aumenta di un fattore circa 4. La diminuzione della radioattività nella CO_2, che scende da 748.000 $\pm$ 14.000 a 678.000 $\pm$ 10.000 colpi al minuto quando il tessuto è incubato con piruvato-1-^{14}C e da 265.000 $\pm$ 9.000 a 218.000 $\pm$ 21.000 colpi al minuto con piruvato-3^{14}C, è statisticamente significativa; la radioattività incorporata nella alanina diminuisce in presenza di glucosio del 30 %.

DISCUSSIONE

Dai risultati riportati in questo lavoro appare evidente che il piruvato, nelle fettine di corteccia renale di coniglio, viene metabolizzato mediante le seguenti reazioni: ossidazione attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici con formazione di acido glutammico e glutammina, transaminazione ad alanina, riduzione ad acido lattico, carbossilazione ad acidi bicarbossilici con formazione di glucosio.

La radioattività ritrovata nella CO_2 incubando il tessuto con piruvato 1-C^{14} è tre volte quella ottenuta con piruvato 3-C^{14}; ciò è in accordo con quanto trovato da LEE, VERNON & CAHILL (1962) nelle fettine di corteccia

renale sia di coniglio che di ratto e si accorda con lo schema di ossidazione del piruvato attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici. Anche l'elevata incorporazione della radioattività del carbonio 3 del piruvato nel glutammato è un indice del funzionamento di detto ciclo. D'altra parte la formazione di acido glutammico radioattivo da piruvato $1^{14}C$ sembra indicare che il piruvato venga in parte anche carbossilato ad acido ossalacetico.

I risultati ottenuti sull'incorporazione della radioattività del carbonio 1 e 3 del piruvato nel glucosio, dimostrano una carbossilazione del piruvato ad acido ossalacetico, una randomizzazione a livello dell'acido fumarico e sono in accordo con lo schema della gluconeogenesi discussa da SEUBERT & HUTH (1965).

La gluconeogenesi risente della composizione ionica del mezzo di incubazione; infatti, in presenza di ioni Ca^{++}, la radioattività del carbonio 3 del piruvato incorporata nel glucosio è circa otto volte maggiore di quella incorporata quando il tessuto viene incubato in tampone di fosfato che non contiene ioni Ca^{++}. Ciò è in accordo con quanto in precedenza trovato da KREBS *et al.* (1962) e da RUTMAN *et al.* (1965) nelle fettine di corteccia renale di ratto.

A differenza di quanto osservato in precedenti esperimenti (BUSELLU & POCCHIARI, 1965), nei quali si era messo in evidenza un significativo effetto del glucosio sulla gluconeogenesi da glutammato, sia nel tampone di bicarbonato che in quello di fosfato, si è ora trovato che da piruvato il glucosio stimola la gluconeogenesi soltanto quando il tessuto viene incubato nel tampone di fosfato.

È noto che nelle fettine di corteccia renale, il piruvato viene trasformato in glucosio mediante il cammino inverso della glicolisi dopo essere stato fosforilato a fosfopiruvato. È comunemente ritenuto che, per la massima parte, la fosforilazione del piruvato a fosfoenolpiruvato avvenga non per via diretta ad opera della piruvicochinasi, ma soltanto dopo carbossilazione del piruvato ad acido ossalacetico; tale carbossilazione può avvenire o direttamente ad opera della piruvicocarbossilasi (UTTER & KEECH, 1960) o mediante la formazione intermedia di acido malico (OCHOA, MEHLER & KORNBERG, 1948) (Fig. 2).

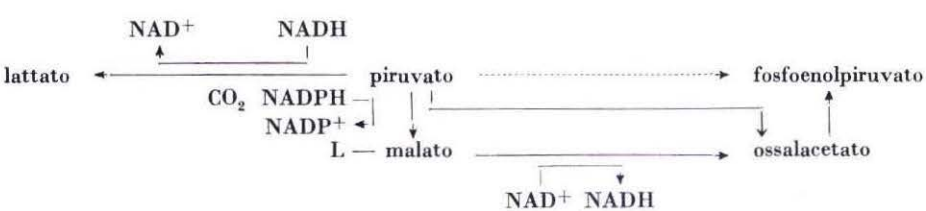


Fig. 2. — Schema di formazione del fosfoenolpiruvato e del lattato da piruvato.

Il fatto che il glucosio stimoli la formazione di acido lattico da piruvato soltanto nel tampone fosfato nel quale viene aumentata anche la incorporazione della radioattività del carbonio 3 del piruvato nel glucosio, suggerisce l'ipotesi che i due effetti possano essere causati da uno stesso fattore. Come già precedentemente proposto sulla base di risultati ottenuti in analoghe esperienze eseguite sulla corteccia cerebrale di ratto (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1962), si ritiene che il glucosio potrebbe agire aumentando il potere riducente della cellula, rendendo per esempio disponibile una maggior quantità di fosfopiridinnucleotidi ridotti. Sulla base di questa ipotesi, nel tampone di fosfato in assenza di ione Ca^{++} prevarrebbe la carbossilazione riduttiva del piruvato, mentre nel tampone di bicarbonato, in presenza di ioni Ca^{++}, sarebbe preponderante la carbossilazione diretta del piruvato ad ossalacetato, che, non coinvolgendo i fosfopiridinnucleotidi, non può essere influenzata dalla presenza di glucosio.

Ulteriori ricerche sono in corso nel tentativo di chiarire maggiormente quanto sopra discusso.

Gli autori desiderano esprimere il loro ringraziamento al Sig. Giuseppe Ricciarello per l'apprezzata assistenza tecnica.

27 aprile 1966.

BIBLIOGRAFIA

BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, L. LONGINOTTI, I. MASI & F. POCCHIARI, 1962. *Proc. Roy. Soc. B*, **156**, 168.

BUSELLU, M. A. & F. POCCHIARI, 1965. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **1**, 548.

ELLIOTT, K. A. C. & N. HENDERSON, 1948. *J. Neurophysiol.*, **11**, 473.

KREBS, H. A., D. A. H. BENNET, P. DE GASQUET, T. GASCOYNE & T. YOSHIDA, 1963. *Biochem. J.*, **86**, 22.

KREBS, H. A. & K. HENSELEIT, 1932. *Z. Physiol. Chem.* **210**, 33.

KREBS, H. A. & T. YOSHIDA, 1963. *Biochem. J.*, **89**, 398.

LEE, J. B., K. V. VERNON & G. F. CAHILL, 1962. *Am. J. Physiol.*, **203**, 27.

OCHOA, S., A. H. MEHLER & A. KORNBERG, 1948. *J. Biol. Chem.*, **174**, 979.

RUTMAN, J. Z., L. E. MELTZER, J. R. KITCHELL, R. J. RUTMAN & P. GEORGE, 1965. *Am. J. Physiol.*, **208**, 841.

SEUBERT W., & W. HUTH, 1965. *Biochem. Z.*, **343**, 176.

UTTER, M. F. & D. B. KEECH, 1960. *J. Biol. Chem.*, **235**, PC 17.