

23. S. BETTINI e M. BOCCACCI (\*). — Localizzazione e distribuzione della succinodeidrogenasi nel muscolo di insetti.

**Riassunto.** — Gli autori hanno usato il cloruro di trifenil tetrazolio per mettere in evidenza la succinodeidrogenasi nei muscoli di *Periplaneta americana*, *Gryllus bimaculatus* e *Musca domestica*. Gli autori hanno osservato che la concentrazione di tale enzima varia da muscolo a muscolo dello stesso insetto ed è in rapporto diretto con la pigmentazione dei muscoli stessi. E' inoltre stato notato che l'attività succinodeidrogenasica di muscoli di *Periplaneta americana* non viene inibita dall'acido monoiodoacetico, nè in vivo, nè in vitro.

**Résumé.** — Les auteurs ont employé le chlorure de triphenyl-tetrazolium pour mettre en évidence la succino-déhydrogénase dans les muscles de *Periplaneta americana*, *Gryllus bimaculatus* et *Musca domestica*. Les auteurs ont observé que la concentration de cette enzyme varie de muscle à muscle du même insecte et est en rapport direct avec la pigmentation des muscles eux-même. On a noté en outre que l'activité de la succino-déhydrogénase de muscles de *Periplaneta americana* n'est pas inhibée par l'acide mono-iodo-acétique ni in vivo, ni in vitro.

**Summary.** — The authors through the use of triphenyl tetrazolium chloride have localized succinic dehydrogenase in muscles of *Periplaneta americana*, *G. bimaculatus* and *M. domestica*. The authors have observed that the concentration of this enzyme varies among muscles of the same insect and in proportion with the muscles' kinetic activity and pigmentation. It has also been observed that succinic dehydrogenase activity of *P. americana*'s muscles is not inhibited by iodoacetic acid, neither in vivo, nor in vitro.

**Zusammenfassung.** — Verf. haben das Triphenyl-tetrazol-chlorur benutzt, um die Sukzino-dehydrogenase im Muskel von *Periplaneta americana*, *Gryllus bimaculatus* und *Musca domestica* nachzuweisen. Verf. haben beobachtet dass die Konzentration dieses Enzyms zwischen den Muskeln beim gleichen Insekt wechselt und in direkter Beziehung zur Pigmentierung des Muskels selbst steht. Ferner wurde bemerkt, dass

---

(\*) Laureando in chimica.

die Sukzino-Dehydrogenase-Wirkung der Muskeln von *Periplaneta americana* durch Monojodessigsäure, weder in vivo noch in vitro gehemmt wird

In una precedente nota <sup>(1)</sup> sulla tossicità per gli insetti di alcune sostanze ad azione alchilante, ci eravamo prefissi di studiare l'azione inibente di dette sostanze verso alcuni enzimi a funzione -SH attiva. Tra questi enzimi la succinodeidrogenasi occupa senz'altro un posto di primo piano. Già nel 1949 ISHMOTO e WILLIAMS <sup>(2)</sup> dimostravano con l'impiego di metodi manometrici, la presenza di succinodeidrogenasi nei sarcosomi isolati dai muscoli indiretti del volo di *Drosophila funebris* e di *Phormia regina*. Oggi si conoscono semplici metodi che permettono di mettere in evidenza istochimicamente, con l'impiego di derivati del tetrazolio <sup>(3)</sup>, la succinodeidrogenasi nei tessuti. Noi abbiamo applicato al tessuto muscolare di insetti la tecnica di SELIGMAN e RUTENBURG <sup>(4)</sup>; solo che abbiamo usato il cloruro di trifenil tetrazolio invece del cloruro di ditetrazolio. Inoltre ci è sembrato più pratico usare tessuto muscolare sfilacciato in luogo delle sezioni al microtomo congelatore.

In presenza del substrato specifico, la soluzione di tetrazolio produce sul tessuto muscolare in circa 3' una diffusa colorazione rosa che entro 30' circa diviene rosso scuro. A questo punto si osserva la comparsa di caratteristici granuli rossi di precipitato più abbondanti in un primo tempo sulle superficie di taglio delle fibre ed in seguito nelle fibre esterne del fascio muscolare, quelle cioè a contatto diretto con il liquido reattivo. La precipitazione dei granuli rossi di « formazan » ottenuti con questa tecnica in alcuni muscoli di insetti, ha un'andamento analogo a quello osservato da SELIGMAN e RUTENBURG nei tessuti di vertebrati.

Abbiamo notato tuttavia che il tempo di comparsa del color rosa e dei granuli rossi di precipitato, nonché il numero di questi dopo un dato tempo (indici dell'attività succinodeidrogenasica), variano notevolmente non solo tra differenti specie di insetti, ma anche fra differenti gruppi muscolari di uno stesso insetto. (Tali variazioni nell'attività succinodeidrogenasica sono state recentemente messe in evidenza nei vertebrati dal LAWRIE <sup>(5)</sup> con l'impiego di metodi diversi da quello da noi usato).

<sup>(1)</sup> BETTINI S. e BOCCACCI M.: Riv. Parass., 13, 165 (1951).

<sup>(2)</sup> ISHMOTO H. e WILLIAMS C. M.: Anat. Rec., Suppl., 105 (1949).

<sup>(3)</sup> SMITH F. E.: Science, 113, 751 (1951).

<sup>(4)</sup> SELIGMAN A. M. and RUTENBURG A. M.: Science, 113, 317 (1951).

<sup>(5)</sup> LAWRIE R. A.: Nature, 170, 122 (1952).

Abbiamo inoltre osservato che questa differenza nell'attività succinodeidrogenasica del muscolo di insetti è, grosso modo, in rapporto diretto con la pigmentazione giallo-bruna del muscolo stesso e con la sua attività cinetica. Difatti in *Periplaneta americana* esiste tutta una gamma di pigmentazione dei gruppi muscolari che varia da una intensità massima osservabile nei muscoli indiretti del volo, ad una assenza di pigmento, come si osserva in alcuni muscoli delle zampe. Nelle zampe stesse (3° paio), poi si hanno ugualmente differenze di pigmentazione fra i vari gruppi muscolari: la branca toracica (muscolo n. 135 di DRESDEN e NIJENHUIS (6)) del muscolo estensore ventrale del trocantere (depressor of the trochanter, SNOGRASS) (fig. 4, A) è più pigmentata della sua branca coxale (muscolo n. 137 di D. e N.); questo muscolo a sua volta è più pigmentato del flessore del trocantere (muscolo n. 139 di D. e N.) e dell'estensore dorsale del trocantere (muscolo n. 136 di D. e N.) (fig. 4, B).

Nel *Gryllus bimaculatus* invece i muscoli indiretti del volo del mesotorace, cioè quelli che sono responsabili del movimento del primo paio di ali fornite dell'organo del canto, sono molto più pigmentati degli analoghi muscoli del metatorace, ove si inserisce il secondo paio di ali membranose ed inadatte al volo. Mentre nei primi l'attività succinodeidrogenasica è rilevante, nei secondi essa è scarsissima; nel terzo paio di zampe si ha un'attività enzimatica quasi eguale sia nei flessori che negli estensori della tibia, muscoli la cui pigmentazione appare della stessa intensità.

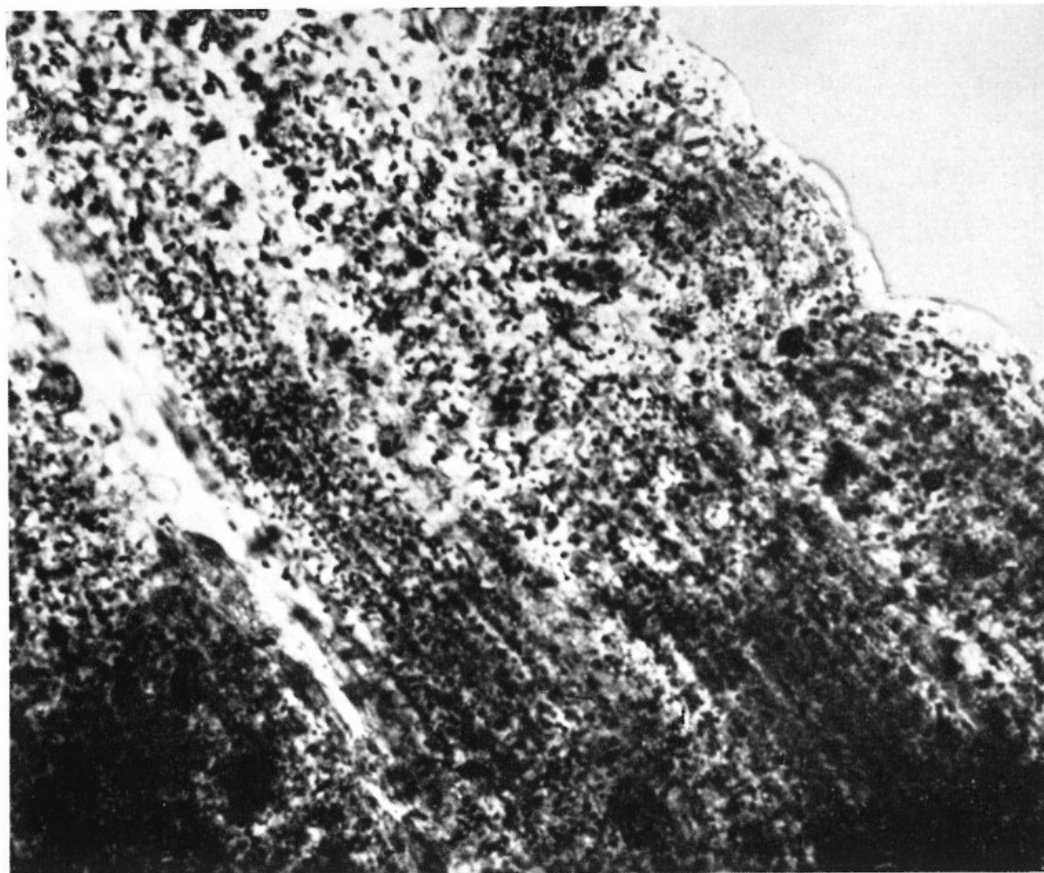
In *Musca domestica* i muscoli indiretti del volo, che sono muscoli molto pigmentati, mostrano una attività succinodeidrogenasica altrettanto spiccata, mentre i muscoli delle zampe (presi in toto), che appaiono apigmentati, hanno un'attività enzimatica bassissima.

Era da tempo nota la differenza di pigmentazione fra i muscoli indiretti del volo (fibrillari) e gli altri muscoli scheletrici (tubolari, etc.). Tali differenze tuttavia non dipendono dalla struttura istologica propria ai diversi tipi di muscolo, dato che dalle nostre osservazioni risulta che esistono notevoli differenze nella pigmentazione anche in muscoli istologicamente identici (tipo B di WIGGLESWORTH (7)) ma ad attività cinetica diversa. A questo punto conviene far presente che anche il contenuto in citocromo dei muscoli varia proporzionalmente al loro grado di attività (7). Non ci è dato ancora sapere se la pigmentazione che

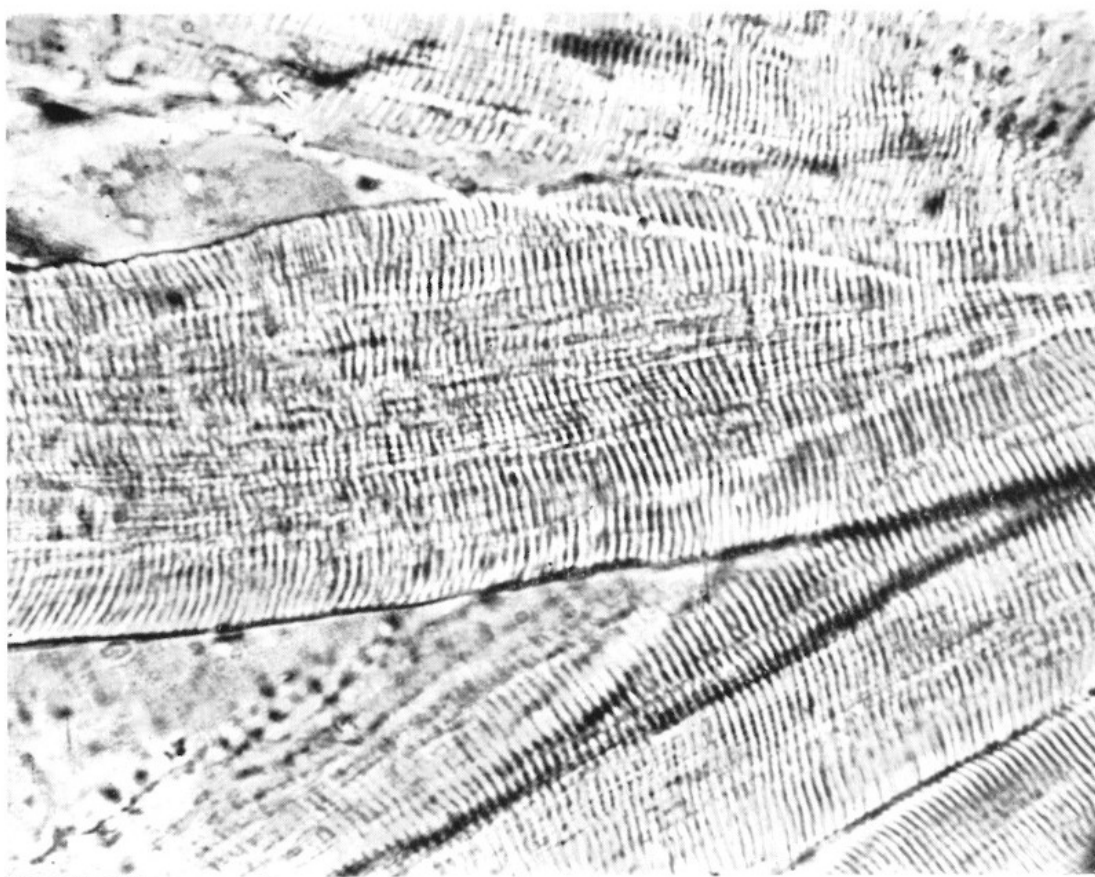
---

(6) DRESDEN D. e NIJENHUIS E. D.: Proceed. Koninkl. Nederl. Akademie Van Wetenschappen, Series C, 56, 39 (1953).

(7) WIGGLESWORTH V. B.: The Principles of Insect Physiology, Mathuen, 1950.



A.



B.

*Fig. 1.* - A) Branca toracica dell'estensore ventrale del trocantere con granuli di formazan formati durante 50' di contatto con il liquido di Seligman e Rutenburg a 37° C.  $\times$  384. B) Estensore dorsale del trocantere, trattato come sopra, nel quale non si nota formazione alcuna di granuli di formazan.  $\times$  384.

si osserva nel muscolo di insetti sia dovuta solo al citocromo o anche ad altri cromoproteidi.

Le prove di inibizione con acido iodoacetico, sia in vivo che in vitro sull'attività succinodeidrogenasica del muscolo di *Periplaneta americana*, hanno dato i seguenti risultati.

Blatte adulte sono state inoculate con cc. 0,010 di una soluzione al 10% di iodoacetato sodico. Dopo 60', quando i sintomi di paralisi erano già avanzati, sono stati asportati i muscoli estensori del trocantere ed i muscoli del volo sui quali si è eseguita la reazione di SELIGMAN e RUTENBURG. Non si è notata inibizione sensibile della attività succinodeidrogenasica. Lo stesso risultato si è avuto con muscoli prelevati due ore dopo l'inoculazione, quando cioè la paralisi degli arti era completa, e poco dopo la morte dell'insetto.

Nelle prove in vitro il tessuto muscolare veniva incubato a 39° C per 30' in soluzione fisiologica di YAEGER contenente 1,5 mg /cc di iodoacetato sodico. In seguito veniva trasferito nel liquido di reazione contenente uguale quantità di iodoacetato sodico. Non si è notata una sensibile inibizione della attività enzimatica.

Tali risultati sono in accordo con quelli di SELIGMAN e RUTENBURG, che non avevano notato alcuna azione inibente dell'acido iodoacetico sulla succinodeidrogenasi dei muscoli di vertebrato.

In un precedente lavoro di GUZMAN BARRON e SINGER<sup>(8)</sup>, già si notava d'altronde che tra tutta una serie di sostanze inibenti, l'acido iodoacetico era il meno attivo sul sistema succinoossidasi del muscolo di vertebrati.

Ci sembra quindi si possa escludere che l'azione tossica delle sostanze alogenate alchilanti sia principalmente dovuta alla inibizione della succinodeidrogenasi.

Poichè tra gli enzimi a funzione -SH attiva, la triosofosfatodeidrogenasi è particolarmente sensibile all'azione dell'acido iodoacetico, e simili<sup>(9)</sup>, l'azione tossica già da noi osservata<sup>(1)</sup>, potrebbe esplicarsi principalmente con l'inibizione di questo importante enzima della glicosi.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di parassitologia.

<sup>(8)</sup> GUZMAN BARRON E. S. e SINGER T. P.: J. Biol. Chem., 157, 221 (1948).

<sup>(9)</sup> MACKWORTH J. F.: Biochem. J., 42, 82 (1948).