29. A. BELOFF-CHAIN, R. CATANZARO, E. B. CHAIN, O. D'AGOSTINO, I. MASI, F. POCCHIARI e C. ROSSI (*). — **Chimica Biologica. - Destino del glucosio uniformemente marcato nel diaframma di ratti normali e diabetici da allossana in presenza ed in assenza di insulina.**

Riassunto. — Il metabolismo del glucosio nel diaframma isolato di ratti normali e diabetici da allossana in presenza ed in assenza di insulina, è stato studiato incubando pezzi di diaframma con glucosio marcato uniformemente con C^{14}. Il mezzo dopo incubazione e l'estratto alcoolico-acquoso del diaframma sono stati cromatografati; la frazione insolubile e la C^*O_2 emessa durante l'incubazione sono stati trasformati in BaC^*O_3.

Dalle misure dei radiocromatogrammi e dei campioni di BaC^*O_3 si è trovato che l'insulina non ha influenza qualitativa sulla comparsa dei vari metaboliti ma produce solo un aumento nella scomparsa del glucosio dal mezzo e una differente distribuzione dello stesso glucosio tra le varie frazioni (in particolare l'insulina aumenta il glicogeno e gli oligosaccaridi). Inoltre non vi è differenza nè qualitativa nè quantitativa, del metabolismo del glucosio, tra il muscolo di ratti normali e diabetici da allossana.

Résumé. — Le métabolisme du glucose dans le diaphragme isolé des rats normaux et diabétiques par alloxane en présence ou en absence d'insuline a été étudié par l'incubation de morceaux de diaphragme avec du glucose marqué uniformément avec C^{14}. Le milieu après l'incubation et l'extrait alcoolique-aqueux du diaphragme ont été chromatographiés; la fraction insoluble et le C^*O_2 émis pendant l'incubation ont été transformés en BaC^*O_3.

A travers les mesures des radiochromatogrammes et des échantillons de BaC^*O_3, on a trouvé que l'insuline n'a pas d'influence qualitative sur l'apparition des différents métabolites mais produit seulement une augmentation de la disparition du glucose dans le milieu et une différente distribution du même glucose entre les différentes fractions (en particulier l'insuline augmente le glycogène et les oligosaccharides). En outre il n'y a aucune différence, ni qualitative ni quantitative, dans le métabolisme du glucose dans le muscle du rat normal et dans celui de rats atteints de diabète du à l'alloxane.

(*) Questa nota è stata presentata all'Accademia Nazionale dei Lincei dal socio E. B. CHAIN nella seduta del 9 maggio 1953.

Summary. — The metabolism of glucose by the isolated diaphgram muscle of normal and alloxan diabetic rats in the presence and absence of insulin, has been studied by incubating pieces of diaphgram with glucose uniformly labelled with C^{14}.

The medium after incubation, and the aqueous-alcoholic extract of the diaphragm were chromatographed; the insoluble fraction and the C^*O_2 formed during incubation were transformed into BaC^*O_3.

From the measurements of the radio-chromatograms and the samples fo BaC^*O_3 it was found that insulin has no qualitative effect on the formation of the metabolites but produces an increased disappearance of glucose in the various fraction (in particular insulin increases the glycogen and oligosaccharides).

Furthermore no qualitative nor quantitative difference was observed in the metabolism of glucose by the muscle of normal and alloxan diabetic rats.

Zusammenfassung. — Es wurde der Glukosestoffwechsel im isolierten Zwerchfell von normalen und Alloxan-diabetischen Ratten bei An- oder Abwesenheit von Insulin untersucht, indem Zwerchfellstückchen einhetlich mit C^{14} gekennzeichneter Glukose in den Brutschrank gelegt wurden. Nach der Inkubation wurde der Milieu, sowie der alkoholisch-wässrige Extrakt des Zwerchfells chromographisch untersucht. Die unlösliche Fraktion und das während der Inkubation abgesonderte C^*O_2 wurden in BaC^*O_3 übergeführt.

Aus den Messungen der Radiochromatogramme und der Proben des BaC^*O_3 wurde festgestellt, dass das Insulin keinen qualitativen Einfluss auf das Auftreten der verschiedenen Stoffwechselprodukte hat, sondern nur eine raschere Abnahme der Glukose aus dem Milieu hervorruft, sowie eine andere Verteilung der Glukose selbst in ihren Abbaustufen (Insbesondere erhöht das Insulin das Glykogen und die Oligosaccharide). Im übrigen besteht kein Unterschied, weder qualitativer noch quantitativer Art im Glukose-stoffwechsel zwischen dem Muskel normaler Ratten oder dem bei alloxal-diabetischen Tieren.

Nella presente nota preliminare vengono riportati i risultati delle ultime ricerche relative all'azione dell'insulina sul metabolismo intermedio del glucosio nel diaframma isolato di ratti normali e diabetici per allossana.

Secondo la tecnica di C. L. Gemmill (1) sono stati incubati pezzi di diaframma in vaschette di Warburg con glucosio uniformemente marcato con C^{14} (**).

Dopo l'incubazione è stato fatto un estratto alcoolico-acquoso del diaframma omogeneizzato: una parte aliquota di tale estratto è stata cromatografata su carta usando come solvente una miscela di acido picrico — alcool butilico terziario — acqua (2). Successivamente è stata eseguita la radioautografia mettendo a contatto il cromatogramma con una lastra radiografica (3) per alcuni giorni.

Si è trovato che il glucosio si trasforma in almeno otto prodotti metabolici rilevabili nel cromatogramma con macchie più o meno attive (al contatore di Geiger) e nel radioautogramma con annerimenti più o meno intensi.

Nella fig. 1 è dato un esempio di tali radioautogrammi osservando tuttavia che gli annerimenti più deboli chiaramente visibili sulla lastra non appaiono nella riproduzione a stampa qui annessa; perciò nella tabella 1 sono riportati gli Rf di tutti gli annerimenti visibili nell'originale.

Le macchie corrispondenti ai vari prodotti metabolici non risultano tutte disposte nel cromatogramma in modo da consentire una misura della loro singola attività: il cromatogramma è stato perciò diviso in zone le cui attività globali sono state riportate nella successiva tabella 3.

Corrispondentemente sono state divisi in zone anche i rispettivi radioautogrammi.

Come si vede nell'esempio riportato nella fig. 1 la prima zona è costituita da una macchia, da attribuire a glicogeno, che non si è mossa durante lo sviluppo del cromatogramma e da altre due macchie che probabilmente debbono attribuirsi ad oligo-saccaridi. La seconda zona è costituita da una sola macchia corrispondente ad una sostanza la cui natura non è stata ancora chiarita. La terza zona è costituita da più macchie non completamente risolte che sicuramente debbono attribuirsi al glucosio non trasformato e ad almeno un'altra sostanza, probabilmente un estere fosforilato. La quarta zona è costituita infine da una sola macchia attribuibile ad acido lattico. Tra la zona terza e quarta esiste un gruppo di deboli macchie che non sono state raggruppate in

---

(1) Bull. Johns Hopkins Hosp., *66*, 232 (1940); *68*, 329 (1941).
(2) C. S. Hanes e F. A. Isherwood: Nature, *164* 1107 (1949).
(3) R. M. Fink, C. E. Dent e K. Fink: Nature, *160*, 801 (1947).
(**) Il glucosio marcato è stato fornito dal Radiochemical Centre, Amersham, Inghilterra

una speciale zona nè misurate e che probabilmente sono dovute ad acidi facenti parte del ciclo tricarbossilico.

Anche il mezzo nel quale è stato incubato il diaframma è stato cromatografato (fig. 2, tab. 1). Oltre al glucosio si vedono altre mac-

TABELLA 1

Rf delle macchie presenti nelle radioautografie dei cromatogramma del mezzo contenente glucosio marcato C^{14}, prima e dopo incubazione e dell'estratto alcoolico acquoso di diaframma dopo incubazione.

MEZZO		Estratto alcoolico acquoso	ZONE
Controllo	dopo incubazione		
		0	
		0,03	1
		0,07	
		0,16	2
0,29	0.29	0,30	3
(0,43)	(0,43)	(0,40)	
		(0,50)	
	0,55	0,58	
	0,74	0,74	
	0,82	0,83	4

I valori tra parentesi si riferiscono a macchie molto deboli e quindi difficili da localizzare.

chie più deboli corrispondenti a quelle seguenti il glucosio nella cromatografia dell'estratto alcoolico-acquoso, e una macchia corrispondente all'acido lattico. Prima del glucosio e subito dopo (Rf = 0,43) si notano delle macchie non ben definite che sono però anche presenti nel glucosio originale.

Dalla fig. 1 si vede chiaramente che l'insulina non ha alcuna in-

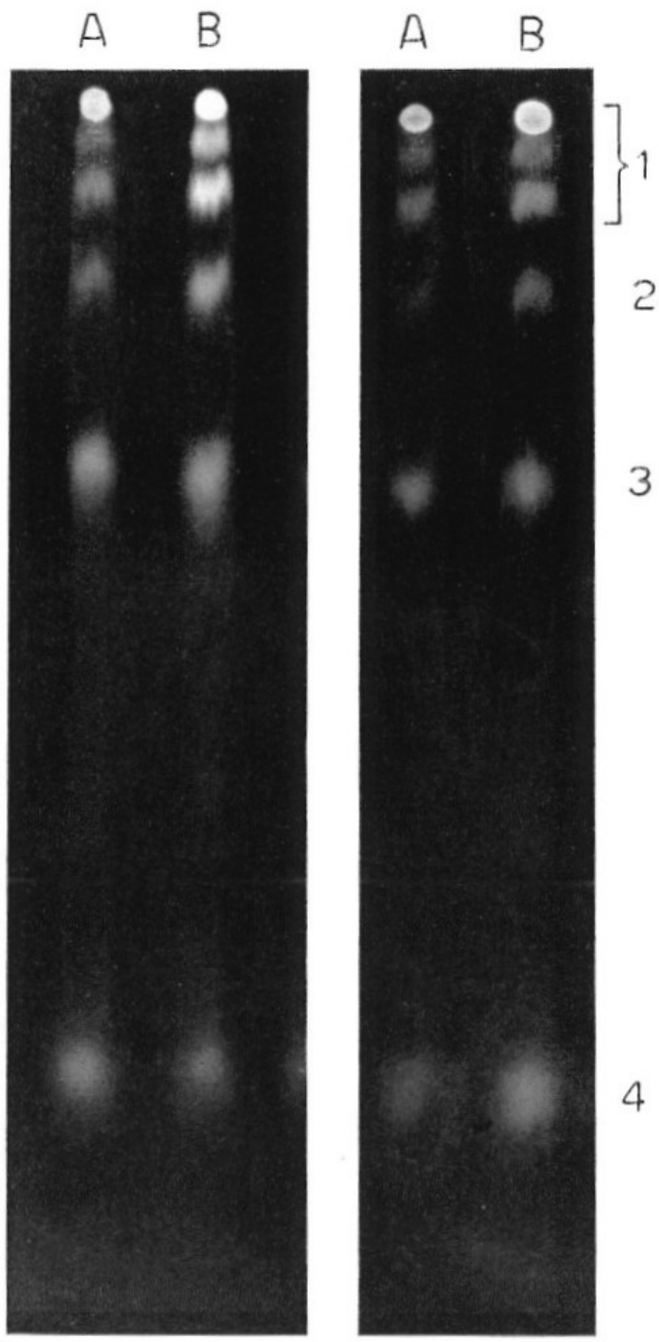

Fig. 1. - Radioautografie dei cromatogrammi dell'estratto alcoolico acquoso di diaframma incubati con glucosio marcato senza (A) e con (B) insulina.

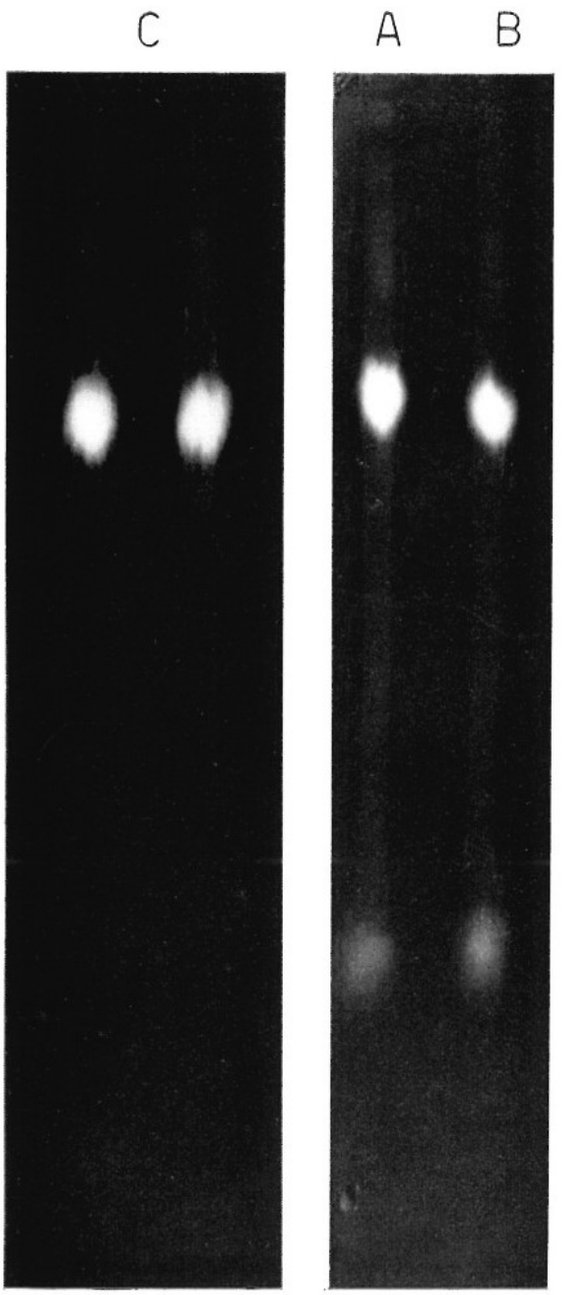

Fig. 2. - Radioautografie dei cromatogrammi del mezzo prima (C) e dopo incubazione (A) senza insulina (B) con l'insulina.

fluenza qualitativa sulla comparsa dei vari metaboliti, ma aumenta invece l'intensità di alcune zone della cromatografia. Per conoscere le quantità dei prodotti metabolici formati, la radioattività delle varie zone è stata misurata (4) facendo passare la striscia di carta cromatografata sotto la finestra di un contatore di Geiger. E' stata misurata la radioattività della frazione insolubile (*) del muscolo, determinata secondo il metodo di Van Slyke (5), dell'acido lattico del mezzo cromatografato e quella del CO_2 prodotto durante la incubazione, secondo il metodo di Villee e Hastings (6). La percentuale di glucosio trasformato in acido lattico è circa del 25% in pieno accordo con il risultato chimico di O. Walaas e E. Walaas (7).

Nella maggior parte delle nostre esperienze è stato trovato l'80-90% dell'attività totale del glucosio scomparso dal mezzo. Tale scomparsa è stata determinata misurando su cromatografia il glucosio presente nel mezzo prima e dopo incubazione. I risultati sono riportati nella Tab. 2.

Tabella 2

Effetto dell'insulina sulla scomparsa del glucosio incubato con diaframma di ratti normali e diabetici da allossana.

I risultati sono espressi in % dell'attività totale del glucosio nel mezzo: valori medi ± l'errore standard. Per « effetto dell'insulina)» si intende la variazione (in %) tra i risultati ottenuti con e senza insulina. Il numero dei pezzi di diaframma usato è dato tra parentesi.

Numero di ratti	SCOMPARSA DEL GLUCOSIO		Effetto della insulina
	Senza insulina	Con insulina	
Normali 6	18,3 ± 2,1 (10)	25,2 ± 3,1 (8)	+39 ± 9,2 $p < 0,1$
Diabetici 4	16,4 ± 1 (8)	25,5 ± 1,3 (8)	+56 ± 4,7 $p < 0,01$

Viene considerato significativo $p \leq 0,1$.

---

(4) R. M. Tomarelli e K. Florey: Science, *107*, 630 (1948).

(5) D. D. Van Slyke e J. Folch: Journ. Biol. Chem., *136*, 509 (1940); D. D. Van Slyke, J. Plazin e J. R. Weisiger: Journ. Biol. Chem., *191*, 299 (1951); D. D. Van Slyke, R. Steele e J. Plazin: Journ. Biol. Chem., *192*, 769 (1951).

(6) C. L. Gemmill e L. Hamman: Bull. Johns Hopkins Hosp., *68*, 50 (1941); W. C. Stadie: Yale Journ. Biol. Med., *16*, 539 (1944); M. E. Krahl e C. F. Cori: Journ. Biol. Chem., *170*, 607 (1947); M. Perlmutter e R. O. Greep: Journ. Biol. Chem., *174*, 915 (1948); M. E. Krahl e C. R. Park: Journ. Biol. Chem. *174*, 939 (1948); C. A. Villee e A. B. Hastings: Journ. Biol. Chem.: *179*, 673 (1949); A. Beloff-Chain, E. B. Chain, D. Bovet, F. Pocchiari, R. Catanzaro e L. Longinotti: Bioch. Journ., *54*, 529 (1953).

(7) Journ. Biol. Chem., *187*, 769 (1950).

(*) In ulteriori esperienze è stato trovato che la maggior parte dell'attività di questa frazione è dovuta a glicogeno.

Tutti i dettagli dei metodi sperimentali usati saranno dati in una successiva e più estesa pubblicazione.

Si è visto che sotto l'influenza dell'insulina scompare dal mezzo una maggior quantità di glucosio, confermando così con misure radioattive i risultati delle analisi chimiche già noti ([6]). Benchè la radioattività di tutti i metaboliti aumenti in valore assoluto, tuttavia, in rapporto all'attività totale ritrovata, aumentano significativamente soltanto la prima e la seconda zona, cioè quella del glicogeno e degli oligo-saccaridi e quella a R = 0,16, mentre tutto il resto (zona glucosio, macchie deboli, acido lattico, residuo insolubile e CO_2) rimane costante o diminuisce. I risultati sono dati nella Tab. 3.

Poichè nel solvente usato non si presentava omogenea, la macchia del glucosio è stata ricromatografata in butanolo — acido acetico — acqua (4:1:5), ottenendo oltre quella del glucosio un'altra macchia non ben definita che potrebbe essere uno zucchero fosforilato. Non si è però ancora in condizione di precisare con certezza se l'insulina faccia o no aumentare tale sostanza.

Nel muscolo diabetico non vi sono differenze significative nè qualitative nè quantitative rispetto al metabolismo del glucosio nel muscolo normale. Sembra quindi che nel diabete non abbia luogo una alterazione del metabolismo glucidico del muscolo, ma che il fegato sia l'organo nel quale la capacità di metabolizzare il glucosio è notevolmente ridotta. Disturbi del metabolismo del glucosio nel fegato di animali diabetici sono ben conosciuti e sono stati dimostrati da vari autori (per es. da Chernick e Chaikoff, Stetten e Boxer ([8]) con l'aiuto dei radioisotopi.

In base ai risultati sopra esposti si può pensare che l'insulina influisca sul metabolismo del glucosio nel diaframma di ratto aumentando i processi sintetici di immagazzinamento, lasciando invece costante o forse anche diminuendo le reazioni cataboliche. Per confermare o meno tale ipotesi sono in corso le relative ricerche.

Si fa presente che la tecnica qui utilizzata non è solamente applicabile allo studio del metabolismo del glucosio nel muscolo, ma può essere applicata con qualunque sostanza marcata su qualunque organo. Noi stessi stiamo studiando il metabolismo del glucosio in vari organi e sotto l'influenza di varie sostanze farmacologicamente attive come il 2-4-dinitro-fenolo.

([8]) S. S. Chernick e I. L. Chaikoff: Journ. Biol. Chem., *188*, 389 (1951); D. Stetten Jr. e G. E. Boxer: Journ. Biol. Chem., *156*, 271 (1944).

TABELLA 3

Distribuzione del C^{14} dopo incubazione con glucosio uniformemente marcato di diaframma di ratti normali e diabetici da allossana, con e senza insulina.

(I risultati sono espressi in % delle radioattività totali ritrovate: valori medi ± errore standard. Per effetto dell'insulina si intende la variazione (in %) tra i risultati ottenuti con o senza insulina. Il numero dei pezzi di diaframma usato è dato tra parentesi)

Numero di ratti	CO_2			Acido lattico			Estratto - alcoolico - acquoso									Residuo insolubile		
							Zona 1 Rf = 0 0,03 0,07			Zona 2 Rf = 0,16			Zona 3 Rf = 0,30					
	Senza insulina	Con insulina	Effetto della insulina	Senza insulina	Con insulina	Effetto della insulina	Senza insulina	Con insulina	Effetto della insulina	Senza insulina	Con insulina	Effetto della insulina	Senza insulina	Con insulina	Effetto della insulina	Senza insulina	Con insulina	Effetto della insulina
Normali 4	15 ± 2 (5)	13,1 ± 2,8 (5)	−17 ± 8 $p > 0,5$	26 ± 3,7 (5)	23 ± 4,2 (5)	−12 ± 3,4 $p > 0,5$	13,2 ± 1,8 (5)	18,7 ± 2,1 (5)	+45 ± 12 $p = 0,1$	3,7 ± 0,2 (5)	4,9 ± 0,3 (5)	+31 + 5,8 $p < 0,01$	24,7* ± 0,3 (5)	20,5* + 3,6 (4)	−19 ± 3,6 $p = 0,4$	21 ± 4,5 (4)	26,9 ± 6,3 (3)	+27 ± 3,7 $p = 0,3$
Diabetici 4	17,3 ± 3,4 (5)	13,6 ± 3 (7)	−21 ± 6,7 $p = 0,5$	29 ± 3,1 (7)	24,5 ± 2,9 (6)	−15 ± 7,5 $p = 0,3$	11,5 ± 2,3 (5)	18,9 ± 2,2 (6)	+75 ± 28 $p = 0,05$	3,3 ± 0,4 (7)	3,8 ± 0,5 (5)	+58 + 18 $p = 0,01$	16,3 ± 1,4 (6)	13,3 ± 0,1 (6)	−19 ± 2,7 $p > 0,1$	21,4 ± 3,8 (7)	23,1 ± 4 (7)	+8 ± 3,3 $p > 0,5$

Viene considerato significativo $p < 0,1$.

* Nelle due medie è compreso un valore molto alto rispetto agli altri, il che, per il limitato numero delle esperienze, porta ad un apparente differenza tra i diabetici ed i normali.

Il presente lavoro fa parte di un programma di ricerche sul metabolismo intermedio dei carboidrati progettato e diretto da E. B. Chain. La parte biochimica è stata svolta da E. B. Chain, A. Beloff-Chain, F. Pocchiari e R. Catanzaro. La parte radiochimica e l'elaborazione critica delle misure sono state svolte da C. Rossi, I Masi e F. Pocchiari. L'organizzazione e la messa a punto delle attrezzature del laboratorio radiochimico è stata effettuata da O. d'Agostino e C. Rossi.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica biologica.