

52. Maria MAROTTA e G. P. CANTORE. — Il glucosio e il glicogeno nella muscolatura liscia dell'intestino normale e nella preparazione dell'intestino isolato di coniglio.

**Riassunto.** — Sono state fatte alcune esperienze sull'intestino di coniglio in rapporto sia alle riserve di glucosio in esso contenute sia al fenomeno di esaurimento osservato in vitro.

Gli intestini isolati di conigli normali e a digiuno sono stati immersi nella soluzione di Tyrode; sono state registrate su chimografo l'attività spontanea e la risposta motrice all'acetilcolina, che per i conigli normali si mantengono uguali per tutto il tempo dell'esperienza, mentre si osserva il rapido fenomeno di esaurimento, corrispondente ad un minore contenuto di glucosio, per gli intestini di conigli sottoposti a digiuno.

E' stato dosato chimicamente anche il glicogeno, messo inoltre in evidenza da alcuni preparati istologici di segmenti di intestino. Dalle osservazioni fatte è difficile pensare che il glicogeno possa essere utilizzato dal muscolo poichè si trova solo nello strato epiteliale.

**Résumé.** — L'on rapporte dans ce travail les expériences faites sur l'intestin isolé de lapin par rapport soit à la réserve de glucose qu'il contient, soit au phénomène d'épuisement observé in vitro.

Des intestins de lapins normaux et à jeûn ont été placés dans du liquide de Tyrode; l'activité spontanée et la réponse à l'acetylcholine ont été enregistrées graphiquement. Pour les lapins normaux celles ci restent les mêmes pendant toute la durée de l'expérience tandis que l'on observe rapidement les signes d'épuisement, qui correspondent à une moindre quantité de glucose, pour les intestins des lapins maintenus à jeûn.

L'on a également dosé le glycogène qui a en outre été mis en évidence par des préparations hystologiques de fragments d'intestin. D'après les faits observés il est difficile d'admettre que le glycogène puisse être utilisé par le muscle puisque on ne le retrouve que dans l'épithélium.

**Summary.** — Experiments have been undertaken with rabbits intestines in which their contents of glucose as also the phenomenon of exhaustion in vitro have been examined.

The isolated intestines of normal and fasted rabbits have been immersed in Tyrode solution and the spontaneous contractions recorded chymographically. The response to acetylcholine in normal rabbits was the same during the course of the experiment, whilst the phenomenon of

exhaustion which corresponded to a decreased content of glucose was observed in fasted animals. Glycogen has been determined chemically as also by preparing histological preparations of the intestines. From the observations recorded it is difficult to believe that glycogen may be utilised by the muscle because it is only found in the epithelial layer.

**Zusammenfassung.** — Es wurden einige Experimente am Kaninchendarm ausgeführt unter besonderer Berücksichtigung des Glukosegehaltes und des Ermüdungsphenomens, das in vitro beobachtet werden kann.

Därme von normalen und nüchternen Kaninchen wurden in Tyrodelösung getaucht und die spontane Aktivität und der Azetylcholineffekt auf dem kymographion registriert. Normale Kaninchen ergeben während des Experimentes konstante Verhältnisse, während bei nüchternen Kaninchen eine rasche Ermüdung beobachtet werden kann, entsprechend einem kleineren Gehalt an Glukose.

Auch Glykogen wurde chemisch bestimmt und einige Darmschnitte histologisch überprüft. Auf Grund der gemachten Beobachtungen ist es schwierig sich vorzustellen, dass Muskelglykogen konsumiert werden kann, denn es befindet sich nur in der Epitelschicht.

---

Il problema fisiologico derivato dalle osservazioni sull'azione coadiuvante del glucosio aggiunto alle soluzioni saline destinate alla perfusione del cuore e messo in luce per la prima volta da RINGER e LOCKE <sup>(1)</sup>, fu successivamente esaminato da NEUKIRCH e RONA <sup>(2)</sup> in un insieme di ricerche sulla muscolatura dell'intestino di coniglio. Questi Autori dimostrarono l'esaurimento che si osserva nella attività spontanea delle preparazioni di intestino conservato fuori dell'organismo in una soluzione fisiologica senza glucosio, il rapido ripristino delle contrazioni provocate dalla successiva aggiunta di zucchero, il consumo del glucosio nel liquido nutritivo e la possibilità di sostituire con altri zuccheri, quale il lattosio e il galattosio, e con l'acido piruvico l'azione nutritiva caratteristica del glucosio. Tali ricerche sull'azione farmacologica dei sostituenti del glucosio sono state confermate ed estese in seguito da FELDBERG e SOLANDT <sup>(3)</sup> e da BOVET, BOVET-NITTI, CHAIN e BELOFF-CHAIN <sup>(4)</sup>.

Ci è sembrato interessante utilizzare la preparazione dell'intestino isolato di coniglio, conservato in soluzione salina con o senza glucosio, allo scopo di portare nuovi dati sulla natura e l'utilizzazione delle riserve contenute nell'intestino e l'origine del fenomeno di esaurimento osservato in vitro.

## TECNICA.

Il glucosio presente nel sangue e negli intestini è stato determinato seguendo il metodo colorimetrico di MILLER-VAN SLYKE (<sup>5</sup>); per il dosaggio nel muscolo liscio si preleva un frammento di tessuto lavato con Tyrode senza glucosio, che asciugato con carta da filtro e pesato alla bilancia a torsione (circa 60 mg) viene messo in 1 cm<sup>3</sup> di soluzione di solfato acido di cadmio e omogeneizzato con sabbia depurata mediante un Potter; successivamente si aggiungono altri 3 cm<sup>3</sup> di solfato acido di cadmio che servono anche per il lavaggio dell'omogeneizzatore.

Il dosaggio del glicogeno è stato eseguito con il metodo di WALAAS e WALAAS (<sup>6</sup>) nelle condizioni generalmente usate per il diaframma di ratto.

I dati sono stati espressi in mg di glucosio o glicogeno per 100 cm<sup>3</sup> di sangue e rispettivamente per 100 g di tessuto.

Istologicamente il glicogeno è stato messo in evidenza con l'acido fucsino-solforoso secondo BAUER (<sup>7</sup>); mentre i nuclei sono stati colorati con l'emallume di MAYER (\*).

Negli esperimenti sull'intestino isolato è stata usata la soluzione ossigenata salina secondo Tyrode (NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; CaCl<sub>2</sub> 0,1 g/l; NaHCO<sub>3</sub> 1 g/l; MgCl<sub>2</sub> 0,1 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 g/l; glucosio 1 g/l) omettendo talvolta il glucosio. Si è dimostrata utile l'aggiunta di antibiotico (terramicina Pfizer 0,01 g/l) allo scopo di impedire lo sviluppo batterico.

La registrazione dell'attività spontanea nei segmenti di intestino e l'effetto provocato dall'aggiunta di acetilcolina (0,1 mg/l ogni mezza ora), è stata realizzata secondo la tecnica di SCHILD (<sup>8</sup>), con congegno automatico per la messa in moto del chimografo e per il rinnovo delle soluzioni ogni 30 minuti e per 3 ore.

Immediatamente dopo aver sacrificato l'animale, si preleva il sangue e una parte di intestino (digiuno), di cui una sezione serve come test per il dosaggio del glucosio e del glicogeno; gli altri segmenti del medesimo digiuno vengono immersi nella soluzione salina con o senza glucosio per la registrazione grafica della motilità; dopo le tre ore di esperienza si procede al dosaggio del glicogeno e del glucosio in ogni tratto di intestino.

## PARTE SPERIMENTALE.

In una prima serie di esperienze è stato preso in considerazione il glucosio e il glicogeno presente nell'intestino normale e a digiuno e i suoi rapporti con la glicemia.

---

(\*) Teniamo a ringraziare vivamente qui il Prof. G. LELLI e il Dott. ARANGIO RUIZ i quali hanno compiuto la parte istologica di questo lavoro.

L'intestino di coniglio normale contiene circa 80-100 mg di glucosio per 100 gr di tessuto fresco.

Il livello del glucosio presenta una forte diminuzione nell'animale tenuto a digiuno da 24 a 48 ore abbassandosi fino a 40-60 mg.

Per quanto riguarda il confronto tra il tasso di glucosio nell'intestino e nel sangue, si osserva che mentre è sensibilmente uguale nell'animale normale si abbassa invece maggiormente nell'intestino che non nel sangue durante il digiuno.

E' interessante di notare inoltre che il tasso di glucosio intestinale non segue le variazioni della glicemia nei casi di ipoglicemia o di iperglicemia sperimentale. Abbiamo potuto mettere in evidenza questo fatto trattando gli animali per l'iperglicemia con 0,4 mg/kg di adrenalina 30 minuti prima del prelievo e per l'ipoglicemia somministrando, dopo un digiuno di 16 ore, 0,5 Unità Internazionali di insulina per via i.m. due ore prima del prelievo. I risultati di queste prove sono riportati nella Tabella 1.

TABELLA 1.

Quantità di glicogeno presente nel sangue e negli intestini di conigli normali, a digiuno, trattati con adrenalina ed insulina (\*).

| Animali                                                                            | Glicemia | Glucosio<br>(mg/100 g tessuto)<br>intestino normale |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------|
| Alimentazione normale . . . . .                                                    | 91±6,4   | 91,5±6,5                                            |
| a digiuno da 24 ore . . . . .                                                      | 68±1,7   | 51±5,2                                              |
| trattati con adrenalina (0,4 mg e.p. 1/2 h.<br>prima) . . . . .                    | 182±13,1 | 78±8,0                                              |
| trattati con insulina (1/2 U.I. i.m. dopo<br>16 h. di digiuno e 2 ore prima) . . . | 39±1,4   | 72,5±5,4                                            |

(\*) Ogni dato corrisponde alla media di 4 conigli.

Il contenuto di glicogeno nell'intestino di coniglio è di circa 40-60 mg per 100 gr di tessuto senza sensibili differenze tra gli intestini normali o digiuni. Questi dati si possono riavvicinare a quelli da noi trovati nell'utero (45 mg) e nel rene (capsula) (41 mg) del coniglio stesso mentre la maggiore quantità si è riscontrata nel muscolo striato (quadricepite) (90 mg) e naturalmente nel fegato (903 mg). Tali risultati concordano con quelli trovati nella letteratura per i muscoli lisci (<sup>9-10</sup>).

Inoltre VAN DYKE <sup>(11)</sup> sperimentando su diverse porzioni di utero di scimmia ha trovato una quantità di glicogeno che varia da 66-98 mg per 100 di tessuto fresco, mentre WALAAS <sup>(12)</sup> nell'utero di ratto a diversi stadi ne ha riscontrato quantità variabili da 48-96 mg.

L'esame istologico ha messo particolarmente in evidenza la presenza del glicogeno solo nelle cellule dell'epitelio di rivestimento della mucosa, mentre è risultato privo di esso lo strato muscolare (Fig. 4).

In una seconda serie di esperienze abbiamo osservato che il glucosio negli intestini isolati subisce notevoli variazioni sia in rapporto allo stato di nutrizione dell'animale che alla presenza del glucosio nella soluzione

TABELLA 2.

Variazione del glucosio (mg/100g di tessuto fresco) contenuto negli intestini isolati in soluzione di Tyrode con e senza glucosio. (\*)

| Animali                | Glicemia | Intestino normale | Intestino per 3 ore in Tyrode senza glucosio | Intestino per 3 ore in Tyrode con glucosio |
|------------------------|----------|-------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Coniglio nutrito . . . | 110      | 113,9<br>105,4    | 58,4<br>36,5                                 | 127,9                                      |
| ” . . .                | 90       | 64,4<br>64,0      | 55,3<br>42,1                                 | 58,3<br>45,4                               |
| ” . . .                | 87       | 104,1<br>89,6     | 58,3                                         | 55,0<br>54,0                               |
| ” . . .                | 80       | 95,5<br>95,1      | 59,0                                         | 85,4<br>82,5                               |
| MEDIA . . .            | 91 ± 6,4 | 91,5 ± 6,5        | 51,6 ± 4                                     | 72,6 ± 10,8                                |
| Coniglio digiuno . . . | 74       | 57,4<br>50,7      | 47,5<br>35,3                                 | 57,1<br>44,6                               |
| ” . . .                | 68       | 63,7<br>58,4      | 40,0<br>38,0                                 | 91,4<br>82,3                               |
| ” . . .                | 67       | 39,0<br>20,3      | 25,8<br>15,3                                 | 101,7                                      |
| ” . . .                | 65       | 64,5<br>54,2      | 38,5<br>25,4                                 | 57,1<br>45,6                               |
| MEDIA . . .            | 68 ± 1,7 | 51 ± 5,2          | 33,2 ± 3,6                                   | 68,5 ± 8,7                                 |

(\*) Sono stati eseguiti due dosaggi per ogni segmento di intestino.

salina in cui vengono immersi, determinando inoltre un diverso comportamento della risposta motrice del muscolo all'acetilcolina.

Il dosaggio del glucosio ci ha dato risultati che concordano con l'andamento grafico registrato sul chimografo. Per gli intestini di conigli normali si trova nei test una media di 91 mg per 100 gr. di tessuto che diminuisce dopo 3 ore a 72 mg in quelli immersi in Tyrode glucosato normale e a 51 mg in quelli in Tyrode senza glucosio; mentre negli intestini di conigli tenuti a digiuno e nelle stesse condizioni sperimentali dei precedenti, si trovano rispettivamente le medie di 51; 68; 33 mg di glucosio per 100 gr di tessuto (Tab. 2).

La minore quantità di glucosio intestinale presente negli intestini di conigli a digiuno da 24 h rispetto a quelli di conigli normali, determina un più rapido esaurimento dell'attività spontanea quando vengono immersi in Tyrode senza glucosio. Infatti l'intestino isolato di coniglio normale dopo 3 ore di esperienza ha un tono muscolare elevato nell'ampiezza e nella risposta all'acetilcolina, mentre si può osservare la quasi totale scomparsa di esso nell'intestino isolato di coniglio digiuno (Figg. 2 e 3).

In base a precedenti prove realizzate con l'aggiunta di alcuni acidi grassi al liquido nutritivo (<sup>4</sup>), abbiamo ripetuto l'esperienza aggiungendo acido butirrico all'1/1000 al Tyrode privo di glucosio, e abbiamo osservato che pur non determinandosi alcun fenomeno di esaurimento da parte dell'intestino, tuttavia la quantità di glucosio in esso contenuta diminuisce sensibilmente rispetto a quella iniziale allo stesso modo di quanto si verifica negli intestini isolati in Tyrode senza glucosio.

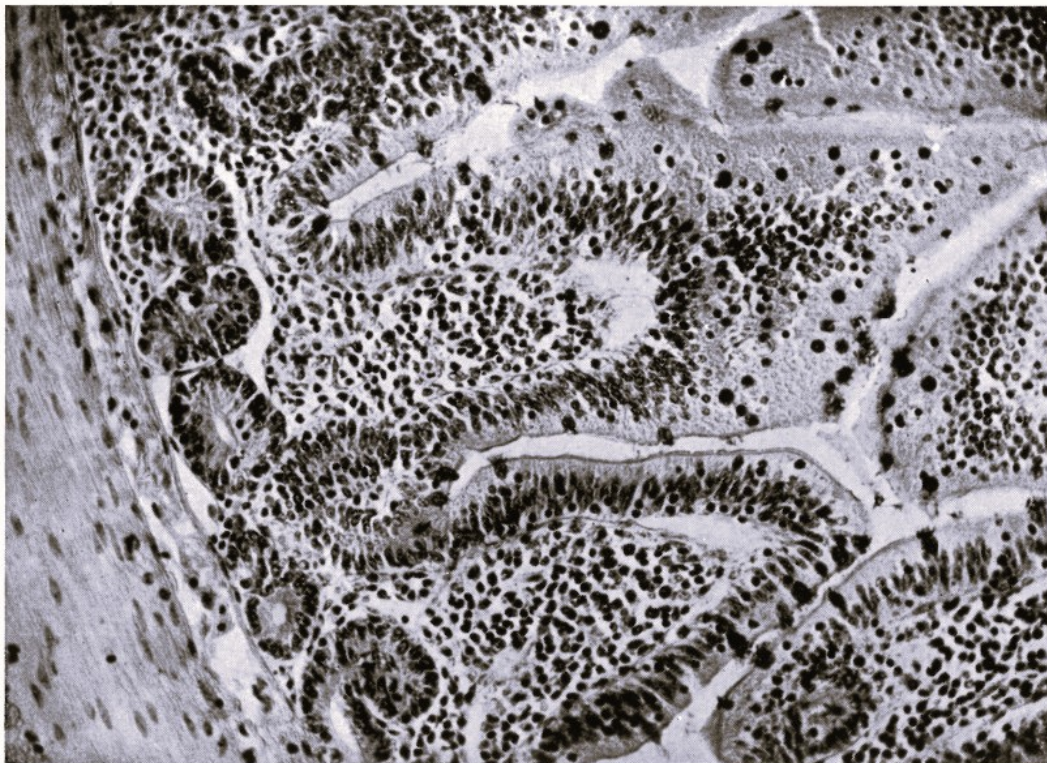
Da queste esperienze è risultata, come per il glucosio, anche una diminuzione di glicogeno negli intestini isolati in Tyrode glucosato normale e senza glucosio (Tab. 3); ciò è stato inoltre dimostrato istologicamente (fig. 4).

Dopo 3 ore pur essendo ancora presente qualche traccia di glicogeno si osserva la scomparsa dell'epitelio (fig. 5); data la localizzazione del

TABELLA 3.

Variazioni del glicogeno (mg/100 g di tessuto fresco) contenuto negli intestini isolati in soluzione di Tyrode con e senza glucosio (media di 8 conigli).

| Intestino normale | Intestino isolato per 3 ore in soluzione di Tyrode senza glucosio | Intestino isolato per 3 ore in soluzione di Tyrode con glucosio |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 49,2 ± 5,2        | 26,8 ± 2,6                                                        | 39,1 ± 6,3                                                      |



*Fig. 1.* - Segmento di intestino fissato immediatamente dopo la morte dell'animale.

Parete del digiuno. Mucosa, sottomucosa e parete della tonaca muscolare (a sinistra).

Nell'epitelio cilindrico di rivestimento si rileva presenza in molte cellule di un contenuto di glicogeno (in nero) messo in evidenza con la colorazione specifica di Bauer. Il glicogeno risulta contenuto nel muco a livello delle cellule caliciformi. È assolutamente assente nello spessore dello strato muscolare.

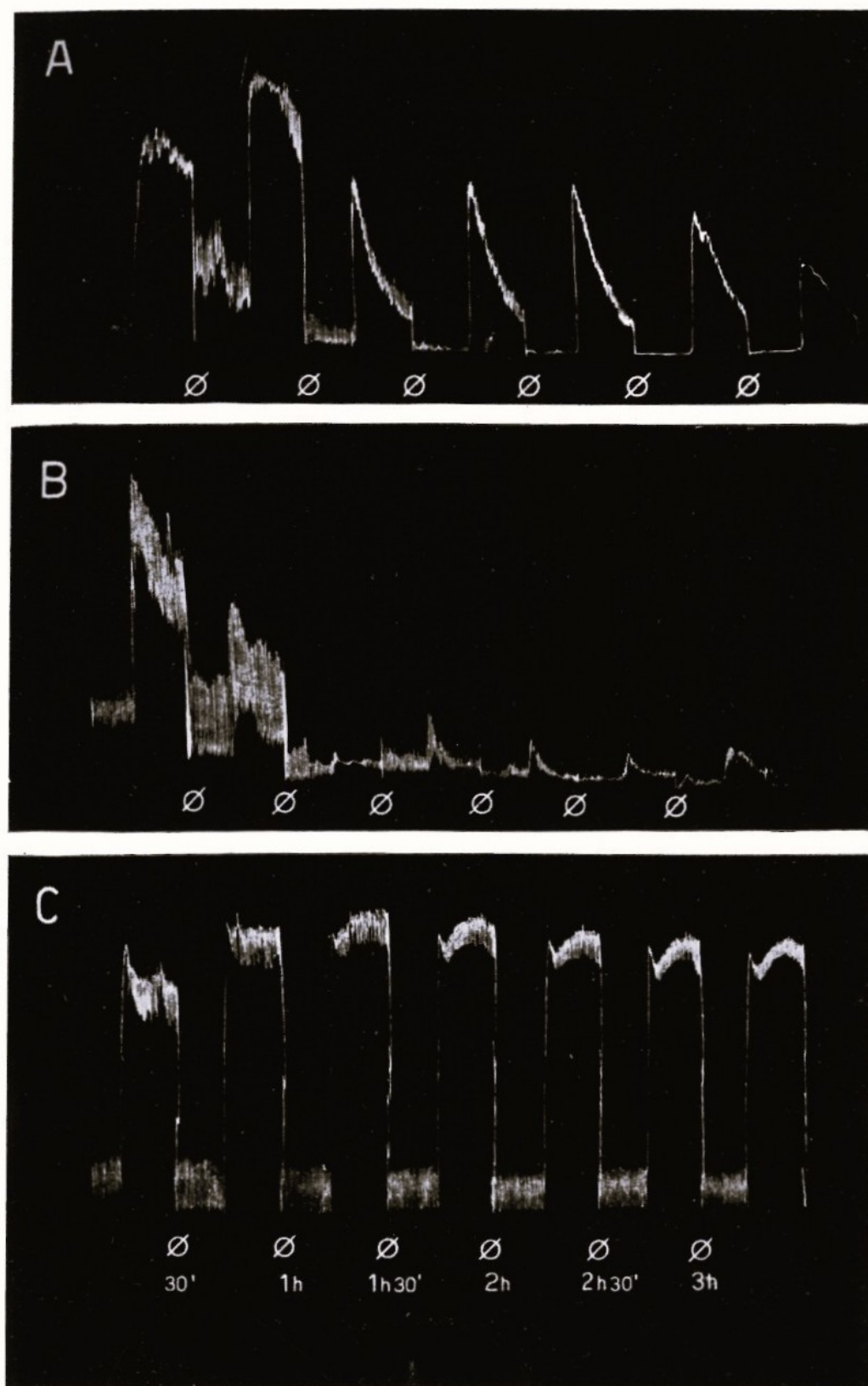


Fig. 2. - Attività spontanea e risposta all'acetilcolina dell'intestino isolato di coniglio.

Ogni 30 minuti il chimografo si mette in moto automaticamente per 4 minuti, e viene registrata la risposta motrice all'aggiunta di 0,1 mg/l di acetilcolina.

Al punto Ø il chimografo si ferma e il Tyrode viene rinnovato.

A) Intestino di coniglio normale in Tyrode senza glucosio.

B) Intestino di coniglio a digiuno in Tyrode senza glucosio.

C) Intestino di coniglio a digiuno in Tyrode con glucosio.

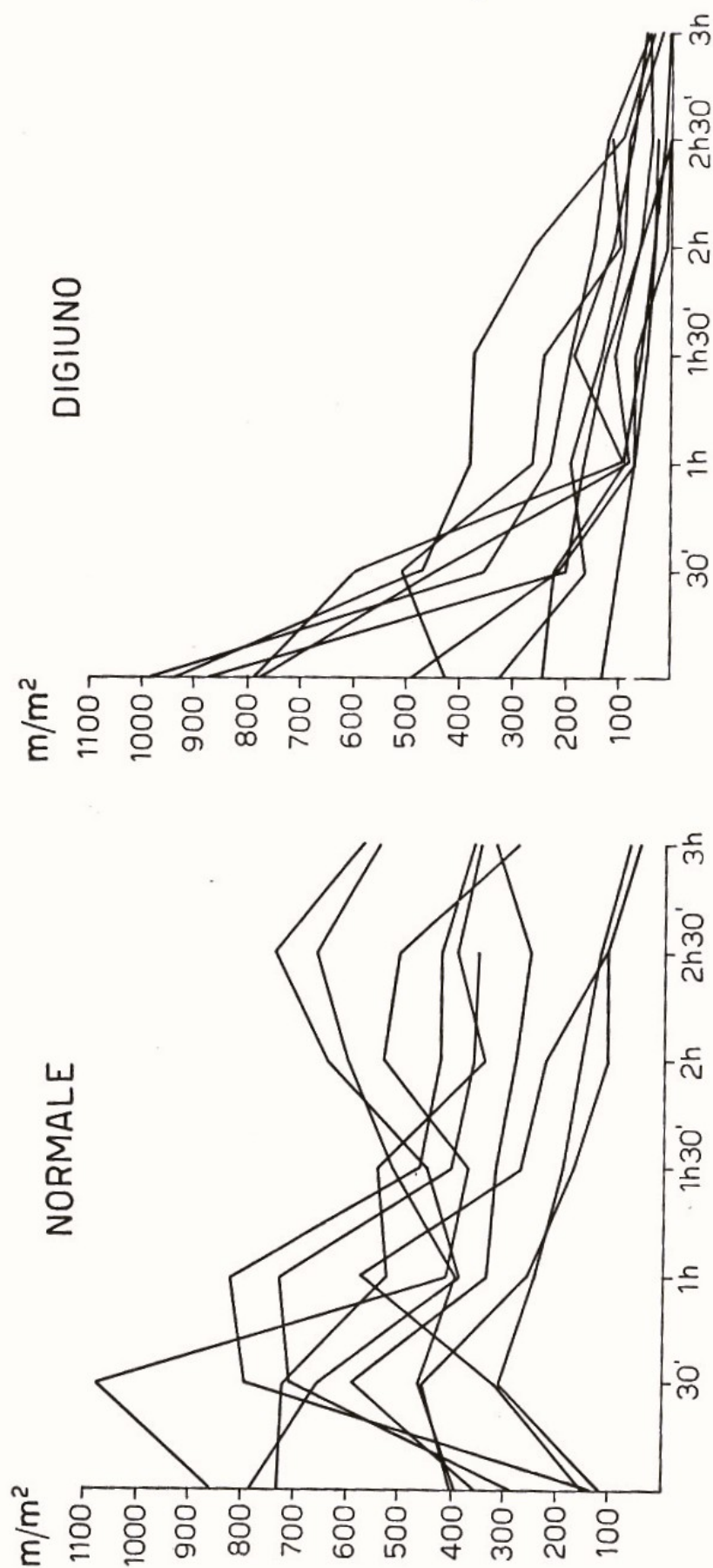


Fig. 3. - Variazioni dell'area della contrazione da acetilcolina espressa in  $mm^2$  nella registrazione grafica della motilità dell'intestino isolato. Fenomeni di esaurimento del muscolo in soluzione di Tyrode priva di glucosio.

Le aree corrispondono all'ampiezza della risposta all'acetilcolina ( $0,1 \text{ mg/l}$ ) registrata sul chimografo ogni 30 minuti per 3 ore (10 segmenti intestinali di conigli normali e 10 di conigli a digiuno).

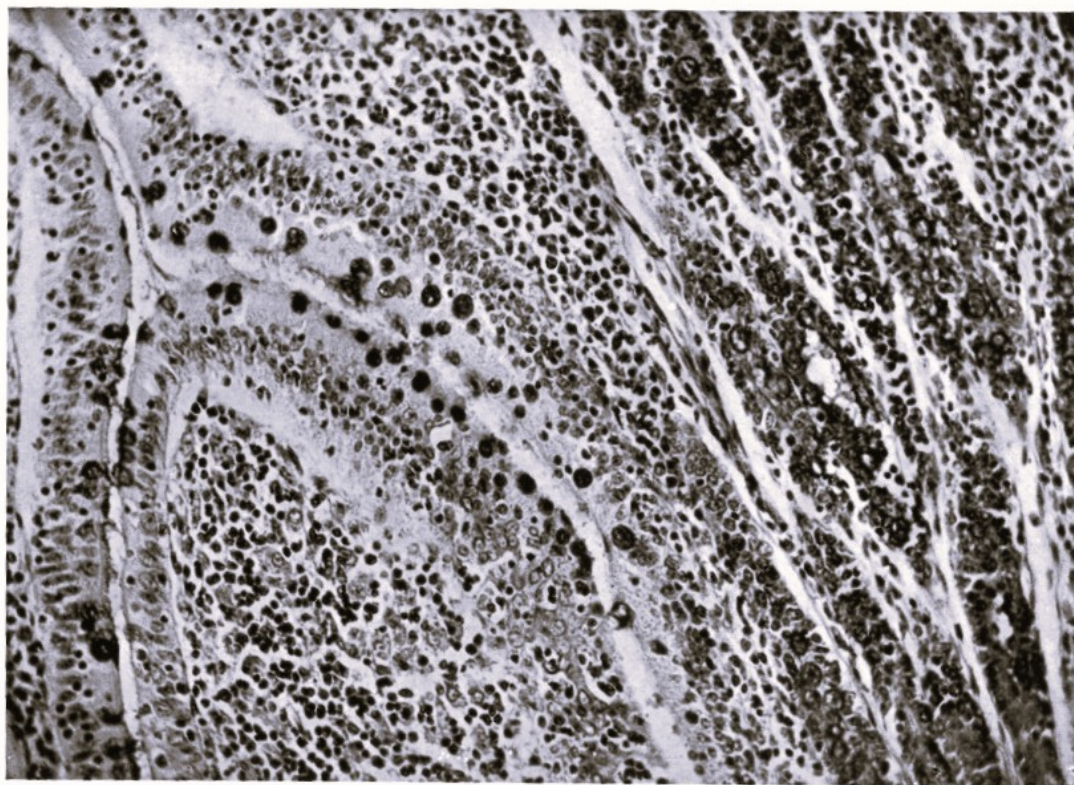


Fig. 4. - Segmento di intestino fissato immediatamente dopo la morte dell'animale.

~~Parete del duodeno~~ Mucosa e sottomucosa.

Molte cellule dell'epitelio cilindrico della mucosa presentano gocce di sostanza mucoide tingibile con la colorazione di Bauer per il glicogeno e di colorito nerastro nella figura. Nella sottomucosa (a destra) sono presenti ghiandole di Brunner con epiteli di colorito più scuro (reazione tintoriale del glicogeno leggermente positiva su tutto il corpo cellulare) di quelli che rivestono la mucosa e le sue ghiandole.

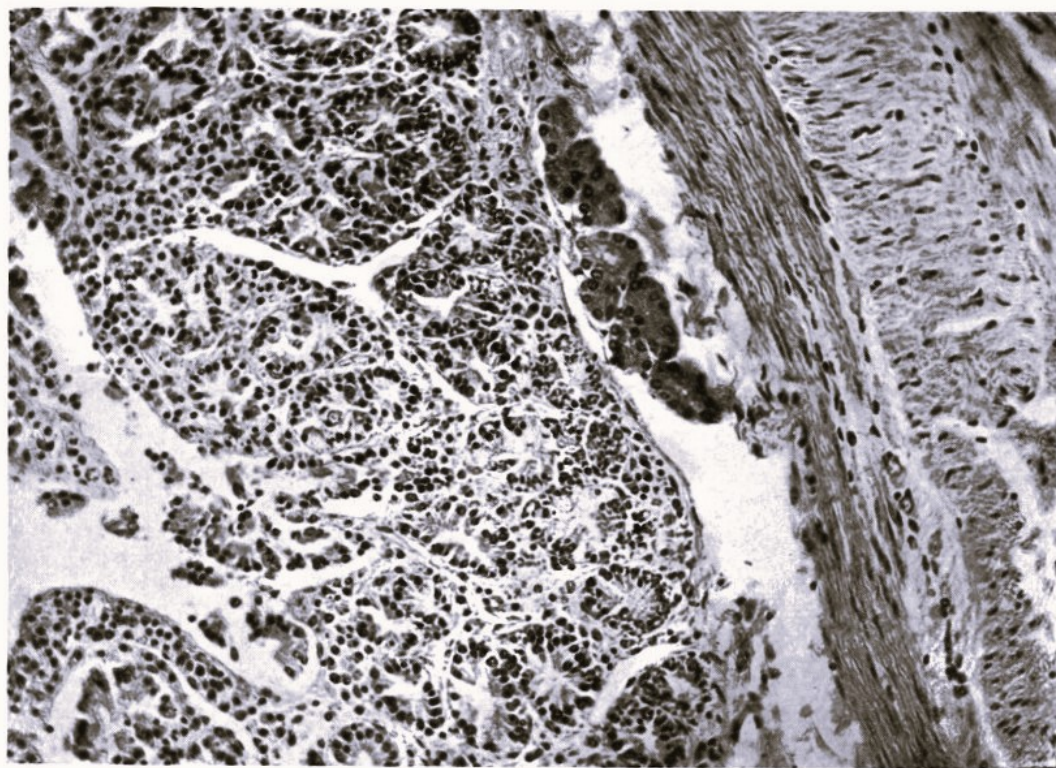


Fig. 5. - Segmento di intestino fissato dopo tre ore di immersione nel Tyrode.

**Parete del duodeno.** Mucosa e sottomucosa e parte della parete muscolare. La colorazione di Bauer non ha messo in evidenza contenuto di glicogeno nè a livello della mucosa nè degli elementi muscolari. Le ghiandole di Brunner della sottomucosa presentano un colorito più scuro in conseguenza di una reazione tintoriale leggermente positiva di tutto il corpo cellulare.

glicogeno che è normalmente limitata alle cellule mucipare e mai esteso alle fibre muscolari lisce, appare incerto che esso possa essere utilizzato da parte del muscolo essendo troppo distante dallo strato epiteliale.

## DISCUSSIONE

Le esperienze riportate stanno a dimostrare come i fenomeni che si manifestano nella preparazione di intestini isolati immersi in soluzione fisiologica senza glucosio, e che si traducono con una sempre più breve e meno completa risposta motrice ai farmaci contratturanti, siano legati all'esaurimento delle riserve di glucosio contenuto nei tessuti normali.

Mentre con una quantità piuttosto elevata di glucosio tissulare presente nell'intestino di coniglio nutrito, si è osservata una relativa costanza della reazione motrice, negli animali a digiuno che presentano un tasso iniziale piuttosto basso del glucosio intestinale si nota molto prima la caratteristica reazione di esaurimento.

Negli intestini isolati in Tyrode senza glucosio e con acido butirrico si è osservato d'altra parte il mantenimento di una normale attività spontanea e di una forte risposta all'acetilcolina anche dopo esaurimento delle riserve del glucosio tissulare.

Il tasso del glucosio intestinale si è dimostrato relativamente indipendente dalla glicemia, sia nell'ipoglicemia insulinica, sia nell'iperglicemia adrenalinaica.

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

## BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) F. S. LOCKE - J. Physiol., 18: 332 (1895).
- (<sup>2</sup>) P. NEUKIRCH; P. RONA - Arch. ges. Physiol., 144: 553 (1912); 148: 273 (1912).
- (<sup>3</sup>) W. FELDBERG; O. M. SOLANDT - J. Physiol., 101: 137 (1942).
- (<sup>4</sup>) D. BOVET; F. BOVET-NITTI; E. B. CHAIN; A. BELOFF-CHAIN - Rend. Acc. Naz. Lincei, 12: 44 (1952).
- (<sup>5</sup>) D. D. MILLER VAN-SLYKE - J. Biol. Chem., 114: 582 (1936).
- (<sup>6</sup>) O. WALAAS; E. WALAAS - J. Biol. Chem., 187: 769 (1950).
- (<sup>7</sup>) E. BUJARD - Abrégé de Technique Microscopique, 82: (1950).
- (<sup>8</sup>) H. O. SCHILD - Brit. J. Pharmacol., 2: 189 (1947).
- (<sup>9</sup>) E. G. BOETTIGER - J. Cell. Comp. Physiol., 27: 9 (1947).
- (<sup>10</sup>) D. SILIPRANDI; N. SILIPRANDI - Arch. Sc. Biol., 33: 453 (1951).
- (<sup>11</sup>) H. B. VAN DYKE; G. CH'EN - Amer. J. Anat., 58: 473 (1936).
- (<sup>12</sup>) O. WALAAS - Acta endocrinol., 10: 175 (1952).