

62. A. BELOFF-CHAIN, R. CATANZARO, E. B. CHAIN, L. LONGINOTTI, I. MASI, F. POCCHIARI e C. ROSSI. — **Influenza del 2-4-dinitro-fenolo sul metabolismo del glucosio e del fosfato in diaframma di ratto. (*)**

Riassunto. — E' stata studiata l'influenza del 2-4-dinitro-fenolo ($4,8 \times 10^{-5}$ molare) sul metabolismo del glucosio e del fosfato sul diaframma isolato di ratto.

Il muscolo è stato incubato per 90' a 37° con glucosio uniformemente marcato C^{14} e con fosfato P^{32} , rispettivamente.

E' stato trovato che il DNF ostacola l'accumulo degli intermedi fosforilati e di sintesi ed aumenta la formazione del CO_2 dal glucosio ed il consumo totale di O_2 del muscolo.

Sono riportati anche i risultati di un'esperienza che dimostra che durante i primi quindici minuti di incubazione con glucosio marcato C^{14} il muscolo, mentre sintetizza una considerevole quantità di glicogeno forma molto poca CO_2 .

Résumé. — L'influence du 2-4-dinitrophénol ($4,8 \times 10^{-5}$ mol.) sur le métabolisme du glucose et du phosphate sur le diaphragme isolé de rat a été étudiée.

Le muscle a été incubé pendant 90' à 37° avec du glucose uniformément marqué C^{14} et avec du phosphore P^{32} .

On a trouvé que le DNF empêche l'accumulation des intermédiaires phosphorylés et de synthèse et augmente la formation de CO_2 du glucose et la consommation totale par le muscle de O_2 .

On reporte aussi les résultats d'une expérience qui démontre que, pendant les 15 premières minutes d'incubation avec du glucose marqué C^{14} , le muscle, tandis qu'il synthétise une quantité considérable de glycogène forme très peu de CO_2 .

Summary. — The influence of 2,4-Dinitrophenol (4.8×10^{-5} M) on glucose and phosphate metabolism in isolated rat diaphragm has been studied. The muscle was incubated for 90' at 37° with uniformly labeled C^{14} glucose and P^{32} labeled phosphate respectively.

It was found that DNP prevents the accumulation of synthetic and phosphorylated intermediates, and augments the formation of CO_2 from glucose and the total O_2 consumption of the muscle.

(*) Nota presentata all'Accademia Nazionale dei Lincei nella seduta del 13 giugno 1953.

The results of an experiment are reported which demonstrate that during the first fifteen minutes of incubation with C^{14} labeled glucose the muscle synthesizes a considerable amount of glycogen but forms very little CO_2 .

Zusammenfassung. — Es wurde der Einfluss des 2-4-Dinitrophenols ($4,8 \cdot 10^{-5}$ molar) auf den Zucker- und Phosphatumsatz des isolierten Rattenzwerchfells untersucht.

Der Muskel wurde für 90 Min bei 37° im Brutschrank mit Glukose von C^{14} bzw. mit Phosphat von P^{32} behandelt. Es stellte sich heraus, dass das Dinitrophenol die Anhäufung von Phosphorilat-Zwischenstufen sowie von Synthesen verhindert und gleichzeitig die Bildung von CO_2 aus der Glukose und den Gesamtverbrauch an O_2 des Muskels vermehrt.

Es werden auch die Ergebnisse einer Erfahrung mitgeteilt, die beweist, dass während der ersten 15 Min. im Brutschrank mit Glukose von C^{14} , der Muskel sehr wenig CO_2 bildet, während er eine beträchtliche Menge von Glykogen synthetisiert.

L'effetto dell'insulina sul metabolismo del glucosio nel diaframma isolato di ratto è stato già descritto in una precedente nota ⁽¹⁾. Nella presente comunicazione è stata studiata l'influenza del 2-4-dinitrofenolo (DNF) sulla distribuzione del C^{14} nel diaframma di ratto incubato con glucosio uniformemente marcato.

Secondo VILLEE, DEANE e HASTINGS ⁽²⁾ incubando un diaframma di ratto con glucosio al 0,2%, l'aggiunta del DNF ad una concentrazione finale 5×10^{-5} molare, oltre ad aumentare il consumo di ossigeno e ad inibire quasi completamente la formazione di glicogeno, provoca una diminuzione nella scomparsa di glucosio dal mezzo, mentre d'altra parte aumenta la quantità di glucosio metabolizzata a CO_2 .

PIERCE e FIELD ⁽³⁾, incubando il diaframma di ratto con glucosio allo 0,1%, in presenza di DNF ad una concentrazione molare del $4,76 \times 10^{-5}$ hanno ottenuto una rapida glicogenolisi, un forte aumento nel consumo di ossigeno e non hanno trovato alcun effetto statisticamente significativo sulla scomparsa del glucosio.

Nel presente lavoro sono state eseguite due esperienze, ognuna incubando separatamente per 90 minuti a $37^\circ C$ quattro pezzi di circa 40 mg del diaframma di un ratto: nella esperienza 1 il diaframma è stato immerso per 3 minuti in DNF ⁽⁴⁾ e quindi incubato con glucosio uniformemente marcato C^{14} allo 0,1% contenente DNF $4,8 \times 10^{-5}$ molare; nella esperienza 2, invece, il DNF è stato aggiunto dal braccio laterale della

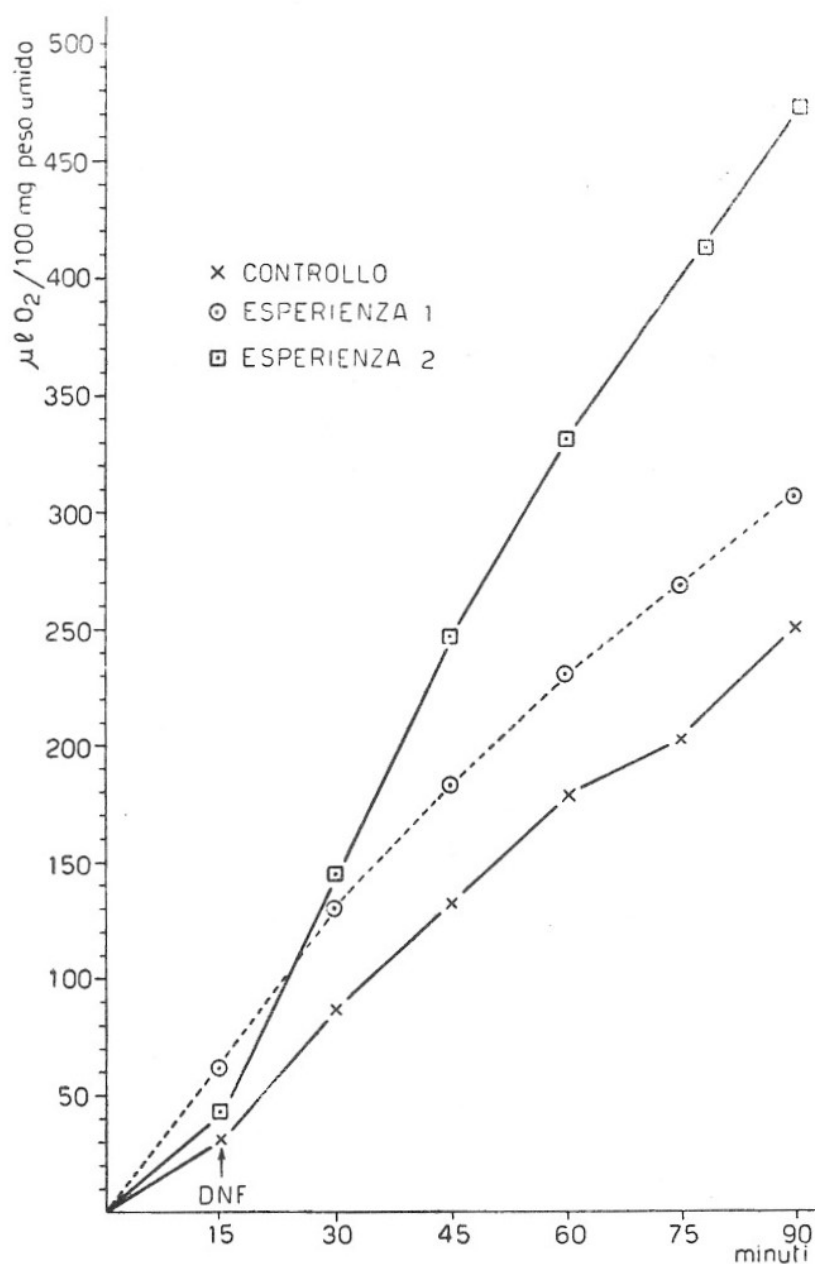


Fig. 1. - *Influenza del DNF sul consumo di ossigeno.* (Nell'esperienza 1 il diaframma, precedentemente trattato con DNF per 3 minuti, è stato incubato nel mezzo contenente DNF. Nell'esperienza 2 il DNF è stato aggiunto al mezzo dopo 15 minuti di incubazione del diaframma).

vaschetta di Warburg dopo avere incubato il diaframma per 15 minuti con glucosio marcato allo 0,1%. Per controllo, in ambedue le esperienze, due dei quattro pezzi del diaframma sono stati incubati, nelle medesime condizioni, ma senza DNF.

Il consumo di ossigeno durante l'incubazione, misurato secondo la usuale tecnica di Warburg, è rappresentato nella fig. 1. Si vede chiaramente che mentre nell'esperienza 1 il consumo di ossigeno è maggiore

che nel controllo soltanto nei primi 30 minuti, nell'esperienza 2 esso è nettamente superiore al controllo per tutto il periodo di incubazione.

La misura della radioattività dell'estratto alcoolico-acquoso del mezzo dopo incubazione e della CO_2 è stata eseguita con la stessa tecnica descritta in una nota precedente ⁽¹⁾; questa volta però è stato possibile misurare la radioattività delle singole macchie della zona 1 che è stata meglio frazionata (fig. 2) ed inoltre, ricromatografando la zona 3 in butanolo-acido acetico-acqua, si è potuto separare il glucosio da un'altra sostanza, probabilmente un estere fosforilato. La zona comprendente gli Rf 0,55-0,74, cioè quella tra la macchia del glucosio e la macchia dell'acido lattico, del radiocromatogramma del mezzo è stata poi misurata quantitativamente, poichè, questa volta, mostrava una considerevole attività. Infine il glicogeno del residuo insolubile, digerito in KOH al 30%, è stato precipitato con alcool ed idrolizzato secondo il metodo di WALAAS e WALAAS ⁽⁵⁾; dell'idrolizzato cromatografato è stata poi misurata la radioattività. Tutti i valori delle singole radioattività sono riportati nella tabella 1.

TABELLA 1.

Influenza del 2-4-dinitrofenolo (DNF) sulla distribuzione del C^{14} dopo incubazione del diaframma di ratto con glucosio uniformemente marcato.

(Nell'esperienza 1 il diaframma, precedentemente trattato con DNF per 3 minuti, è stato incubato nel mezzo contenente DNF. Nell'esperienza 2 il DNF è stato aggiunto al mezzo dopo 15 minuti di incubazione del diaframma. Concentrazione molare del DNF nel mezzo = $4,8 \times 10^{-5}$. I risultati sono espressi in % delle radioattività totali ritrovate).

Esperienze	DNF	CO ₂	Acido lattico	Mezzo Rf = 0,74 0,55	Estratto alcoolico acquoso						Glico- geno da residuo insolu- bile
					Zona 1			Zona 2	Zona 3		
					Rf=0	Rf=0,03	Rf=0,07	Rf=0,16	Glucosio	*	
1	+	10	29,3	26,7	4,7	1,5	3,5	4,1	7,2	3,5	9,1
	+	8,6	34,2	29,8	3,5	0,8	2,4	2,1	8,2	1,6	7,8
	—	36,6	9,1	24,8	0,3	0	0	0,4	28,5	0	0
	—	47,7	9,0	18,8	0,2	0	0	0,5	23,5	0	0
2	+	14,2	19,8	42,0	2,5	1,1	1,5	1,2	12,0	1,3	4,8
	+	6,3	20,6	34,6	7,8	2,5	3,5	2,8	8,3	2,9	9,4
	—	40	19,0	30,9	0,2	0	0,1	0,6	8,8	0	0
	—	50,5	18,0	21,6	0,2	0	0,2	0,2	9,0	0	0

(*) Radioattività della macchia, probabilmente dovuta a intermedi fosforilati che si è separata dal glucosio ricromatografando la zona 3 in butanolo-acido acetico-acqua (4:1:5).

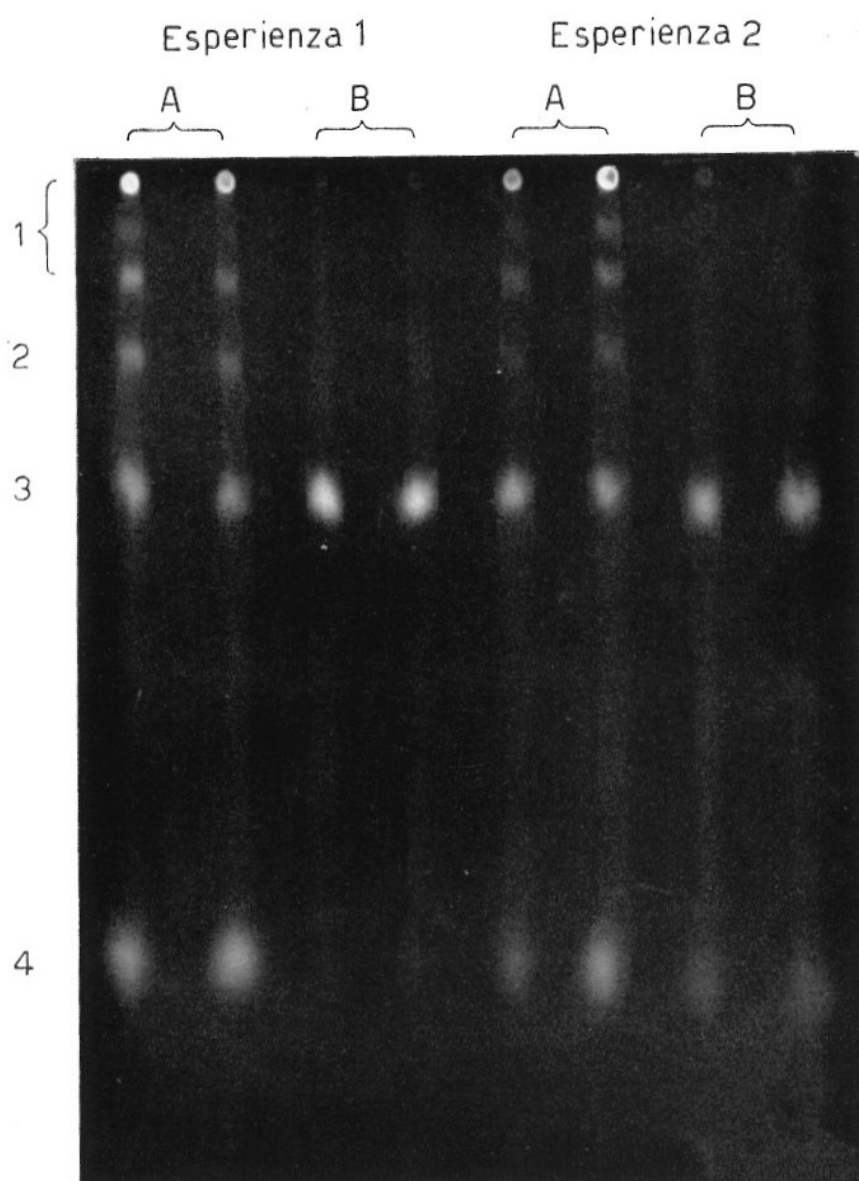


Fig. 2. - Radioautografia dei cromatogramma degli estratti alcoolico-acquosi di diaframma di ratto, incubati con glucosio uniformemente marcato C^{14} con e senza DNF.

A = Controllo.

B = +DNF.

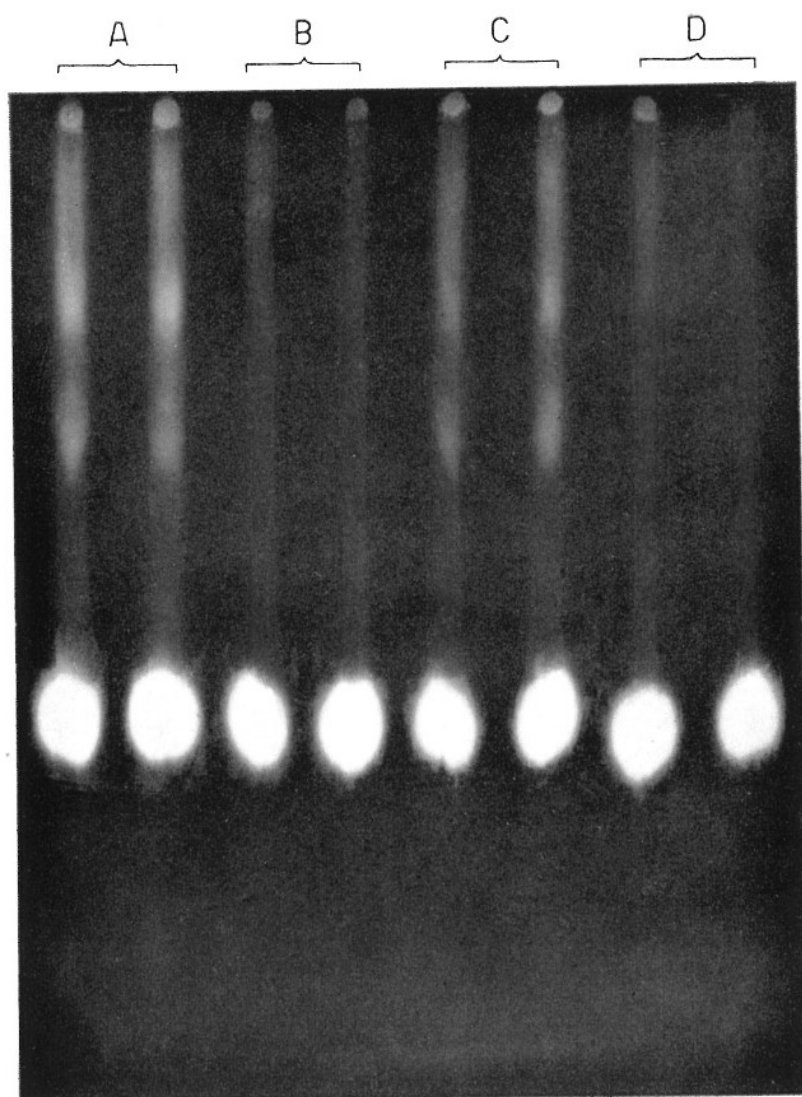


Fig. 4 - Radioautografia dei cromatogrammi degli estratti alcoolico-acquosi di diaframma di ratto, incubati con $P^{32}O_4^{--}$ con e senza DNF.

A = Controllo con glucosio.
C = Controllo senza glucosio.

B = +DNF con glucosio.
D = +DNF senza glucosio.

Da tali risultati è evidente che in ambedue le esperienze in presenza di DNF tutte le attività delle macchie delle zone 1 e 2 del radio-cromatogramma dell'estratto alcoolico-acquoso sono notevolmente diminuite o del tutto annullate (vedi anche fig. 2), che non vi è glicogeno nel residuo insolubile, e che, ricromatografando la zona 3 in butanolo-

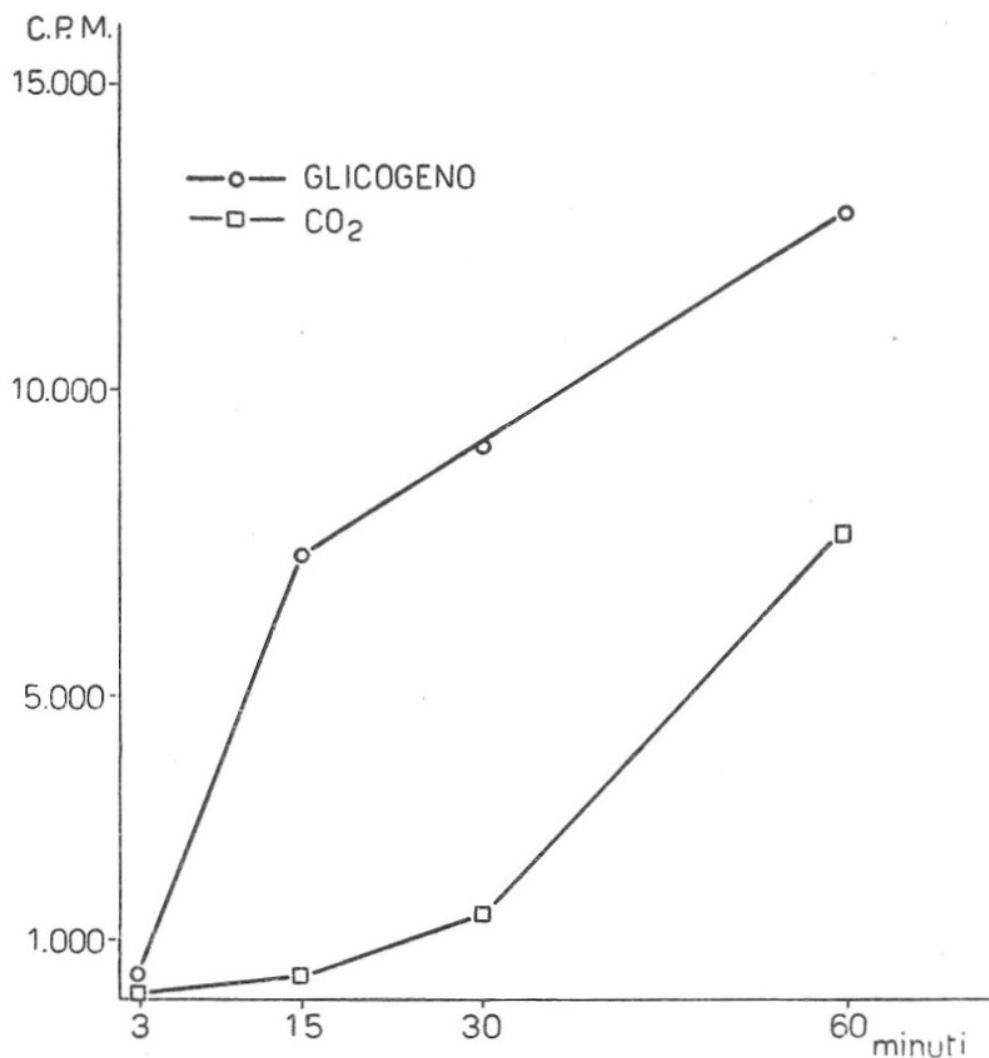


Fig. 3. - Radioattività del glicogeno e della CO₂ formati dal diaframma di ratto incubato con glucosio uniformemente marcato C¹⁴. (C.P.M. = counts per minuto).

acido acetico-acqua non si trova alcuna traccia di sostanze fosforilate; risulta inoltre, in accordo con VILLEE e coll. (2), che la quantità di glucosio metabolizzato a CO₂ aumenta notevolmente. Nell'esperienza 1 si è inoltre trovato che il DNF fa aumentare la quantità di glucosio non trasformato presente nell'estratto alcoolico-acquoso e diminuire la quantità di acido lattico prodotto; bisogna ancora notare che in queste con-

dizioni l'utilizzazione del glucosio del mezzo è ridotta del 30% circa rispetto al controllo.

Una probabile spiegazione, ma non la sola, di questi risultati potrebbe essere che il glucosio sia prima sintetizzato a glicogeno o ad altri prodotti di sintesi e quindi metabolizzato a CO_2 e che l'effetto del DNF sia quello di accelerare questo catabolismo a CO_2 .

Per convalidare l'ipotesi che la formazione del glicogeno preceda quella della CO_2 è stata studiata la velocità di formazione di ambedue

TABELLA 2.

Rf delle macchie presenti nelle radioautografie dei cromatogramma del mezzo contenente fosfato marcato P^{32} e dell'estratto alcoolico acquoso di diaframma incubato.

<i>Mezzo di incubazione</i>	<i>Estratto alcoolico acquoso</i>
	0
0,30	0,20
0,37	0,30
	0,35
	0,51
0,65	0,65
0,75	0,76
	0,91

incubando il diaframma con glucosio marcato per 3, 15, 30 e 60 minuti. I risultati di questa esperienza sono rappresentati nella fig. 3; in accordo alle previsioni si è visto che dopo 15 minuti vi è un notevole accumulo di glicogeno radioattivo, mentre è molto piccola la radioattività della CO_2 formatasi.

E' ben conosciuto [vedi tra gli altri (6)] che il DNF influenza la fosforilazione ossidativa ed il consumo di ossigeno.

SACKS e SINEX (7) incubando il diaframma di ratto in un mezzo contenente fosfato inorganico P^{32} hanno studiato l'effetto di varie concentrazioni del DNF sulla quantità e sul « turnover » dei composti contenenti fosforo acido-solubile ed hanno trovato che una concentrazione del DNF 2×10^{-5} molare provoca un aumento della respirazione, una diminuzione della ATP, mentre la quantità di esosomonofosfati rimane costante; invece il « turnover » della ATP rimane inalterato e quello dell'esosomonofosfato aumenta.

In base a questi risultati è stato ritenuto interessante applicare il metodo di radiocromatografia allo studio dell'effetto del DNF sugli in-

intermedi fosforilati del diaframma: sono state eseguite perciò due esperienze incubando pezzi di diaframma con fosfato sodico marcato P^{32} ed usando una tecnica simile a quella precedente. Nella prima esperienza un pezzo di diaframma è stato incubato in presenza di DNF senza substrato; nella seconda invece è stato aggiunto anche del glucosio inerte. Per controllo, in ambedue le esperienze, pezzi di diaframma sono stati incubati senza DNF.

Nella fig. 4 è presentato il radioautogramma degli estratti alcolico-acquosi dei diaframmi di entrambe le esperienze; in essa si vede che negli esperimenti di controllo il P^{32} appare in almeno sette metaboliti, i cui Rf son dati nella tabella 2 (Rf=0,65 corrisponde al fosfato inorganico) e che non vi è alcuna differenza qualitativa tra le due esperienze di controllo, mentre l'intensità delle macchie appare leggermente aumentata quando il diaframma è incubato con glucosio.

In presenza di DNF la radioattività di tutti gli intermedi fosforilati è notevolmente ridotta; in particolare non vi è alcun aumento della attività nella zona corrispondente agli esosomonofosfati. Ciò è in contrasto con quello che ci si sarebbe dovuto aspettare dai risultati di SACKS e SINEX (7).

L'interpretazione di questi risultati sarà discussa in una prossima, più estesa pubblicazione.

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

BIBLIOGRAFIA

- (1) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., D'AGOSTINO O., MASI I., POCCHIARI F. e ROSSI C. - Rend. Accad. Lincei, [8], 14: 589 (1953).
 - (2) VILLEE C. A., DEANE H. W. e HASTINGS A. B. - Journ. Cell. Comp. Physiol., 34: 159 (1949).
 - (3) PIERCE F. T. e FIELD J. - Journ. Biol. Chem., 180: 895 (1949).
 - (4) STADIE W. C., HAUGAARD N. e MARSH J. B. - Journ. Biol. Chem., 188: 173 (1951).
 - (5) WALAAS O. e WALAAS E. - Journ. Biol. Chem., 187: 769 (1950).
 - (6) HOTCHKISS R. D. - Advances in Enzymology, 4: 153 (1943); LOOMIS W. F. e LIPMANN F. - Journ. Biol. Chem., 173: 809 (1948); JUDAH J. D. e WILLIAMS-ASHMAN H. G. - Bioch. Journ., 48: 33 (1954); JUDAH J. D. - Bioch. Journ., 49: 271 (1954).
 - (7) SACKS J. e SINEX F. M. - Arch. Bioch., 39: 205 (1952).
-