

63. A. BELOFF-CHAIN, E. B. CHAIN, D. BOVET, F. POCCHIARI, R. CATANZARO e L. LONGINOTTI. — **Metabolismo di esosofosfati.** —

1) Nei conigli normali e diabetici da allossana.

2) Nel diaframma isolato di ratto; influenza dell'insulina. (*)

Riassunto. — 1) E' stato dimostrato che gli esosofosfati possono penetrare nelle cellule dei tessuti dei conigli, ed è stato messo in evidenza che essi sono metabolizzati nell'interno delle cellule.

2) A differenza del comportamento del glucosio, il glucosio-4-fosfato ed il glucosio-6-fosfato, iniettati per via endovenosa, scomparivano rapidamente dal sangue sia dei conigli normali come di quelli diabetici da allossana; è stato osservato poi, un successivo aumento della glicemia e del fosforo inorganico del sangue e delle urine.

3) Nelle urine sia dei conigli normali come di quelli diabetici da allossana, si è ritrovato circa il 30% del glucosio-4-fosfato e il 40-55% del glucosio-6-fosfato iniettati.

4) In presenza del diaframma isolato di ratto la scomparsa del glucosio-4-fosfato dal mezzo è stata più alta di quella del glucosio. L'aggiunta di insulina ha aumentato la scomparsa del glucosio e inibito quella del glucosio-4-fosfato.

5) La quantità di glicogeno sintetizzata dal diaframma di ratto è stata del medesimo ordine di grandezza nei sistemi contenenti glucosio-4-fosfato (2%) come in quelli contenenti glucosio (2%), ed in ambedue i casi, essa dipendeva notevolmente dal contenuto iniziale di glicogeno del muscolo. L'insulina ha aumentato la sintesi di glicogeno dal glucosio, e non ha avuto alcun effetto sulla sintesi del glicogeno dal glucosio-4-fosfato.

6) Il consumo di ossigeno del diaframma isolato di ratto, è aumentato per l'aggiunta di glucosio-4-fosfato (2%) mentre è rimasto inalterato per l'aggiunta di glucosio. Quando si aggiunge al mezzo il 2,4-dinitrofenolo ($4,83 \cdot 10^{-5}$ M), il consumo di ossigeno è aumentato in presenza di glucosio ed inibito in presenza di glucosio-4-fosfato.

7) Il glucosio-6-fosfato ed il fruttosio-6-fosfato, per azione di una isomerasi presente nel diaframma di ratto, formano una miscela di equilibrio contenente circa il 40% di fruttosio-6-fosfato ed il 60% di glu-

(*) Il presente lavoro è pubblicato su questi Rendiconti d'accordo con il Comitato di redazione di « The Biochemical Journal ».

cosio-6-fosfato. Incubando il diaframma di ratto in questa miscela, non si è avuta nè sintesi di glicogeno, nè è stato influenzato il consumo di ossigeno.

Résumé. — 1) Les hexoses phosphates sont susceptibles de pénétrer dans les cellules des tissus du lapin, et des arguments sont préservés qui rendent vraisemblable qu'ils puissent être métabolisés à l'intérieur des cellules.

2) Au contraire de ce qui a lieu pour le glucose, le glucose-1-phosphate et le glucose-6-phosphate injectés par voie intra-veineuse disparaissent avec une égale rapidité du sang, du lapin normal et du sang du lapin présentant un diabète-alloxanique; une augmentation consécutive du glucose sanguin et de la teneur du sang et des urines en phosphore inorganique a été observée.

3) Environ 30% du glucose-1-phosphate injecté peut être récupéré dans les urines des lapins normaux ou en diabète alloxanique; 40% de glucose-6-phosphate injecté peut être retrouvé dans les urines des lapins normaux, et 60% dans celles des lapins diabétiques.

4) En présence du muscle du diaphragme isolé du rat, la consommation du glucose-1-phosphate introduit dans le milieu est supérieure à celle du glucose. L'addition d'insuline accroît la consommation de glucose et inhibite la consommation de glucose-1-phosphate.

5) La quantité de glycogène synthétisé par le diaphragme du rat est du même ordre en présence du glucose-1-phosphate (2%), et en présence du glucose (2%); dans l'un et dans l'autre cas elle dépend dans une large mesure du contenu initial du muscle en glycogène. L'insuline augmente la synthèse de glycogène à partir du glucose mais ne modifie pas la synthèse de glycogène à partir du glucose-1-phosphate.

6) La consommation d'oxygène du diaphragme isolé du rat est accrue par l'addition du glucose-1-phosphate (2%) tandis qu'elle n'est pas affectée par l'addition du glucose. L'addition de 2-4-dinitrophénol ($4,83 \times 10^{-5}$ M) augmente la consommation d'oxygène en présence de glucose et la diminue en présence du glucose-1-phosphate.

7) Le glucose-6-phosphate et le fructose-6-phosphate sont attaqués par une isomerase, présente dans le muscle du diaphragme du rat en sorte qu'il s'établit un mélange équilibré contenant approximativement 40% du fructose-6-phosphate et 60% de glucose-6-phosphate. Le diaphragme du rat mis en présence de ce mélange ne synthétise pas du glycogène et sa consommation d'oxygène n'a pas été influencée.

Summary. — 1) It has been demonstrated that the hexose phosphates can penetrate into the tissue cells of rabbits, and evidence is advanced that they are metabolized within the cells.

2) In contrast to the behaviour of glucose, intravenously injected glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate disappeared rapidly from the blood of both normal and alloxan-diabetic rabbits; a subsequent increase in blood glucose and in the inorganic phosphorus of the blood and urine was observed.

3) Approximately 30% of the injected glucose-1-phosphate was recovered in the urine of both normal and alloxan-diabetic rabbits and 40 and 55% of the injected glucose-6-phosphate in the urine of normal and diabetic rabbits, respectively.

4) In the presence of isolated rat diaphragm muscle, the uptake of glucose-1-phosphate from the medium was higher than that of glucose. Addition of insulin increased the glucose uptake and inhibited the uptake of glucose-phosphate.

5) The amount of glycogen synthesis by rat diaphragm muscle was of the same order in systems containing glucose-1-phosphate (2%) and systems containing glucose (2%), and in both cases was largely dependent on the initial glycogen content of the muscle. Insulin increased the glycogen synthesis from glucose but had no effect on glycogen synthesis from glucose-1-phosphate.

6) Oxygen consumption of isolated rat diaphragm was increased by the addition of glucose-1-phosphate (2%) and unaffected by glucose. When 2:4-dinitrophenol (4.83×10^{-5} M) was added to the medium, oxygen consumption was increased in the presence of glucose-1-phosphate.

7) Glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate were acted on by an isomerase enzyme present in rat diaphragm muscle forming an equilibrium mixture containing approximately 40% fructose-6-phosphate. Rat diaphragm muscle incubated in this equilibrium mixture did not synthesize glycogen nor was its oxygen consumption effected.

Zusammenfassung. — 1) Hexose-phosphate können in die Gewebezellen der Kanichen eindringen und werden sie in den Zellen umgesetzt.

2) Im Gegensatz zur Glucose verschwinden Glucose-1- und Glucose-6-phosphat rasch im Blut sowohl normalen als auch alloxan diabetische Kaninchen; nach der Injektion wurde eine Erhöhung des Blutzuckers und des anorganischen Phosphors im Blut und im Urin beobachtet.

3) Ungefähr 30% des injizierten Glucose-1-phosphates, resp. 40-55% des Glucose-6-phosphates konnten sowohl im Urin der normalen, wie der alloxan-diabetischen Kaninchen wiedergefunden werden.

4) In Gegenwart von isoliertem Zwerchfell-Muskels der Ratte verschwindet mehr Glucose-1-phosphat als Glucose von der Nährflüssigkeit. Die Zugabe von Insulin vergrößerte die Glucose-Aufnahme und hemmte die Aufnahme von Glucose-1-phosphat durch Zwerchfell-Muskel.

5) Die Menge der Glycogen-Synthese durch den Ratten-Zwerchfell-Muskel war im System, welches Glucose-1-phosphat (2%) enthielt, sowie in demjenigen, welches Glucose (2%) enthielt, von derselben Größenordnung und in beiden Fällen war sie stark abhängig vom Ausgangsgehalt an Glycogen im Muskel. Insulin begünstigt die Glycogen-Synthese aus Glucose, während es diejenige aus Glucose-1-phosphat nicht beeinflusst.

6) Der Sauerstoffverbrauch des isolierten Ratten-Zwerchfells wurde durch Zugabe von Glucose-1-phosphat (2%) erhöht, durch Glucose aber nicht beeinflusst. Wenn zum Medium 2,4-Dinitrophenol gegeben wurde, wurde der Sauerstoffverbrauch bei Anwesenheit von Glucose erhöht und bei Anwesenheit von Glucose-1-phosphat erniedrigt.

7) Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat werden durch eine Isomerase, welche im Ratten-Zwerchfell-Muskel vorhanden ist, beeinflusst, sodass sich eine Gleichgewicht Mischung bildet, welches ungefähr 40% Fructose-6-phosphat und 60% Glucose-6-phosphat enthält. In Gegenwart dieser Gleichgewichtsmischung wird kein Glycogen durch Zwerchfell-Muskel gebildet, noch wird der Sauerstoffverbrauch beeinflusst.

Alcuni ricercatori ⁽¹⁾, subito dopo la scoperta dell'insulina, hanno trovato che il fosforo del sangue di animali normali e diabetici, diminuiva in seguito ad iniezione d'insulina. Dopo tali osservazioni si è per la prima volta giunti all'ipotesi che l'insulina era legata alla fosforilazione dei carboidrati, e vari studiosi hanno tentato di mettere in relazione la diminuzione del fosforo inorganico nel sangue, con l'aumento dell'esosomono-fosfato nel muscolo. CORI e CORI ⁽²⁾ e SOSKIN, LEVINE e HECHTER ⁽³⁾ hanno tuttavia reputato, che l'aumento dell'esosomono-fosfato nel muscolo, era probabilmente un effetto secondario dell'insulina, dovuto ad una scarica di adrenalina. D'altra parte NELSON, RAPOPORT, GUEST e MIRSKY ⁽⁴⁾ hanno suggerito che l'aumento della frazione acido-solubile del fosforo nel fegato potrebbe rendere conto, almeno in parte,

della diminuzione del fosforo inorganico nel sangue, a seguito di iniezioni di insulina.

KAPLAN e GREENBERG ⁽⁵⁾, lavorando con fosfato radioattivo, hanno concluso che l'insulina accelera il trasferimento di fosforo dal sangue ai tessuti, aumenta il contenuto in esosomonofosfato del muscolo, e [in accordo con i risultati ottenuti da NELSON e coll. ⁽⁴⁾], aumenta i processi di fosforilazione nel fegato, ciò che è indicato dall'aumentato tenore in fosforo radioattivo della frazione del fosforo acido-solubile e dei gruppi fosforici labili dell'adenosintrifosfato.

SACKS ⁽⁶⁾, usando anch'egli fosforo radioattivo, ha studiato l'effetto dell'insulina sul « turnover » dei fosfati nel muscolo striato di gatto, trovando un aumento nella velocità del « turnover » della fosfocreatina, dell'adenosintrifosfato e del glucosio-6-fosfato. HAUGAARD, MARSH e STADIE ⁽⁷⁾ hanno invece indagato sulle variazioni degli intermedi fosforilati in un diaframma isolato di ratto, dopo incubazione in un mezzo contenente glucosio, in presenza ed in assenza d'insulina. Da tali ricerche essi hanno concluso che l'insulina aumenta notevolmente la velocità del « turnover » dei fosfati ad alto contenuto energetico.

PRICE, CORI e COLOWICK ⁽⁸⁾ hanno riferito che la reazione dell'esochinasi nel muscolo e negli estratti di cervello è inibita, nei ratti, quando questi sono preventivamente iniettati con estratti dell'ipofisi anteriore, oppure quando questi estratti sono aggiunti ai preparati in vitro, e che tale inibizione è ostacolata dall'insulina. Inoltre, secondo questi Autori, l'esochinasi dei ratti diabetici da allossana, ha la stessa attività di quella ottenuta da preparazioni di ratti normali preventivamente iniettati con estratti di ipofisi anteriore, e questa attività viene riportata al normale dall'insulina. Queste osservazioni hanno fatto pensare a molti che l'azione dell'insulina fosse in relazione con la fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato: cioè con la reazione dell'esochinasi. Un certo numero di ricercatori tuttavia, [per la bibliografia vedi: STADIE, HAUGAARD e HILLS ⁽⁹⁾] non ha potuto confermare il lavoro di PRICE e coll. ⁽⁸⁾, e finora, non si ha alcuna prova conclusiva che l'insulina sia direttamente implicata nella fosforilazione del glucosio.

Il lavoro descritto nel presente articolo, è stato eseguito allo scopo di ottenere ulteriori prove, pro o contro l'ipotesi molto discussa, concernente il modo d'azione dell'insulina nel metabolismo dei carboidrati. Sono stati seguiti due indirizzi di lavoro: 1) il metabolismo in vivo del glucosio-4-fosfato e del glucosio-6-fosfato, è stato paragonato a quello del glucosio, nei conigli normali e diabetici da allossana (*) e 2) il meta-

(*) Alcuni di questi risultati sono già stati precedentemente pubblicati in una nota preliminare ⁽¹⁰⁾. Dopo questa nostra preliminare pubblicazione, KUETHER ⁽¹¹⁾ ha

bolismo in vitro su diaframma isolati di ratto di alcuni esosofosforilati, è stato paragonato a quello del glucosio, in presenza ed in assenza di insulina.

Gli studi con diaframma isolato di ratti diabetici da allossana procedono e saranno riferiti in un secondo tempo.

PARTE SPERIMENTALE

PREPARAZIONE DEI PRODOTTI.

Glucosio-1-fosfato (G-1-P). Il sale bibasico di potassio è stato preparato secondo il metodo di MCCREADY e HASSID⁽¹²⁾, usando la resina cationica di scambio Zeo-Karb 215, e la resina anionica di scambio De-Acidité B, o le corrispondenti resine Amberliti.

Glucosio-6-fosfato (G-6-P). Il sale di bario è stato preparato secondo il metodo di SEEGMILLER e HORECKER⁽¹³⁾, da glucosio e da acido tetrafosforico⁽¹⁴⁾.

Fruttosio-1-6-difosfato (F-1-6-P). Il sale di bario è stato preparato secondo il metodo di NEUBERG e LUSTIG⁽¹⁵⁾, da lievito di birra.

Fruttosio-6-fosfato (F-6-P). Il sale di bario è stato preparato dal F-1-6-P per idrolisi con HBr N/1 per 5 giorni a 32°, secondo il metodo di NEUBERG, LUSTIG e ROTHENBERG⁽¹⁶⁾.

Preparazione dei sali sodici. In tutti gli esperimenti, gli esosofosfati sono stati usati come soluzioni di sali di sodio.

Il sale sodico del G-1-P, è stato preparato facendo passare una soluzione del sale potassico, attraverso una resina cationica di scambio, e lavando quindi la resina con acqua fino a circa pH 4 dell'effluente. La soluzione è stata poi portata a pH 7 con poche gocce di NaOH al 30%, e quindi concentrata sotto vuoto fino al volume richiesto.

I sali di sodio del G-6-P, F-1-6-P e del F-6-P sono stati preparati aggiungendo un piccolo eccesso di Na₂SO₄ alla soluzione del sale di bario, (nel caso del F-1-6-P in acido diluito); i precipitati di solfato di bario sono stati centrifugati e lavati due volte con acqua, ed i liquidi sopralstanti, uniti alle acque di lavaggio, sono stati portati a pH 7, e concentrati sotto vuoto fino al volume desiderato.

descritto risultati di esperimenti simili, ma meno dettagliati, condotti con glucosio-1-fosfato su ratti diabetici da allossana. I suoi risultati e le sue conclusioni sono state simili alle nostre.

METODI ANALITICI.

Il glucosio è stato determinato secondo MILLER e VAN SLIKE (¹⁷).

Tutte le determinazioni di fosforo sono state eseguite secondo il metodo di BERENBLUM e CHAIN (¹⁸).

Il glicogeno è stato determinato usando il procedimento di GOOD, KRAMER e SOMOGYI (¹⁹), modificato da STADIE, HAUGAARD e MARSH (²⁰).

Il G-4-P è stato determinato nei filtrati del sangue deproteinizzati, e nelle urine, misurando il P inorganico presente prima e dopo 10 minuti di idrolisi con H_2SO_4 N/4 a 100° . Negli esperimenti in vitro, il G-4-P è stato determinato misurando il glucosio liberato dopo una simile idrolisi.

Il G-6-P è stato determinato sottraendo il P inorganico da quello totale, ottenuto dopo distruzione della parte organica in acido perclorico.

Negli esperimenti in vivo, i valori ottenuti sono stati corretti sottraendo loro quelli iniziali, questi ultimi, determinati nel sangue prima dell'iniezione delle sostanze.

Sebbene i metodi usati per la determinazione del G-4-P e del G-6-P non siano strettamente specifici per queste sostanze, si è considerato che, nelle condizioni di questi esperimenti, essi sostanzialmente misurassero gli esteri fosforici in esame.

Il F-4-6-P ed il F-6-P sono stati determinati misurando il fruttosio secondo il metodo di ROE (²¹).

Le concentrazioni degli esosofosfati sono espresse come mg di glucosio o di fruttosio presenti.

PROCEDIMENTO PER LE ESPERIENZE IN VIVO.

Sono stati usati conigli maschi del peso di circa Kg. 2. Per rendere i conigli diabetici, una soluzione di allossana al 5% (mg. 200/Kg.), è stata iniettata nella vena marginale dell'orecchio. Nel periodo ipoglicemico seguito a questa iniezione, gli animali sono stati sottoposti ad una dieta ricca in carboidrati, ed è stata data loro da bere una soluzione concentrata di glucosio. La glicemia è stata determinata tre o quattro giorni dopo il trattamento, ed in seguito, per un periodo minimo di quattro giorni prima dell'esperienza. Sono stati considerati diabetici solo gli animali con un tasso glicemico superiore ai mg. 250/100 cm^3 di sangue per un periodo minimo di quattro giorni. Normalmente gli animali sono stati tenuti ad una dieta di sole verdure per 24 ore prima dell'esperienza,

mentre questo periodo è stato prolungato fino a 48 ore, in quelle esperienze con animali diabetici, in cui il tasso glicemico dei conigli diabetici doveva essere portato allo stesso livello di quello degli animali normali. In quest'ultimo gruppo di animali, lo stato diabetico è stato sempre confermato da una prova di tolleranza del glucosio.

Le sostanze in esame, in soluzione al 10%, sono state iniettate nella vena dell'orecchio (1 g/Kg., espresso come glucosio).

Le esperienze condotte sugli animali con ambedue gli ureteri legati, per evitare la escrezione, attraverso le urine, degli esteri fosforici iniettati, sono state eseguite anestetizzando leggermente i conigli con etere, e quindi praticando loro un'incisione mediana nella parete addominale al livello della vescica; gli ureteri sono stati poi rapidamente legati, e la ferita suturata. L'operazione è stata eseguita circa 2 ore prima dell'iniezione, e gli animali sacrificati immediatamente dopo l'esperienza. Le sostanze in esame sono state iniettate ad una dose metà del normale (g 0,5/Kg., espressi come glucosio). Esperienze di controllo, nelle quali i conigli sono stati operati nella maniera già descritta, ma che poi non sono stati iniettati con alcuna sostanza, hanno mostrato che non vi è stata alcuna apprezzabile alterazione nella glicemia per 6 ore dopo l'operazione.

In tutte le esperienze, campioni di sangue di circa 2,5 cm³ sono stati direttamente prelevati dal cuore, immediatamente prima e ad intervalli di 3, 15, 30, 60 e 120 minuti dopo l'iniezione; questi campioni, sono stati poi trasferiti in una piccola provetta contenente due gocce di eparina, dalla quale sono stati prelevati cm³ 0,1 per l'analisi del glucosio, e cm³ 2, che aggiunti a cm³ 2 di acido tricloroacetico al 10%, sono stati centrifugati ed analizzati come descritto sopra.

Gli animali sono stati tenuti in gabbie metaboliche; in alcune esperienze, sono state raccolte le urine eliminate fino a 24 ore dopo l'iniezione, mentre in altre, il prelevamento di queste è stato fatto ad intervalli regolari direttamente con un catetere.

In relazione a queste esperienze in vivo, sono state condotte prove sull'attività fosfatasica del sangue, prelevando questo dal cuore di conigli normali, aggiungendovi la minima quantità di eparina per evitare la coagulazione, e mescolandolo immediatamente con soluzioni di G-1-P o di G-6-P nella proporzione di cm³ 2 di sangue per cm³ 1 di soluzione al 5% di substrato (espresso come concentrazione del glucosio), preventivamente riscaldato a 37°. Sono stati prelevati campioni per l'analisi del P inorganico immediatamente dopo l'aggiunta del sangue, e dopo 1 e 2 ore d'incubazione a 37°. Le proteine sono state precipitate con acido

mentre questo periodo è stato prolungato fino a 48 ore, in quelle esperienze con animali diabetici, in cui il tasso glicemico dei conigli diabetici doveva essere portato allo stesso livello di quello degli animali normali. In quest'ultimo gruppo di animali, lo stato diabetico è stato sempre confermato da una prova di tolleranza del glucosio.

Le sostanze in esame, in soluzione al 10%, sono state iniettate nella vena dell'orecchio (1 g/Kg., espresso come glucosio).

Le esperienze condotte sugli animali con ambedue gli ureteri legati, per evitare la escrezione, attraverso le urine, degli esteri fosforici iniettati, sono state eseguite anestetizzando leggermente i conigli con etere, e quindi praticando loro un'incisione mediana nella parete addominale al livello della vescica; gli ureteri sono stati poi rapidamente legati, e la ferita suturata. L'operazione è stata eseguita circa 2 ore prima dell'iniezione, e gli animali sacrificati immediatamente dopo l'esperienza. Le sostanze in esame sono state iniettate ad una dose metà del normale (g 0,5/Kg., espressi come glucosio). Esperienze di controllo, nelle quali i conigli sono stati operati nella maniera già descritta, ma che poi non sono stati iniettati con alcuna sostanza, hanno mostrato che non vi è stata alcuna apprezzabile alterazione nella glicemia per 6 ore dopo l'operazione.

In tutte le esperienze, campioni di sangue di circa 2,5 cm³ sono stati direttamente prelevati dal cuore, immediatamente prima e ad intervalli di 3, 15, 30, 60 e 120 minuti dopo l'iniezione; questi campioni, sono stati poi trasferiti in una piccola provetta contenente due gocce di eparina, dalla quale sono stati prelevati cm³ 0,1 per l'analisi del glucosio, e cm³ 2, che aggiunti a cm³ 2 di acido tricloroacetico al 10%, sono stati centrifugati ed analizzati come descritto sopra.

Gli animali sono stati tenuti in gabbie metaboliche; in alcune esperienze, sono state raccolte le urine eliminate fino a 24 ore dopo l'iniezione, mentre in altre, il prelevamento di queste è stato fatto ad intervalli regolari direttamente con un catetere.

In relazione a queste esperienze in vivo, sono state condotte prove sull'attività fosfatasica del sangue, prelevando questo dal cuore di conigli normali, aggiungendovi la minima quantità di eparina per evitare la coagulazione, e mescolandolo immediatamente con soluzioni di G-1-P o di G-6-P nella proporzione di cm³ 2 di sangue per cm³ 1 di soluzione al 5% di substrato (espresso come concentrazione del glucosio), preventivamente riscaldato a 37°. Sono stati prelevati campioni per l'analisi del P inorganico immediatamente dopo l'aggiunta del sangue, e dopo 1 e 2 ore d'incubazione a 37°. Le proteine sono state precipitate con acido

tricloroacetico al 10%, centrifugate e, sul soprastante, è stato determinato il P inorganico.

PROCEDIMENTO PER LE ESPERIENZE IN VITRO.

Sono stati usati ratti maschi di 120-180 g. di peso. Tutti gli animali sono stati tenuti a digiuno per 24 ore prima dell'esperienza. E' stata adottata la tecnica del diaframma isolato di ratto descritta per primo da GEMMILL (²²).

Dai ratti, sacrificati per decapitazione, sono stati prelevati rapidamente due emidiaframma (del peso di circa 100 mg. ognuno) che sono stati pesati su una bilancia di torsione, con approssimazione al mg. Ciascun emidiaframma è stato poi trasferito ad una vaschetta di Warburg, precedentemente raffreddata in ghiaccio e contenente cm³ 3 di mezzo. Il mezzo, a pH 6,8, era uguale a quello usato da STADIE e ZAPP (²³), contenente Na₂HPO₄ 0,04 M; NaCl 0,08 M e MgCl₂ 0,003 M. I substrati in esame sono stati usati ad una concentrazione finale del 2% o del 0,2%.

Le vaschette sono state collegate ai manometri, ossigenate per 5 minuti, e quindi incubate per 90 minuti a 37°. Alla fine del periodo d'incubazione, le vaschette, staccate dai manometri, sono state immerse in ghiaccio.

Sintesi del glicogeno. Parti uguali, all'incirca un terzo di ogni emidiaframma, sono state pesate ed immediatamente immerse in cm³ 2 di KOH al 30% per la determinazione del glicogeno iniziale. I rimanenti due terzi di ogni emidiaframma, sono stati incubati come descritto prima. Dopo l'incubazione, i diaframma sono stati asciugati su carta da filtro, rapidamente lavati in una soluzione salina fisiologica, e messi in 2 cm³ di KOH al 30%.

Utilizzazione del substrato. Campioni del mezzo sono stati prelevati prima e dopo l'incubazione, ed analizzati con i metodi sopradescritti.

Respirazione. Il consumo di O₂ è stato misurato con la usuale tecnica manometrica di WARBURG.

Effetto dell'insulina. Emidiaframma di ciascun ratto sono stati incubati in un mezzo nel quale erano stati aggiunti cm³ 0,1 contenenti 3 unità di insulina, in modo da avere una concentrazione finale di 4 unità/cm³; i risultati ottenuti, sono stati poi paragonati a quelli degli altri emidiaframma incubati senza insulina.

Effetto del 2-4-dinitrofenolo. Una soluzione (cm³ 0,1) di 2-4-dinitrofenolo (DNP), è stata aggiunta al mezzo prima dell'incubazione, ad una concentrazione finale del $4,83 \times 10^{-5}$ M.

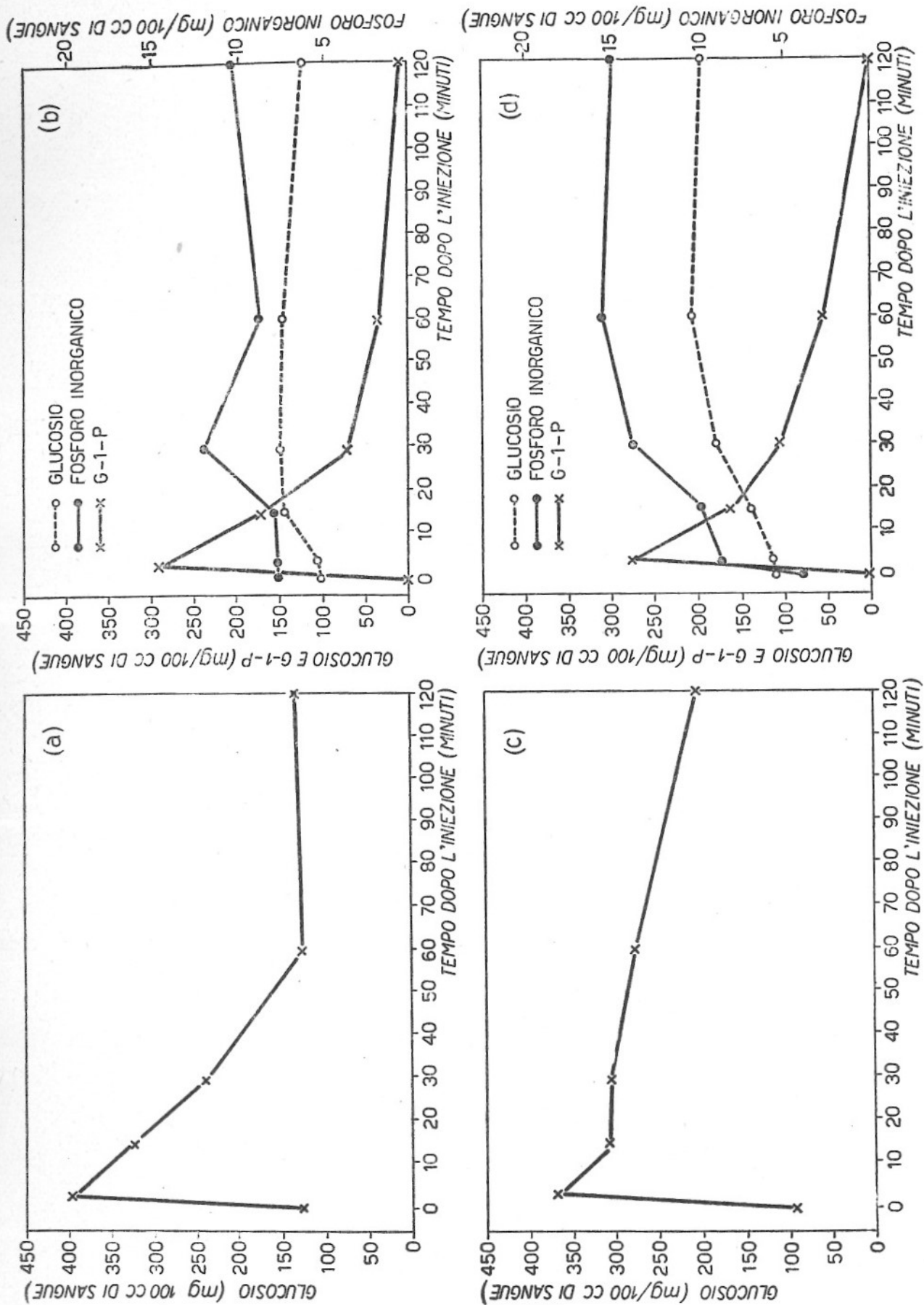


Fig. 4. - Velocità di scomparsa dal sangue del glucosio e del G-1-P iniettati per via endovenosa in conigli normali e diabetici da allossana e conseguente aumento nel sangue del glucosio e del fosforo inorganico. Quantità iniettata: g. 4/Kg. I conigli sono stati tenuti, prima delle esperienze, ad una dieta priva di carboidrati onde riportare la loro glicemia al normale. Le esperienze (b) e (d) sono state eseguite sul medesimo coniglio diabetico in due giorni successivi. (a) Coniglio normale iniettato con glucosio. (b) Coniglio normale iniettato con G-1-P. (c) Coniglio diabetico da allossana iniettato con glucosio. (d) Coniglio diabetico da allossana iniettato con G-1-P.

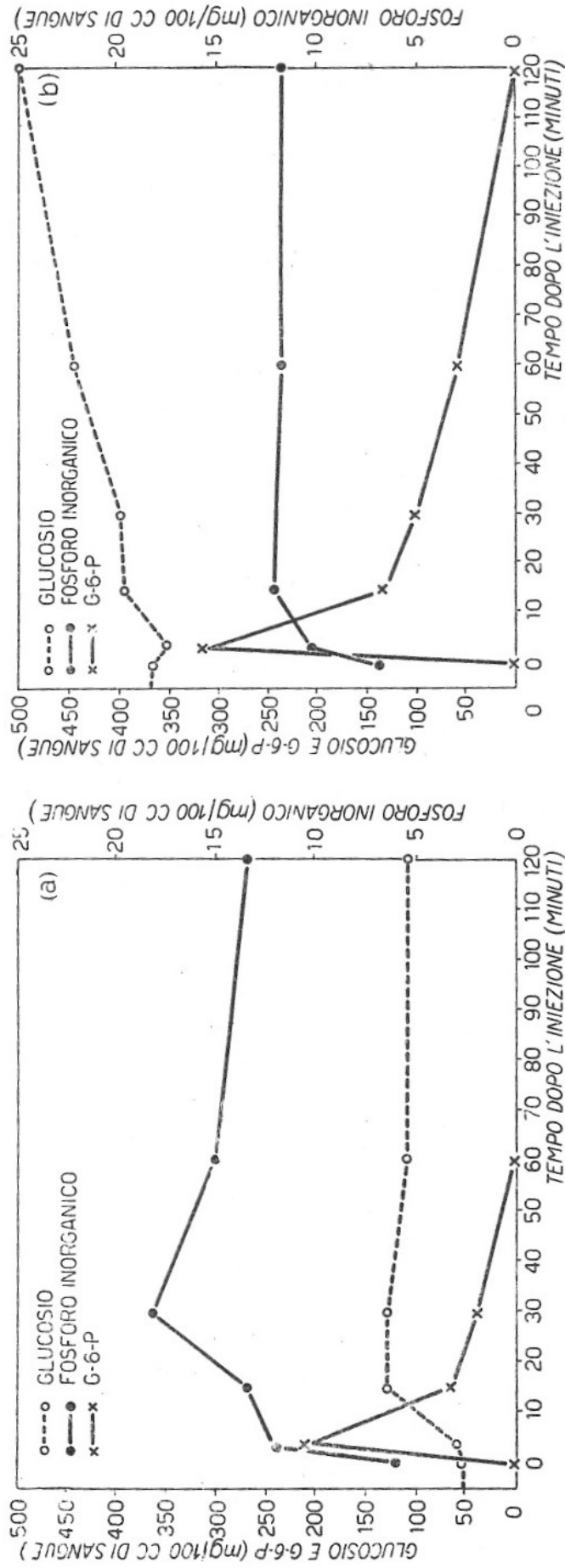


Fig. 2. - Velocità di scomparsa dal sangue del G-6-P iniettato per via endovenosa in conigli normali e diabetici da allossana e conseguente aumento nel sangue del glucosio e del fosforo inorganico. Quantità iniettata: g. 4/Kg. (a) Coniglio normale. (b) Coniglio diabetico da allossana.

RISULTATI

1. - ESPERIENZE IN VIVO

Il metabolismo del G-4-P e del G-6-P è stato studiato e paragonato a quello del glucosio in conigli normali e diabetici da allossana. Sono state fatte esperienze con G-4-P su cinque conigli normali e sette diabetici, e con G-6-P su nove conigli normali e sette diabetici. Sono stati ottenuti risultati simili per tutti gli animali, e nelle figure 1 e 2 sono riportati esempi tipici illustrativi.

Si è trovato che sia il G-4-P come il G-6-P, iniettati per via endovenosa, scomparivano rapidamente dal sangue dei conigli normali e di quelli diabetici da allossana. Nei conigli normali, la velocità di scomparsa dal sangue, cioè la curva di tolleranza, era simile a quella del glucosio. Nei conigli diabetici da allossana il tasso glicemico rimaneva alto per un tempo abbastanza lungo dopo l'iniezione di glucosio, in netto contrasto con quello del G-4-P e G-6-P, che scompariva ad una velocità normale. In tre conigli diabetici, il glucosio ed il G-4-P sono stati iniettati contemporaneamente; i risultati di una di queste esperienze sono riportati in fig. 3.

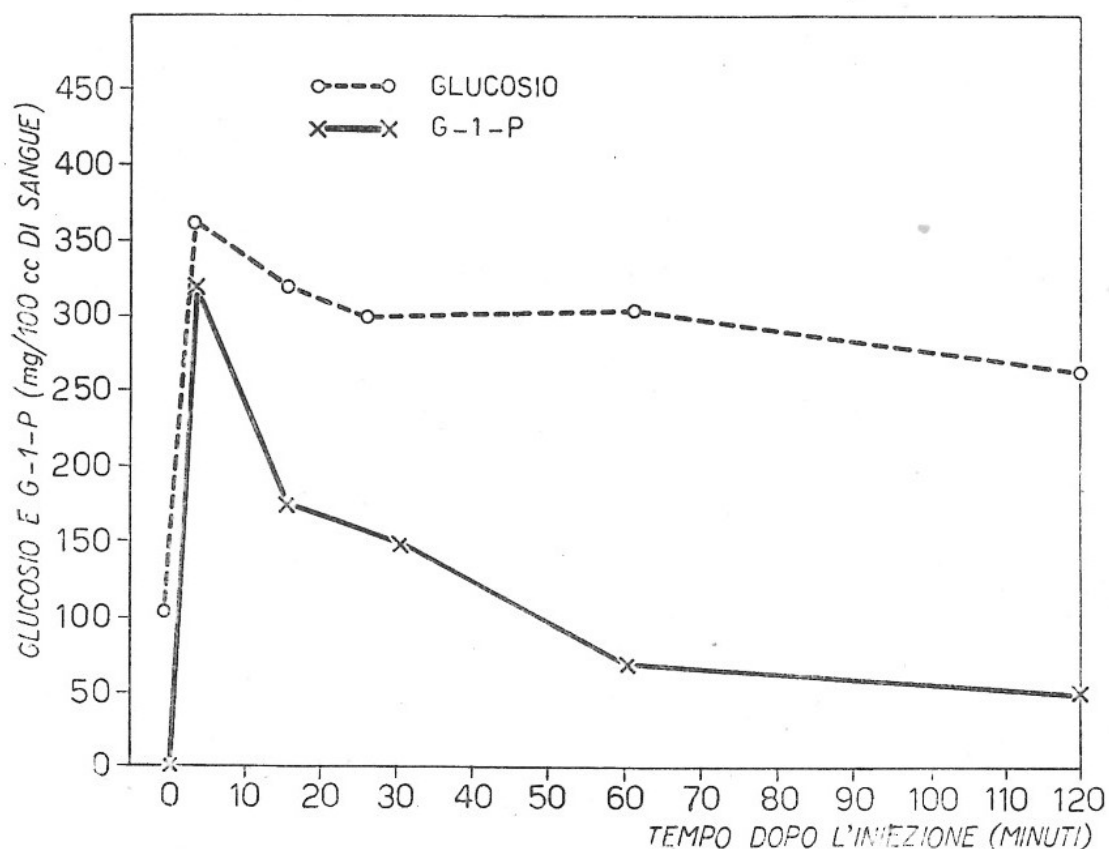


Fig. 3. - Velocità di scomparsa dal sangue del glucosio e del G-4-P iniettati contemporaneamente in un coniglio diabetico da allossana. Quantità di ogni sostanza iniettata per via endovenosa: g. 1/Kg.

In seguito all'iniezione di G-1-P e di G-6-P, la glicemia aumentava di mg. 30 a mg. 100/100 cm³ nei conigli normali, e, come era da aspettarsi, in modo più marcato nei conigli diabetici. Anche il P inorganico del sangue aumentava da 4 a 12 mg./100 cm³ (tabella 1). I risultati mostrano che c'è stata una variazione notevole nell'aumento della glicemia

TABELLA 1. — Massimo aumento del fosforo inorganico e del glucosio nel sangue in seguito ad iniezione per via endovenosa di G-1-P e di G-6-P in conigli normali e diabetici da allossana.

(Quantità iniettata: 1 g./Kg. I risultati sono espressi in mg./100 cm³ di sangue. Ogni linea rappresenta i risultati di un'esperienza su un coniglio trattato con G-1-P e su un coniglio trattato con G-6-P).

Iniezione di G-1-P		Iniezione di G-6-P	
Aumento del Fosforo inorganico	Aumento del Glucosio	Aumento del Fosforo inorganico	Aumento del Glucosio
Animali normali			
4,2	47	8,6	—
8,8	60	11,2	—
7,5	70	9,3	92
8,5	108	14,4	44
10,6	35	6,6	27
		5,0	45
		9,0	52
		12,2	55
		9,0	46
Animali diabetici			
11,6	38	10,3	93
8,5	270	9,2	94
12	90	9,6	195
12	106	7,8	140
11	105	6,8	103
7,6	54	8,0	202
11,6	170	10	145

nei diversi animali. Il livello, sia del P inorganico che del glucosio, raggiungeva un massimo, nella maggior parte delle esperienze, in 30-60 minuti. Nelle 24 ore seguenti l'iniezione, è stato anche osservato un considerevole aumento nella escrezione del P inorganico nelle urine di tutti gli animali (Fig. 4).

Dato che i risultati ottenuti nelle esperienze sopradescritte, potrebbero essere spiegati come un'idrolisi degli esteri fosforici del sangue,

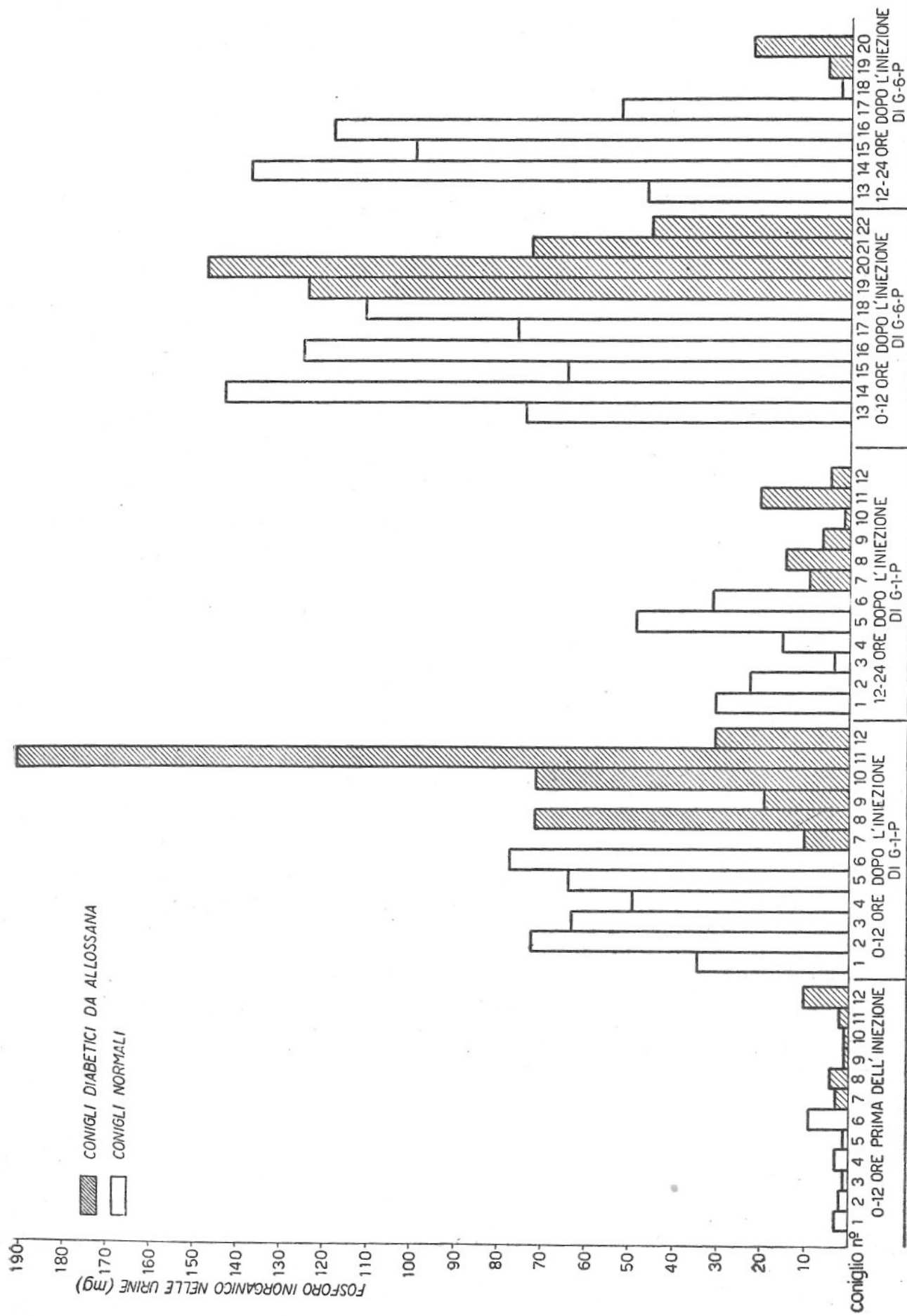


Fig. 4. - Fosforo inorganico escreto nelle urine di conigli normali e diabetici da allossana, prima e dopo l'iniezione di G-1-P o di G-6-P.

sono state condotte esperienze in vitro sul sangue di due conigli, per provare se questa scissione avvenga o meno. I risultati, riportati nella tabella 2, dimostrano che soltanto piccole quantità di G-1-P e di G-6-P

TABELLA 2. — Attività fosfatasica del sangue di coniglio con G-1-P e G-6-P come substrati.

(La miscela di reazione conteneva cm^3 2 di sangue totale e cm^3 1 di una soluzione al 5% di substrato (espressa come glucosio).

Coniglio	Substrato	Tempo di incubazione a 37° (ore)	P inorganico liberato ($\mu\text{g cm}^3$ di substrato)	Substrato idrolizzato ‰
1	G 1-P	1	0	0
		2	0	0
	G-6-P	1	8,4	—
		2	28,6	0,28
2	G 1-P	1	0	0
		2	15	0,17
	G 6 P	1	37,2	—
		2	103,2	1,20

vengono idrolizzate, quando questi esteri sono incubati per 2 ore a 37° con sangue totale.

In tabella 3, sono riportate le percentuali del G-1-P e del G-6-P iniet-

TABELLA 3. — Percentuale del G-1-P e del G-6-P iniettati per via endovenosa, escreti nell'urina di conigli normali e diabetici da allossana.

(Quantità iniettata 1 g./Kg. La media dei valori è data $\pm$ S.E.M. Tra parentesi sono dati il numero dei conigli ed i valori limiti. Le urine sono state raccolte nelle 24 ore seguenti l'iniezione).

G-1-P escreti (‰)		G-6 P escreti (‰)	
Normale	Diabetico	Normale	Diabetico
$31 \pm 3,6$	$31 \pm 3,1$	$44 \pm 6,4$	$55 \pm 4,7$
(7)	(7)	(9)	(5)
(14-43)	(22-43)	(25-90)	(44-65)

tate, escrete nelle urine dei conigli normali e diabetici nelle 24 ore dopo l'iniezione. Questi valori hanno mostrato che non vi è stata una differenza rilevante tra le percentuali escrete nei normali e quelle dei diabetici, ed anche che, prendendo i valori medi, non vi è stata alcuna significativa differenza tra le escrezioni di G-4-P e di G-6-P, sebbene in qualche coniglio, è stata osservata una escrezione di G-6-P notevolmente alta.

Al fine di impedire l'escrezione, alcune esperienze sono state condotte su conigli normali e diabetici, nei quali gli ureteri erano stati legati due ore prima dell'iniezione di G-4-P e di G-6-P (g. 0,5/Kg.).

I risultati di queste esperienze, dati in tab. 4, dimostrano che:
1) nella maggior parte degli animali gli esteri fosforici erano comple-

TABELLA 4. — Concentrazione del G-4-P e del G-6-P iniettati per via endovenosa, nel sangue di conigli normali e diabetici da allossana con gli ureteri legati, e conseguente massimo aumento del fosforo inorganico e del glucosio del sangue.

(I risultati sono espressi in mg./100 cm³ di sangue. Quantità iniettata 0,5 g/Kg.).

Iniezione di G-1-P				Iniezione di G-6-P			
Concentrazione del G-1-P nel sangue in seguito all'iniezione		Aumento del P inorganico	Aumento del glucosio	Concentrazione del G-6-P nel sangue in seguito all'iniezione		Aumento del P inorganico	Aumento del glucosio
3 min	60 min			3 min	60 min		
Animali normali							
260	73	16	157	162	0	11	127
240	22	19	107	—	—	—	—
Animali diabetici							
141	13	11	120	100	0	10,2	70
158	0	9,8	50	130	0	9,6	200
—	—	—	—	169	60	11,4	115
—	—	—	—	95	0	10,8	190
—	—	—	—	127	0	11,3	70
—	—	—	—	110	0	10,6	35

tamente scomparsi dal sangue 1 ora dopo l'iniezione; 2) l'aumento in fosforo inorganico del sangue rispetto alla quantità di estere fosforico iniettato, era, come dovevamo attenderci, maggiore di quello degli animali nei quali una grande quantità di fosforo inorganico era escreta

nelle urine; 3) l'aumento nella glicemia era, come negli esperimenti con animali non operati, molto variabile, ma, nella maggior parte dei casi, era del medesimo ordine di grandezza di quello precedentemente osservato. Il massimo del P inorganico e del glucosio nel sangue avveniva 1-2 ore dopo l'iniezione.

PROVE DI TOSSICITA'.

Nell'effettuare le esperienze più sopra descritte, è stato frequentemente osservato che gli animali presentavano sintomi di una acuta intossicazione subito dopo l'iniezione di G-1-P o di G-6-P, che, nel caso

TABELLA 5. — Tossicità nei topi del G-1-P, G-6-P e del fosfato di sodio.

(I topi di circa 20 g. sono stati iniettati per via intraperitoneale con le sostanze in esame. L'esperienza 1 è stata condotta a 37° e l'esperienza 2 a 48°.)

Esperienza	Quantità iniettata (mg/topo da 20 g) espressa come		G-6-P		G-1-P		Fosfato di sodio	
			Numero dei decessi num. totale	Tempo di sopravviv. (min.)	Numero dei decessi num. totale	Tempo di sopravviv. (min.)	Numero dei decessi num. totale	Tempo di sopravviv. (min.)
	P inor- ganico	Glucosio						
1	3,4	20	0/5	—	0/5	—	0/5	—
	4,3	25	0/5	—	0/5	—	0/5	—
	5,2	30	3/5	100 305	3/5	140-310	5/5	50-80
	6,9	40	5/5	125-150	5/5	80-105	—	—
	8,6	50	5/5	50-110	5/5	60-100	5/5	40-50
2	5,2	30	1/5	110	0/5	—	0/5	—
	8,6	50	4/5	205 265	3/5	80-110	5/5	40-90
	11,2	65	4/5	180-240	5/5	120 240	5/5	40-50
	13,8	80	5/5	70-240	5/5	240 255	—	—

di sopravvivenza degli animali, scompariva in 5-10 minuti. E' stato quindi deciso di provare la tossicità di queste sostanze, iniettandole nel topo per via intraperitoneale, e di paragonare la loro tossicità a quella di un'equivalente quantità di fosfato inorganico, iniettata nel topo nelle medesime condizioni. I risultati dati in tabella 5, dimostrano che non vi è alcuna significativa differenza tra la tossicità del G-1-P e del G-6-P, e che la loro tossicità era soltanto di poco minore a quella di una equi-

valente quantità di fosfato inorganico. Si è notato che il tempo che intercorreva tra l'iniezione e la comparsa dell'azione tossica, era più lungo nel caso degli esteri fosforici che non nel caso del fosfato sodico. Il valore LD_{50} a temperatura normale, era di circa 6,9 mg. di P/topo di 20 g per il G-4-P, per il G-6-P e per il fosfato inorganico.

Le manifestazioni di tossicità apparse immediatamente dopo l'iniezione in alcune delle prime esperienze con i conigli, sono state quasi sempre eliminate, nelle susseguenti esperienze, iniettando la soluzione lentamente (all'incirca 20 cm³ in due minuti).

EFFETTO DEL GLUCOSIO G-4-P E DEL G-6-P SULLE CONVULSIONI DA INSULINA NEL TOPO.

L'effetto curativo degli esteri sulle convulsioni da insulina nel topo, è stato paragonato a quello del glucosio. La tecnica usata in queste esperienze ed i risultati sono mostrati nella tabella 6. Sebbene una dose di

TABELLA 6. — L'effetto del G-4-P e del G-6-P sulle convulsioni da insulina nel topo.

(Le esperienze sono state condotte a 37°. L'insulina è stata iniettata per via intraperitoneale come indicato, e non appena hanno avuto inizio le convulsioni, il topo è stato iniettato per via intraperitoneale con glucosio, G-4-P o G-6-P nelle dosi indicate, espresse in mg./topo da 20 g. I gruppi di controllo non sono stati trattati. Nelle esperienze nelle quali alcuni degli animali sopravvivevano, è stato calcolato un tempo arbitrario di 180 minuti, dato dalla media dei valori.)

	Controlli	Iniezioni di Glucosio		Iniezioni di G-1-P		Iniezioni di G-6-P	
		25 mg	50 mg	25 mg	50 mg	25 mg	50 mg
Esperienza 1. 0,02 unità di insulina/topo da 20 g							
Numero dei topi	20	10	5	10	5	10	5
Tempo intercorso tra le convulsioni e la morte (min.). Media $\pm$ S.E.M.	14.5 $\pm$ 2.5	101.6 $\pm$ 12.7	97 $\pm$ 7.0	56.9 $\pm$ 15.0	37.8 $\pm$ 4.0	42.3 $\pm$ 6.2	33.6 $\pm$ 3.9
Numero degli animali sopravvissuti	0	4	1	1	0	0	0
Esperienza 2. 0,10 unità di insulina/topo da 20 g							
Numero dei topi	20	—	10	—	10	—	10
Tempo intercorso tra le convulsioni e la morte (min.). Media $\pm$ S.E.M.	13.5 $\pm$ 2.1	—	99.9 $\pm$ 13.3	—	36.9 $\pm$ 5.1	—	29 $\pm$ 5.8
Numero degli animali sopravvissuti	0	—	2	—	0	—	0

50 mg. di glucosio/topo di 20 g., fosse insufficiente a garantire una completa protezione, tuttavia questa è stata la maggior quantità sperimentata, a causa della tossicità degli esteri fosforici ad alte concentrazioni; in effetti una dose di mg. 50 di G-1-P o di G-6-P, era meno efficace nel prolungare la vita, di una dose di 25 mg.

Le affermazioni di MARKS e MORGAN (²⁴), secondo cui una iniezione sottocutanea di esosomono-o-difosfato non attenuava i sintomi di convulsioni da insulina nei conigli o nei topi, possono essere facilmente spiegate nelle loro esperienze coi topi, dal fatto che la dose di esteri fosforici iniettata (100 mg./topo, espressi come glucosio), era tossica.

I nostri risultati hanno provato che sia il G-1-P come il G-6-P, prolungavano la vita dei topi dopo l'inizio delle convulsioni da insulina, pur essendo meno efficaci del glucosio; la ragione di ciò non è chiara.

2. - ESPERIENZE IN VITRO CON DIAFRAMMA ISOLATO DI RATTO

IL METABOLISMO DEL G-1-P.

Il metabolismo del G-1-P nel diaframma di ratto normale, è stato paragonato a quello del glucosio per quel che riguarda la scomparsa del substrato, la formazione del glicogeno e l'effetto sulla respirazione. L'influenza dell'insulina sull'utilizzazione del glucosio, è stata inoltre paragonata a quella esercitata sull'utilizzazione del G-1-P.

Scomparsa del substrato. I risultati sono stati riportati nella tab. 7. Appare evidente che la scomparsa del G-1-P è stata maggiore di quella del glucosio in assenza di insulina, ma che l'insulina ha provocato un significativo aumento nella scomparsa del glucosio [come è stato osservato per primo da GEMMILL e HAMMAN (²⁵) e confermato più tardi da altri Autori (²⁶)], ed una altrettanto significativa diminuzione nella scomparsa del G-1-P (*).

Sintesi del glicogeno. I risultati dati in tabella 8, mostrano che la quantità di glicogeno sintetizzata sia dal glucosio che dal G-1-P, dipendeva in gran parte dalla concentrazione iniziale del glicogeno presente nel diaframma, in accordo con i risultati di HANSEN, RUTTER e SA-

(*) Dopo che questo lavoro era stato terminato, gli Autori hanno osservato che parte del G-1-P è trasformato nel mezzo in F-6-P.

TABELLA 7. — Effetto dell'insulina sull'utilizzazione del glucosio e del G-1-P da parte del diaframma di ratto.

(I risultati sono espressi in mg. di substrato scomparso dal mezzo/g. di peso umido di diaframma in 90 minuti a 37°, in O₂ (media dei valori $\pm$ S.E.M.). Substrati: 0,2% insulina: 1 unità/cm³ di mezzo. Un effetto dell'insulina positivo o negativo indica rispettivamente un aumento o una diminuzione nella utilizzazione del substrato.)

Numero dei ratti	Substrato	Substrato scomparso		Effetto della insulina
		Senza insulina	Con insulina	
12	Glucosio	4,40* $\pm$ 0,30	9,73 $\pm$ 0,69	+5,33 $\pm$ 0,33 P < 0,01
10	G-1-P	7,08* $\pm$ 0,58	4,46 $\pm$ 0,57	-2,6 $\pm$ 0,33 P < 0,01

(*) In assenza d'insulina vi è una notevole significativa differenza nella scomparsa del glucosio e del G-1-P (P < 0,01).

TABELLA 8. — Effetto dell'insulina sulla glicogenesi da glucosio e da G-1-P da parte del diaframma di ratto.

(I diaframma sono stati incubati per 90 minuti a 37° in 3 cm³ di mezzo in O₂. Le medie dei valori sono date $\pm$ S.E.M. Substrati: glucosio o G-1-P al 2%. Insulina: 1 unità/cm³ di mezzo. La sintesi di glicogeno indica l'aumento del glicogeno dal suo valore iniziale. Un effetto positivo o negativo dell'insulina indica rispettivamente un aumento od una diminuzione della sintesi del glicogeno.)

Numero dei ratti	Contenuto iniziale di glicogeno del diaframma		Substrato	Sintesi di glicogeno del tessuto (mg/g di peso umido)		Effetto dell'insulina	P
	Valori limiti	Media dei valori		Senza insulina	Con insulina		
4	0,20-0,39	0,25	G-1-P	0,88 $\pm$ 0,20	0,72 $\pm$ 0,11	-0,16 $\pm$ 0,12	0,85
5	0,40-0,59	0,49	Glucosio	0,76 $\pm$ 0,14	1,57 $\pm$ 0,38	+0,81 $\pm$ 0,32	0,10
5	0,40-0,59	0,49	G-1-P	0,72 $\pm$ 0,26	0,78 $\pm$ 0,25	+0,06 $\pm$ 0,04	0,85
8	0,60-0,79	0,69	Glucosio	0,65 $\pm$ 0,15	1,09 $\pm$ 0,14	+0,44 $\pm$ 0,09	0,04
6	0,60-0,79	0,66	G-1-P	0,70 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,26	+0,16 $\pm$ 0,01	0,60
6	0,80-0,99	0,88	Glucosio	0,45 $\pm$ 0,16	0,60 $\pm$ 0,09	+0,15 $\pm$ 0,09	0,40
4	0,80-0,99	0,91	G-1-P	0,47 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,08	-0,04 $\pm$ 0,02	0,70
6	> 1,00	1,25	Glucosio	0,02 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,16	+0,56 $\pm$ 0,13	0,05
6	> 1,00	1,39	G-1-P	0,12 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02	-0,03 $\pm$ 0,01	0,90

I risultati sono considerati significativi per P $\leq$ 0,1.

MUELS (²⁷). Di conseguenza, le esperienze sono state divise in gruppi a seconda del contenuto iniziale di glicogeno. Quando la concentrazione iniziale superava 1 mg./g. di peso umido di tessuto, generalmente c'era poca o nessuna sintesi di glicogeno, ed in alcuni casi era osservata una glicogenolisi. In accordo poi con i risultati di altri Autori (²⁸), nella maggior parte dei casi, è stato trovato un significativo aumento nella sintesi di glicogeno da glucosio in presenza di insulina (Tab. 8); soltanto nel gruppo con un contenuto iniziale di glicogeno di 0,88 mg./g. (valore medio), l'effetto dell'insulina osservato in presenza di glucosio non è stato significativo. In presenza di G-1-P invece, in tutti i gruppi non vi è stato alcun effetto significativo dell'insulina. I substrati sono stati usati ad una concentrazione del 2%, dato che a concentrazione inferiore la sintesi di glicogeno da G-1-P era molto bassa o nulla (²⁹).

Al fine di accertarsi, che la differenza nell'effetto dell'insulina sulla sintesi del glicogeno tra i sistemi contenenti glucosio e quelli contenenti G-1-P, non era dovuta all'aumentata concentrazione ionica del mezzo, causata dalla presenza dell'esosofosfato, alcune esperienze sono state eseguite con glucosio in un mezzo contenente una concentrazione maggiore di NaCl (0,20 M), cosicchè le condizioni ioniche del mezzo si avvicinassero molto a quelle delle esperienze con G-1-P. I risultati dati in tabella 9, mostrano che l'effetto dell'insulina non è alterato dalla maggiore concentrazione ionica del mezzo. Dato che solo quattro ratti sono stati usati per queste esperienze, non è stata eseguita alcuna elaborazione statistica dei risultati.

TABELLA 9. — Influenza della concentrazione ionica sull'effetto dell'insulina nella glicogenesi.

(I diaframma sono stati incubati per 90 minuti a 37° in 3 cm³ di mezzo contenente glucosio (2%) ed 1 unità d'insulina/cm³. Fase gassosa: O₂. Le medie dei valori sono date $\pm$ S.E.M.).

Numero dei ratti	Glicoceno iniziale del tessuto (mg g di peso umido)	Concentrazione del NaCl nel mezzo (M)	Aumento nel glicogeno del tessuto (mg/g peso umido)
8	0,69	0,08	0,44* $\pm$ 0,09
4	0,66	0,20	0,44 $\pm$ 0,02

(*) Risultati ricavati dalla tabella 8.

Si potrebbe obiettare che l'aggiunta di fosfato sodico nel mezzo, al posto del cloruro sodico, avrebbe creato condizioni ioniche più simili a quelle esistenti in presenza del sale sodico dell'estere fosforico; ciò, d'altra parte, non è praticamente realizzabile, per l'effetto inibitore di elevate concentrazioni di fosfato inorganico sulla sintesi del glicogeno, come è stato già descritto negli esperimenti su diaframma di ratto da STADIE e ZAPP (23) e confermato dagli AA.

Consumo di ossigeno. Secondo i risultati delle esperienze dati in tabella 10, il consumo di ossigeno da parte del diaframma incubato con

TABELLA 10. — Consumo di ossigeno da parte del diaframma di ratto in presenza di glucosio, G-1-P e G-6-P.

(I risultati sono espressi in μ l. di O_2 /100 mg. di peso umido di diaframma in 90 minuti a 37° in O_2 . I valori medi sono dati $\pm$ S.E.M. Substrati: glucosio, G-1-P e G-6-P al 2%. I semidiaframma provenienti da ogni ratto sono stati incubati rispettivamente in glucosio e G-1-P, o in glucosio e G-6-P).

Numero dei ratti	Consumo in O_2 (μ l)		Aumento del consumo di ossigeno in presenza di G-1-P (μ l)
	Glucosio	G-1-P	
8	$209 \pm 6,6$	$324 \pm 17,4$	$115 \pm 16,7$ $P = 0,01$
3	Glucosio	G-6-P	
	230 ± 10	217 ± 14	

G-1-P, è notevolmente maggiore di quello osservato nell'incubazione del muscolo con glucosio. L'aggiunta di glucosio al mezzo non ha avuto alcun effetto sulla respirazione del diaframma.

Effetto del 2-4-dinitrofenolo sulla respirazione. Un'altra interessante differenza tra il comportamento del glucosio e quello del G-1-P, è l'effetto del DNP sulla respirazione del diaframma di ratto in presenza di questi substrati. Dalla tab. 11 risulta che il DNP mentre aumenta notevolmente il consumo di ossigeno in presenza di glucosio, a conferma dei

TABELLA 11. --- Effetto del 2-4-dinitrofenolo (DNP) sul consumo di ossigeno da parte del diaframma in presenza di glucosio o di G-1-P.

(I risultati sono espressi in $\mu\text{l.}$ di $\text{O}_2/100$ mg. di peso umido di diaframma/90 min. a 37° in O_2 . Le medie dei valori sono date $\pm$ S.E.M. Concentrazione del DNP: $4,83 \cdot 10^{-5}$ M. Un effetto positivo o negativo del DNP indica rispettivamente un aumento od una diminuzione nel consumo dell' O_2 . I semidiaframma provenienti da ogni ratto sono stati incubati rispettivamente con e senza DNP).

Numero dei ratti	Substrato (2%)	Consumo dell' O_2 ($\mu\text{l.}$)		Effetto del DNP
		Senza DNP	Con DNP	
9	Glucosio	170 ± 10	$342 \pm 13,4$	$+172 \pm 16,6$ $P < 0,01$
9	G-1-P	$273 \pm 8,9$	$168 \pm 8,7$	$-105 \pm 12,7$ $P < 0,01$

risultati di PIERCE e FIELD (³⁰), diminuisce considerevolmente tale consumo in presenza di G-1-P.

IL METABOLISMO DEL G-6-P E DEL F-6-P.

Equilibrio tra il G-6-P ed il F-6-P. E' stato trovato che nel diaframma di ratto, è presente una fosfoisomerasi molto attiva, descritta da LOHMANN (³¹) nelle sospensioni di muscolo e da WAJZER (³²) nel sangue emolizzato, che agisce sul F-6-P o sul G-6-P, formando una miscela di equilibrio dei due esteri fosforici contenente circa il 40% di F-6-P ed il 60% di G-6-P. La trasformazione di un estere nell'altro, è stata misurata determinando la scomparsa del F-6-P quando questo è aggiunto al mezzo, oppure la formazione del F-6-P quando il substrato aggiunto è stato il G-6-P (tabella 12). Anche per il fatto che il P totale del mezzo non era variato durante l'incubazione, si è pensato ad una isomerizzazione di un estere fosforico nell'altro. Tale ipotesi è stata confermata dalla cromatografia su carta secondo il metodo di HANES e ISHERWOOD (³³).

Si è trovato che la fosfoisomerasi era attiva a temperatura ambiente, e che l'equilibrio si stabiliva in circa 15 minuti; l'enzima inoltre sembrava diffondere facilmente dal muscolo. A conferma di ciò, lavando

il diaframma in 2 cm³ di mezzo per 15 minuti, si è ottenuto un estratto attivo dell'isomerasi, e ripetendo questa estrazione per tre volte, ciascuna con 3 cm³ di mezzo, l'isomerasi era attiva in ciascun estratto, ed il diaframma stesso manteneva ancora una certa attività.

TABELLA 12. — Isomerizzazione del F-6-P e del G-6-P da parte del diaframma di ratto. (Il diaframma di ratto è stato incubato per 30 minuti a 37° in presenza di F-6-P o di G-6-P. Le medie dei valori sono date $\pm$ S.E.M.).

Numero dei ratti	Substrato e sua concentrazione	F-6-P scomparso dal mezzo (%)	G-6-P trasformato in F-6-P (%)
3	G-6-P al 2%	—	$44 \pm 0,55$
3	F-6-P al 2%	$62 \pm 2,65$	—
3	G-6-P al 0,2%	—	$47 \pm 1,0$
3	F-6-P al 0,2%	$60 \pm 2,52$	—

Nelle esperienze seguenti sul consumo di ossigeno e sulla sintesi di glicogeno, il G-6-P è stato aggiunto, come substrato, ad una concentrazione finale del 2%; tuttavia, a causa della rapida formazione della miscela di equilibrio dovuta all'isomerasi, il mezzo in effetti conteneva circa lo 0,8% di F-6-P e l'1,2% di G-6-P.

Consumo di ossigeno. I risultati di queste esperienze, dati in tabella 10, mostrano che non vi è alcun aumento nel consumo di ossigeno quando si aggiunga come substrato il G-6-P.

Sintesi di glicogeno. I risultati riportati in tabella 13, mostrano che quando il diaframma è incubato in una miscela di equilibrio di G-6-P e di F-6-P, in assenza di insulina, avviene una glicogenolisi. In presenza di insulina, nella maggior parte delle esperienze, la glicogenolisi è inibita, ed in alcuni casi, si è avuta una piccola sintesi di glicogeno.

IL METABOLISMO DEL FRUTTOSIODIFOSFATO.

Come si può vedere dai risultati dati in tabella 13, non vi è stata alcuna sintesi di glicogeno in presenza di F-1-6-P al 2%. Non è stato fatto alcun paragone diretto tra la respirazione in presenza di glucosio, e quel-

TABELLA 13. — Cambiamento nel contenuto di glicogeno del diaframma di ratto incubato con G-6-P con e senza insulina, o incubato con F-1-6-P con insulina.

(I diaframma sono stati incubati per 90 min. a 37° in 3 cm³ di mezzo in O₂. Le medie dei valori sono date $\pm$ S.E.M. I substrati sono ad una concentrazione del 2%. Insulina: 1 unità/cm³ di mezzo. Una variazione negativa indica glicogenolisi).

Numero dei ratti	Contenuto iniziale di glicogeno del diaframma (mg/g di peso umido)		Substrato aggiunto	Variazione del contenuto in glicogeno (mg/g di peso umido)		Effetto dell'insulina	P
	Valori limiti	Media dei valori		Senza insulina	Con insulina		
8	0,20-0,59	0,32	G-6-P	-0,02 $\pm$ 0,01	+0,19 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,10
8	0,60-1,00	0,82	G-6-P	-0,07 $\pm$ 0,01	+0,22 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,10	0,10
9	1	1,32	G-6-P	-0,12 $\pm$ 0,05	+0,07 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,10	0,02
4	0,4-0,8	0,66	F-1-6-P	-0,44 $\pm$ 0,10	—	—	—

la in presenza di F-1-6-P con emidiaframma di medesimi ratti; ciononostante, la scomparsa dell'ossigeno osservata in presenza del F-1-6-P al 2%, è stata dello stesso ordine di grandezza di quella trovata in altre esperienze con glucosio al 2% come substrato.

DISCUSSIONE

Esperienze in vivo. I risultati riportati nel presente lavoro mettono in evidenza due punti principali. Primo contrariamente a quanto è stato suggerito in letteratura (³⁴), gli esoso-fosfati possono penetrare nelle cellule dei tessuti e quindi essere metabolizzati. La rapida scomparsa dal sangue del G-1-P e del G-6-P iniettati per via endovenosa, che non può essere spiegata da un'attività fosfotatica del sangue o da una escrezione quantitativa degli esteri nell'urina, può spiegarsi soltanto con il passaggio degli esteri dal sangue e dagli spazi extracellulari nelle cellule dei tessuti. I susseguenti aumenti della glicemia e del fosforo inorganico nel sangue e nell'urina, forniscono una prova evidente che gli esteri vengono metabolizzati nelle cellule, sebbene non si possa ancora dire quali siano i tessuti interessati.

E' impossibile calcolare dai nostri risultati, in quali proporzioni le

fosfatasi dei tessuti abbiano agito sugli esteri fosforici iniettati; tuttavia, se l'unica via per il metabolismo degli esteri fosse l'idrolisi in glucosio e fosforo inorganico, ci si potrebbe aspettare sempre un aumento notevolmente maggiore della glicemia nei conigli diabetici, particolarmente in quelle esperienze eseguite su animali con ureteri legati.

Per quanto riguarda la questione della permeabilità degli esosolfati nelle cellule viventi, è interessante il lavoro di ROBERTS e WOLFFE (³⁵). Questi Autori riferiscono che, usando F-6-P e F-1-6-P marcati P^{32} , le cellule delle « *Escherichia coli* » sono facilmente permeabili a questi esteri.

Il fatto che circa il 30% del G-1-P ed il 40-50% del G-6-P iniettati, vengono escreti nell'urina, è interessante in quanto indica che i due esteri fosforici, devono trasferirsi intatti attraverso la membrana glomerulare, o meno probabilmente, attraverso i tubuli.

Il secondo punto interessante che si deduce dagli esperimenti in vivo, è che sia il G-6-P come il G-1-P, a differenza del glucosio, risultano avere una curva normale di tolleranza nel coniglio diabetico da allossana, e che la escrezione di questi esteri è stata essenzialmente la stessa sia negli animali normali come in quelli diabetici. Questi risultati possono essere interpretati come una ulteriore prova a favore dell'ipotesi che almeno un blocco nel metabolismo dei carboidrati dell'animale diabetico, possa trovarsi nella fosforilazione del glucosio.

Esperienze in vitro. La prima osservazione interessante che si deduce da queste esperienze con diaframma di ratto, è l'assenza di un effetto positivo dell'insulina sulla scomparsa del substrato e sulla sintesi del glicogeno in presenza di G-1-P, a differenza dell'effetto osservato in presenza di glucosio. Questa osservazione è in accordo con la teoria che l'azione dell'insulina sia connessa con una fosforilazione preliminare del glucosio. Questa teoria, tuttavia, non può spiegare l'effetto apparentemente inibitore dell'insulina sulla scomparsa del G-1-P, e gli AA., attualmente, non possono dare alcuna spiegazione per questo effetto. Anche per l'aumentato consumo di ossigeno da parte del diaframma di ratto in presenza di G-1-P, e per l'azione del DNP sui sistemi studiati, non si può, al presente, fornire alcuna spiegazione.

Il secondo importante risultato di queste esperienze, è dato dalla fondamentale differenza di comportamento osservata tra il G-1-P ed il G-6-P in presenza di diaframma di ratto. Si è visto che il G-6-P forma rapidamente una miscela di equilibrio con il F-6-P, e che il diaframma incubato in questa miscela, non sintetizza glicogeno nè mostra un aumen-

to nel consumo di ossigeno. In effetti si è trovato che il G-6-P, contrariamente al G-1-P, è relativamente inerte. Queste osservazioni non sono in accordo con le teorie generalmente accettate sul metabolismo del glucosio, teorie che suppongono che il G-6-P sia sempre il primo composto intermedio.

Gli AA. ringraziano la Burroughs Welcome e C. per aver loro fornito l'insulina usata in questo lavoro.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) V. B. WIGGLESWORTH, C. E. WOODROW, W. SMITH e L. B. WINTER: *J. Physiol.*, 57, 447 (1923); G. A. HARROP jun. e E. M. BENEDICT: *J. Biol. Chem.*, 59, 683 (1924); A. BOLLINGER e F. W. HARTMAN: *J. Biol. Chem.*, 64, 91 (1925).
- (²) C. F. CORI e G. T. CORI: *J. Biol. Chem.*, 94, 581 (1932).
- (³) S. SOSKIN, R. LEVINE e O. HECHTER: *Amer. J. Physiol.*, 134, 40 (1941).
- (⁴) N. NELSON, S. RAPOPORT, G. M. GUEST e I. A. MIRSKY: *J. Biol. Chem.*, 144, 291 (1942).
- (⁵) N. O. KAPLAN e D. M. GREENBERG: *Amer. J. Physiol.*, 140, 598 (1943); N. O. KAPLAN e D. M. GREENBERG: *J. Biol. Chem.*, 156, 525 (1944).
- (⁶) J. SACKS: *Amer. J. Physiol.*, 143, 157 (1945).
- (⁷) N. HAUGAARD, J. B. MARSH e W. C. STADIE: *J. Biol. Chem.*, 189, 59 (1951).
- (⁸) W. H. PRICE, C. F. CORI e S. P. COLOWICK: *J. Biol. Chem.*, 160, 633 (1945).
- (⁹) W. C. STADIE, N. HAUGAARD e A. G. HILLS: *J. Biol. Chem.*, 184, 617 (1950).
- (¹⁰) A. BELOFF-CHAIN, D. BOVET, E. B. CHAIN e F. POCCHIARI: *Rend. Accad. Lincei* [8], 10, 280 (1951).
- (¹¹) C. A. KUETHER: *Amer. J. Physiol.*, 167, 355 (1951).
- (¹²) R. M. MCCREADY e W. Z. HASSID: *J. Amer. Chem. Soc.*, 66, 560 (1944).
- (¹³) J. E. SEEGMILLER e B. L. HORECKER: *J. Biol. Chem.*, 192, 175 (1951).
- (¹⁴) E. CHERBULIEZ e H. WENIGER: *Helv. Chim. Acta*, 29, 2006 (1946).
- (¹⁵) C. NEUBERG e H. LUSTIG: *J. Amer. Chem. Soc.*, 64, 2722 (1942).
- (¹⁶) C. NEUBERG, H. LUSTIG e M. A. ROTHENBERG: *Arch. Biochem.*, 3, 33 (1943).
- (¹⁷) B. F. MILLER e D. D. VAN SLYKE: *J. Biol. Chem.*, 114, 583 (1936).
- (¹⁸) J. BERENBLUM e E. CHAIN: *Biochem. J.*, 32, 295 (1938).
- (¹⁹) C. A. GOOD, H. KRAMER e M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, 100, 485 (1933).
- (²⁰) W. C. STADIE, N. HAUGAARD e J. B. MARSH: *J. Biol. Chem.*, 188, 167 (1951).
- (²¹) J. H. ROE: *J. Biol. Chem.*, 107, 15 (1934).
- (²²) C. L. GEMMILL: *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, 66, 232 (1940); C. L. GEMMILL: *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, 68, 329 (1941).
- (²³) W. C. STADIE e J. A. ZAPP jun.: *J. Biol. Chem.*, 170, 55 (1947).
- (²⁴) H. P. MARKS e W. T. J. MORGAN: *Biochem. J.*, 21, YAD (1927).
- (²⁵) C. L. GEMMILL e L. HAMMAN: *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, 68, 50 (1941).
- (²⁶) W. C. STADIE: *Jale J. Biol. Med.*, 16, 539 (1944); M. E. KRAHL e C. F. CORI: *J. Biol. Chem.*, 170, 607 (1947); M. PERLMUTTER e R. O. GREEP: *J. Biol. Chem.*, 174, 915 (1948); M. E. KRAHL e C. R. PARK: *J. Biol. Chem.*, 174, 939 (1948); C. A. VILLEE e A. B. HASTINGS: *J. Biol. Chem.*, 179, 673 (1949).
- (²⁷) R. G. HANSEN, W. J. RUTTER e L. T. SAMUELS: *J. Biol. Chem.*, 179, 673 (1949).

- (²⁸) C. L. GEMMILL: Johns Hopk. Hosp. Bull., 68, 329 (1944); W. C. STADIE e J. A. ZAPP jun.: J. Biol. Chem., 170, 53 (1947); A. B. CORKILL e J. F. NELSON: Med. J. Aust., 1, 172 (1947); M. PERLMUTTER e R. O. GREEP: J. Biol. Chem., 174, 913 (1948); C. A. VILLEE e A. B. HASTINGS: J. Biol. Chem., 179, 673 (1949).
- (²⁹) F. VERZÀR e V. WENNER: Biochem. J., 42, 35 (1948).
- (³⁰) F. T. PIERCE e J. FIELD: J. Biol. Chem., 180, 893 (1949).
- (³¹) K. LOHMANN: Biochem. Z., 262, 137 (1933).
- (³²) J. WAJZER: Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 33, 1353 (1931).
- (³³) C. S. HANES e F. A. ISHERWOOD: Nature, Lond., 164, 1107 (1949).
- (³⁴) E. J. CONWAY: Nature, Lond., 150, 461 (1942); F. VERZÀR e V. WENNER: Biochem. J., 42, 35 (1948).
- (³⁵) I. Z. ROBERTS e E. L. WOLFFE: Arch. Biochem. Biophys., 66, 165 (1951).
-