

## Il contributo scientifico di Francesco Pocchiari sul metabolismo intermedio del glucosio

G. D'Agnolo (\*)

Nel 1950 Francesco Pocchiari lasciò il Laboratorio di Biologia dell'Istituto Superiore di Sanità, dove stava sviluppando dei nuovi metodi chimici per il controllo delle vitamine nelle specialità medicinali, per lavorare con Ernst Boris Chain, che aveva assunto la direzione del Centro Internazionale di Chimica Microbiologica. Chain, premio Nobel nel 1945 insieme a Howard Florey per l'estrazione, la purificazione e la caratterizzazione strutturale della penicillina, aveva accettato l'invito del Prof. Domenico Marotta, Direttore dell'Istituto, per organizzare il Centro che in breve tempo divenne la fucina culturale dalla quale emerse l'industria delle fermentazioni in Italia. A Roma, Chain, avendo in animo di sviluppare una nuova linea di ricerca sui meccanismi biochimici dei controlli ormonali, aveva chiesto a Marotta di assegnargli dei giovani assistenti appassionati alla ricerca. Pocchiari ricordò l'incontro con Chain scrivendo: "*Quando il Professor Marotta mi chiamò nell'ufficio del Professor Chain, non avevo allora la più pallida idea di quanto importante sarebbe stato quell'incontro per la mia carriera e la mia intera vita. Nonostante la mia inesperienza nella ricerca biochimica, la guida paziente e rigorosa del Professor Chain mi consentì di ottenere risultati interessanti fin dai primi esperimenti*" [1]. Pocchiari fu entusiasta di questa opportunità inaspettata che gettò le basi del filo conduttore che ispirò tutta la sua vita scientifica e cioè l'applicazione di tecniche chimiche alla soluzione di problemi biologici.

In anni più recenti Francesco Pocchiari ebbe modo in molte occasioni di esprimere preoccupazione per l'abbandono di questo tipo di studi in Italia e per la prevalenza di studi puramente molecolari nel settore biomedico. Tale preoccupazione era rafforzata dalle molte occasioni nelle quali, come direttore dell'Istituto Superiore di Sanità, era chiamato a valutare i rischi per gli organismi viventi associati all'uso di sostanze chimiche (farmaci, additivi e conservanti alimentari, contaminanti ambientali, ecc.).

---

(\*) *Direttore del Laboratorio di Biologia Cellulare.*

All'inizio degli anni 50 la ricerca sul diabete, che Pocchiari intraprese con Chain, era caratterizzata da due schieramenti scientifici: l'uno considerava la malattia dovuta alla non utilizzazione dell'insulina, l'altro dovuta ad una sovrapproduzione dell'ormone. In quegli anni comparvero anche i primi lavori sul meccanismo d'azione dell'insulina dovuti all'impiego di metaboliti marcati ed allo sviluppo di dosaggi enzimatici molto sensibili. Una delle prime ipotesi al riguardo fu avanzata da Price, Cori e Colowick [2] secondo i quali l'insulina agiva accelerando la fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato da parte dell'esochinasi. La teoria dell'esochinasi portò ad una fioritura di lavori sul metabolismo intermedio dei carboidrati sia *in vivo* sia *in vitro*, che tuttavia non confermarono [3] le osservazioni di Price, Cori e Colowick. Maggiori favori incontrava la cosiddetta teoria della permeabilità secondo la quale l'insulina agiva aumentando la permeabilità cellulare al glucosio [4].

In questo quadro, il gruppo costituitosi intorno a Chain, composto da Pocchiari, Anne Beloff-Chain, Raffaella Catanzaro e Luigi Longinotti iniziò a studiare il metabolismo *in vivo* del glucosio e dei suoi metaboliti fosforilati glucosio-1-fosfato e glucosio-6-fosfato. La somministrazione endovenosa dei tre substrati in conigli normali ed in conigli resi diabetici per mezzo del trattamento con allossana permisero di seguirne la cinetica di assorbimento [5]. Nei conigli normali, la velocità di assorbimento del glucosio non era lineare in funzione del tempo, ma andava a saturazione entro un'ora dalla somministrazione mano a mano che la concentrazione intracellulare del glucosio saliva facendo diventare limitante la sua velocità di rimozione metabolica. La cinetica del trasporto degli esoso-fosfati era invece del primo ordine, indicando una velocità di rimozione metabolica superiore alla velocità di trasporto. Questi risultati non erano dovuti all'idrolisi degli esoso-fosfati, poiché sia il glucosio-1-fosfato che il glucosio-6-fosfato, incubati *in vitro* con sangue di coniglio a 37 °C, erano stabili per più di due ore. Inoltre, glucosio ed esoso-fosfati non erano in competizione per lo stesso carrier, dato che non si osservava alcuna apprezzabile variazione nella velocità di assorbimento quando venivano somministrati in presenza di glucosio.

La velocità di assorbimento del glucosio-1-fosfato e del glucosio-6-fosfato era infine analoga negli animali normali e negli animali diabetici. Sebbene la complessità dei fenomeni osservata *in vivo* non consentisse di avanzare conclusioni sui meccanismi coinvolti, questi primi esperimenti dimostravano che gli esoso-fosfati penetravano nelle cellule gettando così le basi per i successivi esperimenti *in vitro*.

Utilizzando il diaframma isolato di ratto fu possibile dimostrare che il glucosio-1-fosfato dava origine ad una sintesi di glicogeno, al contrario del glucosio-6-fosfato che dava origine rapidamente ad un equilibrio con il fruttosio-6-fosfato ed era un cattivo substrato per la sintesi del glicogeno. Questo complesso di risultati portò gli autori a concludere che "these observations are not consistent with the generally accepted theories of glucose metabolism, in which it is assumed that G-6-P is always the first intermediate" [5] ed a tutto il lavoro successivo sugli stadi iniziali del metabolismo del glucosio.

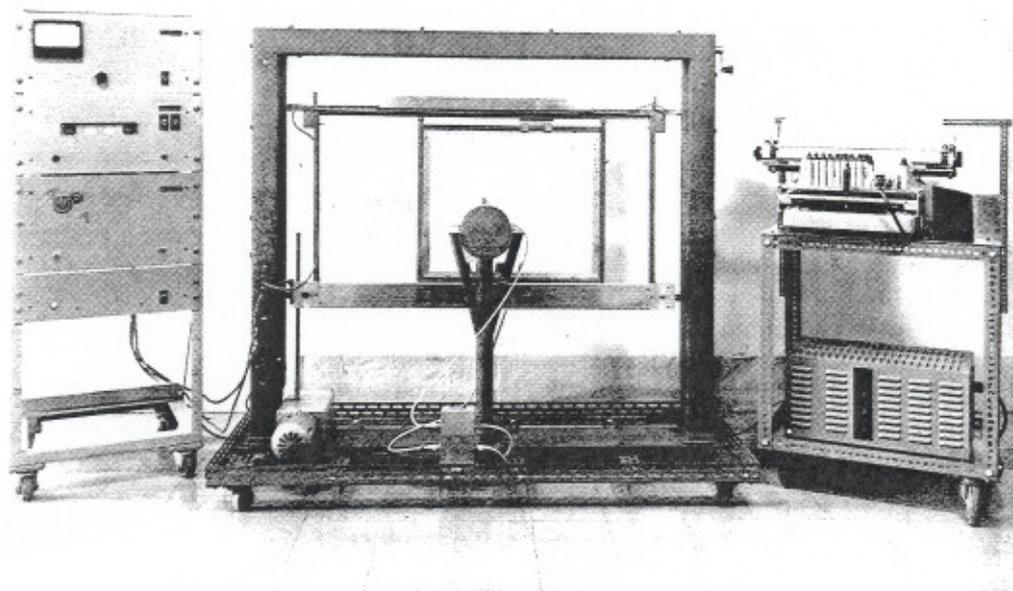


Fig. 1. - Apparato per l'autoradiocromatografia quantitativa. Il foglio del cromatogramma su carta, montato su un telaio, passa tra due contatori Geiger; esso si muove orizzontalmente a intervalli di tempo prefissati (che variano a seconda che la zona esplorata sia radioattiva o no), per tratti di 1 cm alla volta; quando l'intera lunghezza del foglio è stata esplorata, ritorna alla sua posizione di origine e contemporaneamente scende di 1 cm; ha così inizio l'esplorazione della striscia successiva. Quando l'intero cromatogramma è stato esplorato l'apparecchio si ferma automaticamente. Gli impulsi dei Geiger sono contati da una scala costituita da una serie di tubi Dekatron. Alla fine di ogni periodo di esplorazione le cifre registrate dai tubi sono trascritte mediante un sistema elettronico che attiva una serie di pulsanti elettromagnetici sui tasti di una macchina da scrivere elettrica, il cui carrello si muove nei due sensi in sincronismo con il telaio portante il cromatogramma. Il numero di impulsi stampato dalla macchina da scrivere, corrisponde, in intensità ed in posizione, alle zone radioattive del cromatogramma.

Allo scopo di analizzare in termini quantitativi il metabolismo dei carboidrati, il gruppo di Chain e Pocchiari iniziò una fase di sperimentazione delle tecniche di radiocromatografia quantitativa che portarono alla progettazione ed alla costruzione in Istituto di una serie di apparati capaci di una esplorazione quantitativa bidimensionale di cromatogrammi su carta. Gli apparati, unici al mondo (Fig. 1), sviluppati in collaborazione con Marco Frank del Laboratorio di Fisica, Francesco Ugolini e Giorgio Ugolini del Laboratorio di Ingegneria Sanitaria [6], consentirono di ottenere una mappa digitalizzata sovrapponibile alle autoradiografie ottenute dallo stesso cromatogramma (Fig. 2) [6, 7]. Allo sviluppo dell'apparecchiatura ed alla sua successiva utilizzazione per lo studio del metabolismo intermedio in una serie di tessuti *in vivo* ed *in vitro* contribuirono Cesare Rossi ed Ines Masi, entrambi prematuramente scomparsi, che, in





Fig. 3. - Il gruppo che ha sviluppato le apparecchiature di autoradiocromatografia quantitativa. Dall'alto in basso, da sinistra verso destra: R. Magrini, G. Cervelli, A. Riccardi, R. Borghesi, G. Bedetti, L. Da Cas, A. Corradini, S. Margherita, A. Casagrande, D. Bella, non identificato, U. De Angelis, F. Minelli, R. Gabriele, L. Bressan, V. De Simoni, S. D'Agostino, C. Cantello, R. Morici, M. De Angelis, C. Rossi, I. Masi, F. Pocchiari, Sandman, A. Beloff-Chain, E. Beloff-Chain, M. Frank, R. Catanzaro, M. Oddo, M. Magliola, V. Baroncelli, C. Infanti, L. Longinotti.

Remo Gabriele, Gianfranco Bedetti, Carlo Cantello e più tardi Rossana Borgna che dettero un notevole contributo pratico alla realizzazione tecnica dei progetti di ricerca sul metabolismo intermedio.

La tecnica della cromatografia quantitativa consentì di studiare il destino metabolico di una serie di intermedi della glicolisi e della gluconeogenesi nel muscolo, nel fegato, nel tessuto adiposo e nel cervello di ratti normali o resi diabetici con allossana, sia in presenza che in assenza di insulina. Tali studi ebbero una particolare espansione *in vitro* e consentirono di verificare gli effetti modulanti di pH, forza ionica, natura del tampone, condizioni di aerobiosi ed anaerobiosi, ecc., sul metabolismo intermedio del glucosio. I risultati ottenuti erano in contrasto con entrambe le teorie correnti sul meccanismo d'azione dell'insulina [2, 4]. L'ipotesi della permeabilità [4] non era verificata nel diaframma di ratto, nel quale né la quantità di glucosio presente nella cellula né la velocità di assorbimento del glucosio nelle cellule era influenzato dall'insulina. Inoltre l'insulina non aveva alcun effetto sulla formazione degli esoso-fosfati, risultato che era in disaccordo con la teoria dell'esochinasi [2]. Mentre l'effetto dell'insulina sulla sintesi di glicogeno poteva essere misurata dopo 10 min dall'inizio dell'incubazione, gli esoso-fosfati si accumulavano con il tempo. Ad esempio, incubando il diaframma di ratto in presenza di glucosio uniformemente marcato per 30 min e successivamente per un'altra ora in assenza di glucosio, si osservava una diminuzione del glicogeno dopo rimozione del glucosio, accompagnata da un forte aumento nella concentrazione degli esoso-fosfati. Questi risultati erano in accordo con l'ipotesi che gli esoso-monofosfati non fossero i primi intermedi del metabolismo del glucosio, ma fossero prodotti di degradazione del glicogeno. Veniva in questo modo messa in discussione l'assunzione che il glucosio-6-fosfato fosse un intermedio obbligato nella sintesi di glicogeno da glucosio ed avanzata l'ipotesi dell'esistenza di due compartimenti cellulari distinti per il glucosio-6-fosfato.

Pocchiari presentò un'eccellente rassegna dei risultati ottenuti in quegli anni al IV FEBS Meeting di Oslo nel 1967 [9] per cui non è necessario entrare nei dettagli degli altri studi condotti tra il 1955 ed il 1964, quando Chain tornò a Londra a dirigere il Dipartimento di Biochimica all'Imperial College in seguito alle vicende giudiziarie in cui furono coinvolti Domenico Marotta, ed il suo successore alla guida dell'Istituto il Prof. Giordano Giacomello.

Il clima di sfiducia che regnava in Istituto in quegli anni indusse molti valenti ricercatori a trasferirsi all'Università o nell'industria privata. Pocchiari, dopo aver valutato a fondo un'offerta di una cattedra da parte dell'Università del Maryland ed una analoga dell'Imperial College a Londra, decise di riprendere in Istituto il lavoro sul metabolismo intermedio. Nonostante le difficili condizioni di quegli anni, caratterizzati da manifestazioni e scioperi del personale a sostegno di una profonda riforma strutturale dell'Istituto, Pocchiari con i suoi collaboratori gettò le basi per lo sviluppo di alcuni filoni culturali nuovi che saranno poi la premessa di una parte della storia scientifica dell'Istituto negli anni della sua direzione. Luigi Longinotti e Peppino Betto, che si era unito al

gruppo nel 1958, svilupperanno le tecniche analitiche e microenzimatiche messe a punto per lo studio dei nucleotidi fosforilati rilevanti nella glicolisi e glicogenosintesi, come ATP, UDP-glucosio, ecc., in nuovi metodi per analisi chimico-farmaceutiche. Seguendo lo stesso filone Valeria Baroncelli, recentemente scomparsa, sviluppava nel 1982 il Servizio Farmacosorveglianza Tecnica e Documentazione Farmaceutica. Masi utilizzerà le metodiche microanalitiche per lo studio del metabolismo degli amminoacidi nel cervello per sviluppare i primi programmi di controllo di qualità in chimica clinica agli inizi degli anni '70. Pocchiari e Masi saranno tra i soci fondatori della Società Italiana di Chimica Clinica ed il loro lavoro porterà alla nascita del Reparto di Metodi e Strumentazione in Biochimica Clinica nel Laboratorio di Tecnologie Biomediche nel 1977 ed alla creazione del Laboratorio di Biochimica Clinica nel 1982. Nel 1966 entrarono a far parte del gruppo di Pocchiari Vittorio Silano e Giuliano D'Agnolo. Silano, dopo una breve esperienza sugli effetti di sostanze tossiche sul metabolismo intermedio [10], si dedicò, indirizzato da Pocchiari, alla caratterizzazione delle proteine del frumento ed in particolare all'identificazione di alcuni peptidi tossici, forse responsabili del morbo celiaco. Tale esperienza risultò utile per affrontare dapprima il tema delle cosiddette bioproteine [11] e poi quello più generale della tossicologia con la realizzazione nel 1982 di un laboratorio (Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia) dedicato agli aspetti biologici della tossicologia.

D'Agnolo continuò il filone degli studi metabolici con la messa a punto di un nuovo metodo per lo studio degli intermedi della glicolisi [12], che consentì di ottenere nuove evidenze dell'esistenza di due compartimenti del glucosio-6-fosfato. Il complesso dei risultati ottenuti a sostegno di tale ipotesi è discusso criticamente nel lavoro presentato nel 1976 da D'Agnolo e Pocchiari in occasione del 70° compleanno del Professor Chain [1].

L'evoluzione di questi studi porterà nel 1982 alla nascita del Laboratorio di Biologia Cellulare dedicato allo studio della cellula e dei componenti subcellulari nei loro aspetti morfologici, strutturali, biochimici e funzionali quali modelli elementari di analisi dei meccanismi patogenetici di malattia. Ed è proprio nel Laboratorio di Biologia Cellulare che nel 1984 verrà dimostrata sperimentalmente l'esistenza di due compartimenti del glucosio-6-fosfato [13], esistenza ipotizzata da Chain e Pocchiari nel 1952.

#### BIBLIOGRAFIA

1. POCCHIARI, F. & D'AGNOLO, G. 1977. Pathways of glucose absorption and metabolism. In: *Biologically active substances: exploration and exploitation*. D.A. Hems (Ed.). Wiley, London, pp. 171-187.
2. PRICE, W.M., CORI, C.F. & COLOWICK, S.P. 1945. The effect of anterior pituitary extract and of insulin on the hexokinase reaction. *J. Biol. Chem.* 184: 633-634.
3. STADIE, W.C., HAUGAARD, N. & HILLS, A.G. 1950. The effect of insulin and adrenal cortical extracts of muscle from depancreatized rats. *J. Biol. Chem.* 184: 617-626.

4. LEVINE, R., GOLDSTEIN, M.S., HUDDLESTUM, B. & KLEIN, S.P. 1950. Action of insulin on the "permeability" of cells to free hexose, as studied by its effect on the distribution of galactose. *Am. J. Physiol.* 163: 70-76.
5. BELOFF-CHAIN, A., CHAIN, E.B., BOVET, D., POCCHIARI, F., CATANZARO, R. & LONGINOTTI, L. 1952. Metabolism of hexose-phosphate esters. *Biochem. J.* 54: 529-539.
6. CHAIN, E.B., FRANK, M., POCCHIARI, F., ROSSI, C., UGOLINI, F. & UGOLINI, G. 1956. Quantitative bidimensional radiochromatography. *Sel. Sci. Pap. Ist. Super. Sanità* 1: 241-280.
7. BELOFF-CHAIN, A., CATANZARO, R., CHAIN, E.B., MASI, I. POCCHIARI, F. & ROSSI, C. 1955. The influence of insulin on carbohydrate metabolism in the isolated diaphragm muscle of normal and alloxan diabetic rats. *Proc. Roy. Soc. Series B* 143: 481-503.
8. BELOFF-CHAIN, A., CATANZARO, R., CHAIN, E.B., MASI, I. & POCCHIARI, F. 1956. Carbohydrate metabolism in rat liver. *Sel. Sci. Pap. Ist. Super. Sanità* 1: 293-303.
9. POCCHIARI, F. 1967. Initial stages in the conversion of glucose into glycogen. In: *Control of glycogen metabolism*. W.J. Whelan (Ed.). FEBS Proceedings IV Meeting Oslo.
10. SILANO, V. & POCCHIARI, F. 1968. Effect of atractylaside on glucose and pyruvate metabolism in rat diaphragm muscle. *Biochem. J.* 107: 305-309.
11. ALBERANI, V., D'AGNOLO, G., DONELLI, G., MACRI, A. & SILANO, V. 1979. Il contributo dell'Istituto Superiore di Sanità alla soluzione dei problemi igienico-sanitari connessi alla produzione ed utilizzazione in alimentazione animale dei lieviti coltivati su n-alcani (bioproteine). *Ann. Ist. Super. Sanità* 15: 347-414.
12. BEDETTI, G., D'AGNOLO, G. & POCCHIARI, F. 1970. Anion-exchange chromatography of glycolysis intermediates. *J. Chromatogr.* 49: 53-56.
13. PODO, F., CARPINELLI, G. & D'AGNOLO, G. 1984. A <sup>31</sup>P NMR study on uptake and metabolism of hexose monophosphates in rat diaphragm muscle. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 1: 39-48.