



SULL' ATTIVITÀ GLICOLITICA IN AEROBIOSI,
IN VITRO, DI PREPARAZIONI DI FEGATO
DI MAIALE (*)

(Con due figure)

FRANCO RECCHIA E MARCELLO GHIRON

SUMMARIVM. — Quadam adhibita suilli iecoris praeparatione (P. E.), in qua iam cellulae epaticae agnoscì nequeunt (est enim liquor, qui, si centrifugetur, ostendit tantum minimas formas fere rotundas, quae anilinae coloribus tingui possunt), Auctores et *in vivo* et *in vitro* demonstrarunt glycolithicam huius praeparationis (P. E.) vim. Putant autem Auctores, quamquam nondum audent de natura earum formarum quidquam certius asserere, in ea praeparatione inesse enzima cellulae epaticae propria (quae glycidos oxydare possunt), dummodo optimis condicionibus se habeat (eius enim vis evanescit decursu temporis, vel si oxygenium adsit, eademque calore cessat).

Numerosi sono i lavori riguardanti la funzione esplicata dal fegato sul ricambio dei carboidrati. Da essi risulta come il fegato ha un ruolo di primo piano nella trasformazione del glucosio e degli altri zuccheri [1]. Recenti studi tendono a dimostrare che il fegato, per la proprietà omeostatica ad esso attribuita, ha anche la funzione di regolare il tasso glicemico, e che la curva tipica di carico da glucosio, più che ad un plus di secrezione insulinica pancreatica, pare legata alla funzione glicolitica del fegato [2]. In proposito, vari AA. hanno anche studiato su fegato isolato, o su omogenati, dettagli della sua funzione. LEPAGE e

(*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio S. E. Dante De Blasi il 31 maggio 1951.

Stosz [3] hanno osservato la produzione di acido lattico ed esterificazione di fosforo mediante pappe di fegato in mezzo glucosato. Mason ed ISAEFF [4] hanno dimostrato che fette di fegato normale hanno, in opportune condizioni, la capacità di metabolizzare il glucosio.

In questo lavoro⁽¹⁾ abbiamo voluto studiare, se è possibile ottenere dal fegato di maiale (abbiamo scelto per le esperienze il fegato di maiale, perchè esso ci ha dimostrato a parità di concentrazione il massimo di attività) una preparazione che dimostrasse attività glicolitica in vitro ed in presenza di ossigeno, e quali fossero i caratteri propri di una preparazione di fegato che si dimostrasse capace di determinare glicolisi. Abbiamo scelto come substrato il sangue di coniglio normale, al quale al momento delle esperienze, per aumentare il tasso glicemico in vitro, abbiamo aggiunto a volte glucosio, a volte levulosio, a volte lattosio, a volte maltosio.

Abbiamo usato la seguente metodica.

Preparazione epatica (P. E.): 50 g. di fegato di maiale (ucciso nella stessa giornata) si trituranò e si lavano con acetone anidro. Si decanta e si asciuga alla pompa, si dà ottenere una polvere, che si riprende con 300 cc. di una soluzione acquosa di fosfato monopotassico 0,5 M e fosfato bisodico 0,5 M a pH 7,80. Successivamente si procede alla purificazione con carbone animale, carbonato di magnesio e caolino, e si filtra con carta Whatman n. 4. La preparazione così ottenuta si è rivelata attiva solo per 30 ore, dopo di che l'attività scompare completamente.

Preparazione del sangue substrato: Il sangue, prelevato con puntura intracardiaca, da conigli del peso di circa Kg. 2, alimentati con crusea e verdura da più giorni, veniva diluito in acqua bidistillata al fine di impedirne la coagulazione (gli anticoagulanti, come il citrato di sodio, non furono usati per evitare possibili interferenze con la reazione che si voleva studiare), e veniva usato come controllo, oppure ad esso veniva aggiunta in quantità diverse a seconda degli esperimenti, una soluzione all'1% o di glucosio, o di levulosio, o di lattosio, o di maltosio.

(¹) Il presente lavoro è stato eseguito nella Clinica delle Malattie Infettive dell'Università di Roma, diretta dal Prof. G. CARONIA.

Le varie lavorazioni furono sempre eseguite sterilmente si da poter escludere inquinamenti microbici che potessero falsare i risultati.

Per la determinazione degli zuccheri, abbiamo usato il metodo di BAUDOIN e LEWIN [5].

PARTE SPERIMENTALE

In ogni beuta veniva posto sangue diluito corrispondente ad 1 cc. di sangue prelevato dal coniglio. Ad esso si aggiungeva la preparazione epatica (P. E.) ed uno degli zuccheri sopra elencati, in proporzioni diverse. Venivano preparati, inoltre, controlli contenenti: 1°) sangue; 2°) sangue e preparazione epatica; 3°) sangue e zuccheri. Le beute così preparate venivano poste in termostato a 37° per un periodo di tempo variabile tra i 15 e i 180 minuti. I dosaggi degli zuccheri venivano eseguiti dopo 15-20-30-60-120-150-180 minuti.

RISULTATI DEGLI ESPERIMENTI

I. Dopo 20' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	1,06
2. » + 1 cc. P. E.	» » »	0,75
3. » + 10 mg. glucosio	» » »	5,72
4. » + 10 mg. glucosio + 1 cc. P. E.	» » »	4,75

II. Dopo 60' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	1,44
2. » + 1 cc. P. E.	» » »	0,84
3. » + 10 mg. glucosio	» » »	6,98
4. » + 10 mg. glucosio + 1 cc. P. E.	» » »	5,90

III. Dopo 60° a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	1,20
2. » + 0,5 cc. P. E.	» » »	0,90
3. » + 10 mg. glucosio	» » »	8,55
4. » + 10 mg. glucosio + 0,5 cc. P. E.	» » »	7,59

IV. A) Dopo 120' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	1,08
2. » + 10 mg. glucosio	» » »	8,43
3. » + 10 mg. glucosio + 0,5 cc. P. E.	» » »	6,14

*11 Acta, vol. XIV.

B) Dopo 120' a 37°:

1. sangue + 20 mg. glucosio	g. glucosio ‰	10,12
2. » + 20 mg. glucosio + 0,5 cc. P. E.	» » »	8,48

V. A) Dopo 30' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	0,92
2. » + 0,1 cc. P. E.	» » »	0,60
3. » + 10 mg. glucosio	» » »	7,55
4. » + 10 mg. glucosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	7,43

B) Dopo 60' a 37°:

5. sangue + 10 mg. glucosio	g. glucosio ‰	7,55
6. » + 10 mg. glucosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	7,07

C) Dopo 120' a 37°:

7. sangue + 10 mg. glucosio	g. glucosio ‰	7,55
8. » + 10 mg. glucosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	5,90

VI. Dopo 120' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	1,56
2. » + 0,2 cc. P. E.	» » »	1,50
3. » + 10 mg. glucosio	» » »	7,71
4. » + 10 mg. glucosio + 0,2 cc. P. E.	» » »	6,50
5. » + 10 mg. glucosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	6,38

VII. A) Dopo 120' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	0,72
2. » + 0,1 cc. P. E.	» » »	0,48
3. » + 10 mg. glucosio	» » »	7,50
4. » + 10 mg. glucosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	7,31

B) Dopo 150' a 37°:

5. sangue + 10 mg. glucosio	g. glucosio ‰	7,50
6. » + 10 mg. glucosio + 0,1 cc. P. E. + 2 cc. soluz. tampone fosfato pH 7,80	» » »	5,55
7. » + 10 mg. glucosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	5,33
8. » + 10 mg. glucosio + 0,05 cc. P. E.	» » »	6,77

VIII. Dopo 15' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	0,90
2. » + 10 mg. glucosio	» » »	4,25
3. » + 10 mg. glucosio + 0,05 cc. P. E.	» » »	3,50

IX. Dopo 15' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	0,90
2. » + 20 mg. glucosio	» » »	6,20
3. » + 20 mg. glucosio + 0,05 cc. P. E.	» » »	4,10

X. A) Dopo 120' a 37°:

1. sangue controllo	g. zuccheri ‰	1,20
2. » + 10 mg. levulosio	» » »	7,95
3. » + 10 mg. levulosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	6,86

B) Dopo 180' a 37°:

4. sangue + 10 mg. levulosio	g. zuccheri ‰	7,95
5. » + 10 mg. levulosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	6,87

XI. A) Dopo 120' a 37°:

1. sangue controllo	g. zuccheri ‰	0,75
2. » + 0,1 cc. P. E.	» » »	0,50
3. » + 10 mg. lattosio	» » »	5,09
4. » + 10 mg. lattosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	4,85

B) Dopo 180' a 37°:

5. sangue + 10 mg. lattosio	g. zuccheri ‰	5,09
6. » + 10 mg. lattosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	4,06

XII. A) Dopo 120' a 37°:

1. sangue controllo	g. zuccheri ‰	0,75
2. » + 0,1 cc. P. E.	» » »	0,50
3. » + 10 mg. maltosio	» » »	4,49
4. » + 10 mg. maltosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	4,25

B) Dopo 180' a 37°:

5. sangue + 10 mg. maltosio	g. zuccheri ‰	4,49
6. » + 10 mg. maltosio + 0,1 cc. P. E.	» » »	4,23

Controllo con preparazione epatica inattivata col calore.

Dopo 120' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	0,90
2. » + 0,5 cc. P. E.	» » »	0,90
3. » + 10 mg. glucosio	» » »	7,55
4. » + 10 mg. glucosio + 0,5 cc. P. E.	» » »	7,50

Controllo con preparazione epatica vecchia di 3 giorni.

Dopo 120' a 37°:

1. sangue controllo	g. glucosio ‰	0,75
2. » + 0,5 cc. P. E.	» » »	0,75
3. » + 10 mg. glucosio	» » »	7,73
4. » + 10 mg. glucosio + 0,5 cc. P. E.	» » »	7,70

Incoraggiati dai risultati ottenuti dalle prove in vitro, abbiamo voluto vedere successivamente se la preparazione epatica (P. E.) in esame, iniettata per via venosa nel coniglio, fosse in grado di determinare in vivo lo stesso abbassamento della glicemia come avevamo constatato in vitro. In due conigli del peso di Kg. 2, tenuti a digiuno da 24 ore, dopo di aver determinato, tenendoli sempre a digiuno, il tasso glicemico, abbiamo iniettato quantità diverse di P. E. (4-2 cc.) ed abbiamo seguito la curva glicemica per due ore.

Coniglio A	ore 9	glicemia 0,95 ‰
	» 9,10	iniezione endovenosa 4 cc. P. E.
	dopo 50'	glicemia 0,62 ‰
	» 75'	» 0,45 »
	» 120'	» 0,80 »
Coniglio B	ore 9	glicemia 0,75 ‰
	» 9,10	iniezione endovenosa 2 cc. P. E.
	dopo 30'	glicemia 0,68 ‰
	» 45'	» 0,58 »
	» 90'	» 0,40 »
	» 130'	» 0,70 »

Nessuno dei due conigli presentò convulsioni nonostante il notevole abbassamento della glicemia.

CONSIDERAZIONI. — Dall'insieme delle nostre ricerche, risulta innanzi tutto dimostrato che è possibile ottenere dal fegato di maiale una preparazione che conserva la capacità ossidante sugli zuccheri propria del tessuto epatico. La preparazione epatica (P. E.) da noi ottenuta presenta inoltre alcune caratteristiche che meritano di essere segnalate, perchè a nostro parere capaci di meglio chiarire la complessa fisiopatologia del fegato. Questa preparazione perfettamente limpida, se centrifugata a 3.000 giri, non dà alcun sedimento; a fresco ed in preparati colorati col bleu di metilene non si osservano al microscopio cellule epatiche, ma solo *formazioni rotondeggianti*, probabilmente di derivazione cellulare, ma sulla cui natura e funzione, pur conoscendo gli attuali studi sull'importante problema della localizzazione degli

enzimi nella cellula epatica [6], non vogliamo almeno per ora avanzare alcuna decisiva affermazione.

Nel dettaglio della disamina dei vari protocolli risulta provato — oltre che è possibile ottenere dal fegato una preparazione, libera da cellule, che abbia un'azione glicolitica sugli zuccheri (senza che sia necessario aggiungere particolari coenzimi o catalizzatori metallici) — anche che questa preparazione epatica esplica *in vitro* una notevole azione glicolitica, maggiore sul glucosio, minore sugli altri glicidi presi in esame.

Studiando le curve di scomposizione del glucosio (vedi fig. 1), si osserva che l'optimum si ha quando la P. E. viene aggiunta nella quantità di 0,5 cc. È interessante però notare come la curva dei valori ottenuti con 0,1 cc. di P. E. sia quasi uguale alla precedente, seppure ritardata nel tempo, mentre quella ottenuta con 1 cc., dopo una rapida ascesa, dimostra un arresto e una lieve diminuzione. Quella con 0,05 cc. decorre molto più bassa delle precedenti.

L'optimum di conservazione e di attività della P. E. è il pH 7,80. L'aggiunta di soluzione tampone a pH 7,80 non facilita la reazione perchè già nella P. E. e nel sangue di coniglio esistono sistemi tampone. Determinazioni potenziometriche eseguite nei diversi tempi degli esperimenti hanno fatto risaltare un lieve abbassamento del pH, come ad esempio da pH 7,80 a pH 7,60. È interessante questo dato perchè dimostra la tendenza all'acidificazione del mezzo per opera della reazione glicolitica, limitata dai vari sistemi tampone presenti.

Come si osserva nella fig. 2, il massimo di attività di scomposizione, a parità di concentrazione della P. E., si esplica sul glucosio, in misura minore sul levulosio e sul lattosio, e in misura ancora più ridotta sul maltosio. Questo dato è in accordo con i concetti oggi esistenti sul ricambio dei carboidrati, secondo i quali fase obbligata della scomposizione delle molecole dei glicidi è la trasformazione in molecole di glucosio [5]. La P. E. dimostra così di conservare la proprietà del tessuto epatico di scindere il glucosio e di trasformare in glucosio e successivamente scindere gli altri carboidrati di origine alimentare.

È possibile ottenere curve ipoglicemiche nei conigli tenuti a digiuno per 24 ore, mediante la somministrazione per via venosa di

2-4 cc. di P. E. Non si sono osservate convulsioni nonostante il basso livello glicemico raggiunto. Si rileva che le curve ipoglicemiche *in vitro* ed *in vivo* dimostrano un accentuato parallelismo.

CONCLUSIONI. - Dalle caratteristiche della P. E. ora esaminate, si può ritenere che essa contenga gli enzimi propri della cellula epatica ad azione ossidante i glicidi.

Gli elementi per i quali si può arrivare alla conclusione della presenza di enzimi nella preparazione epatica, sono:

- a) Possedere un optimum di concentrazione nel mezzo. Infatti raddoppiando la concentrazione non si ha un'attività glicolitica doppia.
- b) Possedere un optimum di pH (7,80) e di temperatura (37°).
- c) Esaurimento dell'attività glicolitica col tempo, in presenza di ossigeno, caratteristico degli enzimi ossidanti dei tessuti.
- d) Distruzione dell'attività glicolitica per opera del calore.

Queste due ultime caratteristiche portano anche ad escludere una ipotetica azione glicolitica aspecifica, termostabile della P. E., dovuta ad esempio a sostanze proteiche.

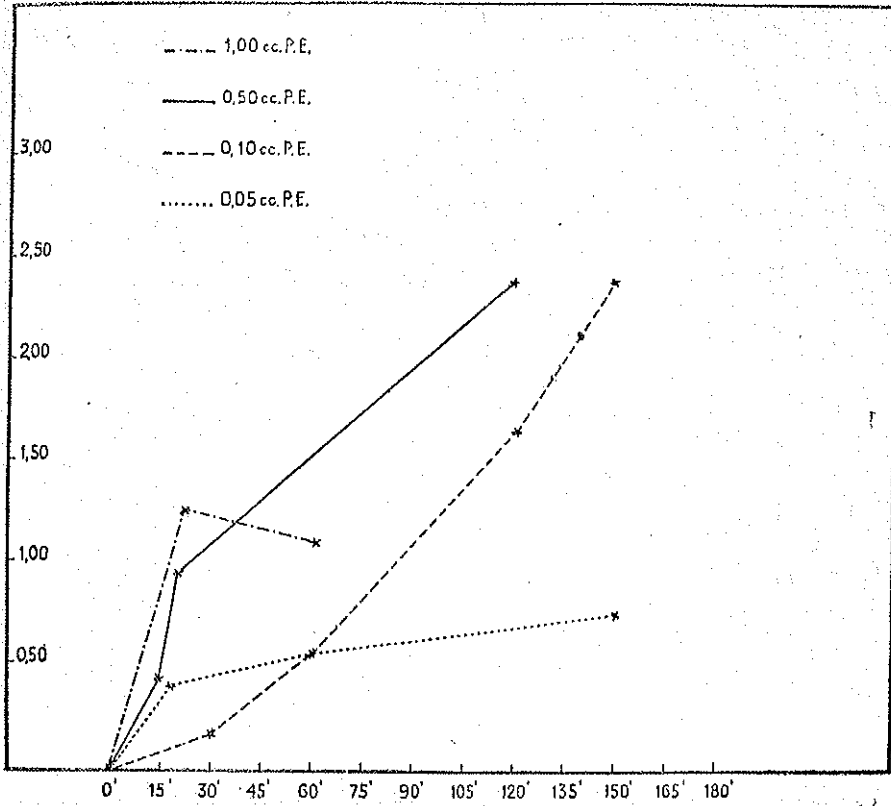


FIGURA N° 1

Ascisse: tempo degli esperimenti in minuti primi.

Ordinate: quantitativo di glucosio scomposto (in mg.) dalla P. E. per cc. di sangue.

Nella figura si osserva la quantità di glucosio per cc. di sangue scisso da quantità variabili di P. E., in rapporto al tempo. La linea tratteggiata e punteggiata indica quanti mg. di glucosio per cc. vengono scissi rispetto al tempo da 1 cc. di P. E. La linea continua indica i mg. di glucosio per cc. di sangue scissi da 0,5 cc. P. E.; la linea tratteggiata i mg. di glucosio scissi da 0,10 cc. di P. E.; la linea punteggiata i mg. di glucosio scissi da 0,05 cc. P. E., sempre rispetto al tempo. La figura dimostra l'esistenza di un optimum di concentrazione della P. E. e la mancanza di un rapporto proporzionale diretto tra quantità di P. E. impiegata e quantità di glucosio scisso.

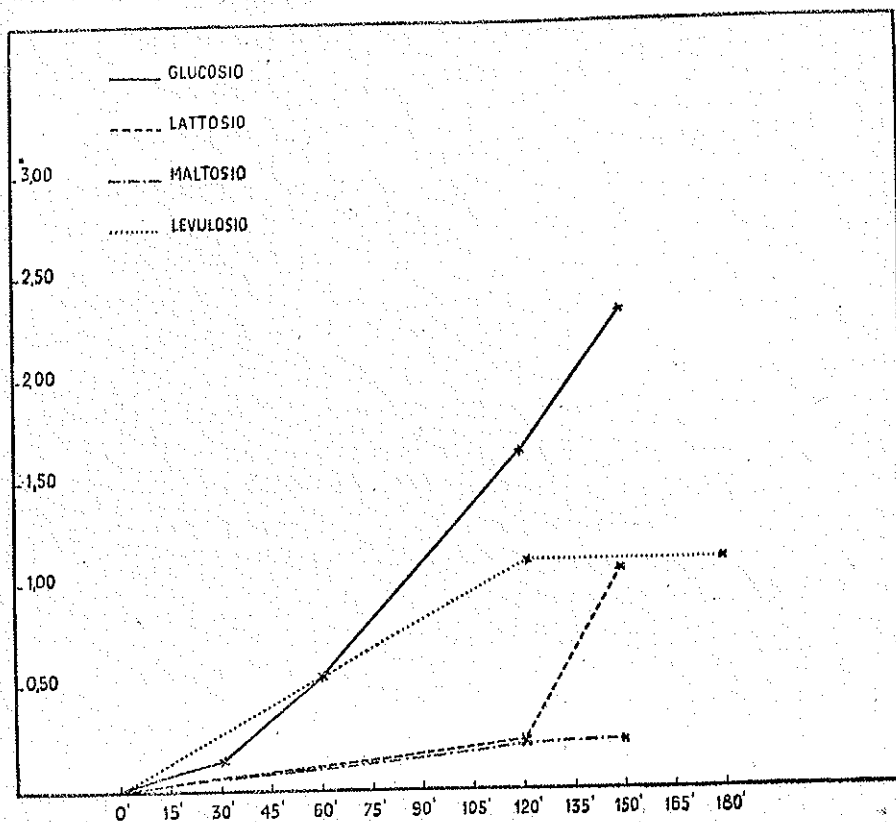


FIGURA N° 2

Ascisse: tempo degli esperimenti in minuti primi.

Ordinate: Quantitativo degli zuccheri scomposti dalla P. E. per cc. di sangue.

Nella figura sono riportati in mg. per cc. di sangue i diversi quantitativi degli zuccheri scissi da una medesima quantità di P. E. (0,10 cc.), rispetto al tempo. La linea continua dimostra i mg. di glucosio scissi rispetto al tempo; quella punteggiata i mg. di levulosio; quella tratteggiata i mg. di lattosio; quella punteggiata e tratteggiata i mg. di maltosio, sempre rispetto al tempo. Si osserva la maggiore scissione operata dalla P. E. sui monosaccaridi rispetto ai disaccaridi.

BIBLIOGRAFIA

[1] BARRON E. S. G., *Meccanismo del metabolismo dei carboidrati*, « Adv. Enzimol », **3**, 149, 1943; KREBS A., *Gli stadi intermedi nella ossidazione biologica dei carboidrati*, « Adv. Enzimol. », **3**, 191, 1943; CORI C. F., *Fosforilizzazione del glucosio e del glicogeno*, « Biol. Symp. », **5**, 181, 1941; CORI C. F., *Demolizione del glicogeno e sintesi nei tessuti*, « Endocrinology », **26**, 285, 1940; KOSTERLITZ H. W., *La presenza di galattosio-fosfato in fegati di conigli alimentati con galattosio*, « Bioch. J. », **31**, 2217, 1937.

[2] SOSKIN S. e ALLWEISS M. D., *La fase ipoglicemica della curva di tolleranza al glucosio*, « Am. J. Physiol. », **110**, 4, 1934; SOSKIN S., ALLWEISS M. D., e COHN D. J., *Influenza del pancreas e del fegato sulla curva di tolleranza al glucosio*, « Am. J. Physiol. », **109**, 155, 1934; SOSKIN S., HEXES H. E., HERRICK J. F., e MANN F. C., *Meccanismo di regolazione epatica della glicemia*, « Am. J. Physiol. », **124**, 558, 1938; SOSKIN S. o LEVINE R., *Una relazione tra il livello glicemico e la utilizzazione del glucosio concernente le teorie sul diabete*, « Am. J. Physiol. », **120**, 761, 1937.

[3] LEPAGE G. A., STOESZ P. A., *Glicolisi negli omogenati di fegato*, « J. Biol. Chem. », **130**, 587, 1949.

[4] MAROSE E. I., ISAEFF E., CHERNICK e CHAIKOFF I. L., *Lipogenesi ed ossidazione del glucosio nel fegato di ratti con diabete allossanico*, « J. Biol. Chem. », **186**, 527, 1950.

[5] DENIGES, CHELLE e LABAT, *Precis de Chimie analytique*, t. II, 622, 1931, « Bull. Soc. Ch. Biol. », Sept-Oct-Nov., 1928.

[6] SCHNEIDER W. C. e VAN R. POTTER, *Distribuzione intracellulare degli enzimi*, « J. Biol. Chem. », **177**, 893, 1949.