

potrebbe dedursi dal fatto che esso, nell'organismo diabetico, viene normalmente ossidato fino ad H₂O e CO₂. Per poter pensare che il fruttosio faccia aumentare nel diabetico la sintesi di A.T.P. bisogna naturalmente ammettere che in queste condizioni sperimentali permanga una certa efficienza dei sistemi che presiedono alla fosforilazione ossidativa, ciò che, d'altra parte, risulterebbe dalle ricerche di PARKS *et al.*¹⁰.

C. R. ROSSI, F. ROSSI e
C. S. ROSSI

Istituto di Chimica Biologica e Istituto di Patologia Generale, Università di Padova, Italia, il 1° giugno 1956.

Summary

Insulin deficiency induced by alloxan treatment reduces cocarboxylase activity in the liver of rat. Such enzymatic activity, however, is brought back to the normal speed by fructose injection. It is suggested that fructose, the turn-over of which in diabetic animals is normal, may be capable of furthering the synthesis of A.T.P. and enhancing phosphorylation of thiamine into cocarboxylase.

¹⁰ R. E. PARKS, J. ADLER *et al.*, J. biol. Chem. **214**, 693 (1955).

Diabete da allossana*

Secondo numerosi autori (vedi recente monografi di STADIE¹) l'insulina interviene nella regolazione del metabolismo lipidico aumentando i processi di sintesi di acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio e diminuendo i processi di ossidazione. Quindi nel fegato dell'organismo diabetico vi ha da un lato una diminuzione della sintesi di acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio e, d'altro lato, un aumento dell'ossidazione degli acidi grassi. L'aumento dell'ossidazione implica naturalmente una maggior disponibilità di acil-Coenzima A in quanto il processo ossidativo può esplicarsi soltanto previa formazione di acidi grassi attivi, vale a dire di

acidi grassi esterificati col gruppo sulfidrilico del Coenzima A (LYNEN e OCHOA²). D'altra parte un aumento della formazione degli acil-Coenzima A implica un aumento dell'attività degli "enzimi attivanti", vale a dire di quegli enzimi che, in presenza di A.T.P., esterificano il gruppo sulfidrilico del Coenzima A col carbossile dell'acido grasso. Il fatto che nel fegato dell'organismo diabetico da pancreasectomia sia diminuita la disponibilità di Coenzima A (PONTREMOLI e IVALDI³) non è necessariamente in contrasto con un eventuale aumento nella formazione degli acil-Coenzima A in quanto il Coenzima A, una volta terminato il ciclo ossidativo, viene liberato rendendosi nuovamente disponibile. D'altra parte secondo le ricerche di FONNESU⁴ nel diabete allossanico non vi ha alcuna variazione del contenuto di Coenzima A nel fegato. In contrasto con un eventuale aumento della formazione degli acil-Coenzima A non ci sembra nemmeno la diminuita disponibilità di A.T.P. del fegato diabetico (KAPLAN e GREENBAUM⁵) in quanto occorre una sola mola di A.T.P. per formare una mola di acil-Coenzima A e durante il ciclo ossidativo di questo si ricaricano cinque mole di A.T.P. per ogni mola di acetil-Coenzima A che si forma. Non si può pertanto escludere che un contenuto anche modesto di A.T.P. sia pur sempre sufficiente per sostenere l'eventuale aumentata richiesta per un intensificato metabolismo lipidico.

Con le ricerche riferite nella presente nota si è determinato se l'aumentata ossidazione dei lipidi che, secondo esperimenti ormai numerosi, si verifica nel fegato dell'animale diabetico, fosse accompagnata da un aumento della formazione degli acil-Coenzima A. Le ricerche di IVALDI e PONTREMOLI⁶ sembrerebbero escludere tale eventualità, però ci sembra che i dati riferiti da questi autori, considerati alla luce delle ricerche di LIPMANN e TUTTLE⁷ esprimano non tanto l'attività degli enzimi attivanti quanto quella delle esterasi.

Metodi. Sono stati adoperati ratti albin, di sesso maschile, del peso medio di 200 g. Il diabete è stato

² F. LYNEN e S. OCHOA, Biochem. biophys. Acta **12**, 299 (1953).
³ G. IVALDI e S. PONTREMOLI, Boll. Soc. Ital. Biol. sper. **31**, 499 (1953).
⁴ A. FONNESU, Comunicazione personale.
⁵ N. O. KAPLAN *et al.*, Science **102**, 447 (1945).
⁶ S. PONTREMOLI, G. IVALDI e C. DULIO, Boll. Soc. Ital. Biol. sper. **31**, 501 (1955).
⁷ F. LIPMANN e L. C. TUTTLE, Biochem. biophys. Acta **4**, 301 (1950).

* Nota N° 2: Sulla formazione degli Acil-Coenzima A nel fegato.
¹ W. C. STADIE, Physiol. Rev. **34**, 52 (1954).

Trattamento	N. animali	Substrato	mg N ₂ in 100 mg di enzima secco	μM di acido idrossammico	
				% mg di enzima secco	% mg di azoto
Normali . .	6	acido Butirrico	3,09 ± 0,56	4,29 ± 0,82	140,36 ± 24,63
Diabetici . .	7	acido Butirrico	4,64 ± 0,57	4,35 ± 1,54	93,65 ± 31,43
			t = 4,87 - P < 0,01	t = 0,27 - 0,8 > P > 0,7	t = 0,18 - 0,9 > P > 0,8
Normali . .	5	acido Caprilico	2,93 ± 0,31	8,98 ± 2,68	314,70 ± 91
Diabetici . .	4	acido Caprilico	4,19 ± 0,18	9,20 ± 4,30	220,40 ± 110
			t = 5,72 - P < 0,01	t = 0,09 - P > 0,9	t = 1,40 - 0,9 > P > 0,8

Formazione degli acil-Coenzima A nel fegato di ratti normali e diabetici. I valori (medi) sono espressi in μM di acido idrossammico formato p. 100 mg di enzima secco e p. 100 mg di N₂. - La glicemia degli animali diabetici variava entro i limiti 2,38-7,72 g¹⁰⁰. - I valori statistici di t e P sono stati calcolati mediante il metodo di FISHER⁸.

⁸ R. A. FISHER, Metodi statistici ad uso dei ricercatori (U.T.E.T., Torino 1948).

ottenuto mediante una iniezione endoperitoneale di Allossana alla dose di 150-200 mg/kg di peso corporeo. L'enzima è stato preparato estraendolo e purificandolo da polveri acetoniche allestite dal fegato subito dopo l'uccisione dell'animale. Su tale metodo si riferirà in altra nota. L'attività enzimatica è stata saggiata incubando, per lo spazio di tempo di 40 min ed alla temperatura di 38°, il preparato enzimatico su descritto in presenza di substrato specifico (acido grasso), di A.T.P., di Coenzima A, e di idrossilamina. Come substrati si sono impiegati gli acidi butirrico e caprilico. In queste condizioni gli acil-Coenzima A, mano a mano che, per azione degli enzimi attivanti, vengono formati, reagiscono con l'idrossilamina per formare i corrispondenti acidi idrossammici che sono stati determinati per via colorimetrica impiegando il metodo di LIPMANN e TUTTLE⁷. Numerose prove preliminari ci hanno assicurato che con la tecnica su descritta la formazione di acidi idrossammici è strettamente legata alla presenza di A.T.P. e che non vi ha alcuna formazione di acidi idrossammici per azione delle esterasi (LIPMANN e TUTTLE⁷). Inoltre l'intensità di formazione di tali acidi, direttamente proporzionale alla quantità di enzima impiegato, è in funzione lineare del tempo.

I risultati ottenuti e le entità statistiche ad essi riferentisi sono stati riportati nella tabella.

Risultati e discussione. L'intensità di azione degli enzimi che, in presenza di A.T.P., catalizzano la formazione degli acil-Coenzima A è stata rapportata sia al peso secco del preparato enzimatico (μM di acido idrossammico formato per 100 mg di peso secco) sia al contenuto di N_2 (μM di acido idrossammico per 100 mg di N_2). Nel primo caso i risultati ottenuti hanno dimostrato che nella ghiandola epatica di ratti trattati con allossana non vi ha alcuna variazione nell'intensità di formazione degli acil-Coenzima A. Una diminuzione invece, sia pur statisticamente non significativa, si riscontra qualora i valori dell'attività enzimatica vengano riferiti al contenuto di azoto. Questo comportamento è dovuto al fatto che nel fegato di ratti allossanati vi ha un aumento del contenuto di azoto determinato, con ogni probabilità, da una alterazione del metabolismo proteico.

Comunque sia i risultati delle presenti ricerche si prestano, a nostro avviso, a convalidare la seguente conclusione: ammesso che nel fegato degli animali diabetici vi sia un aumento dei processi ossidativi degli acidi grassi, ed ammesso che tali processi debbano essere preceduti dalla esterificazione di detti acidi con il gruppo sulfidrilico del Coenzima A, si deve concludere che la ghiandola epatica ottiene una maggior disponibilità di acil-Coenzima A, da convogliare verso la via ossidativa, non tanto aumentando la formazione di detti esteri, ma ricorrendo ad una quota di acil-Coenzima A che si rende disponibile a causa della diminuzione di altri processi che pur implicano l'utilizzazione degli acil-Coenzima A.

C. R. ROSSI, C. S. ROSSI e
F. ROSSI

Istituto di Chimica Biologica e Istituto di Patologia Generale, Università di Padova (Italia), il 18 giugno 1956.

Summary

Liver tissue of rats made diabetic by alloxan treatment show no variation in the production rate of acyl-CoA. The authors suggest that, in animals poisoned with alloxan, increased fatty acid oxidation occurs because there is an availability of acyl-CoA spared in other metabolic processes whose rate is diminished.

Über den Einfluss von Desoxycorticosteron auf Kontraktur und Kaliumfreisetzung durch Acetylcholin an der innervierten und denervierten Skelettmuskulatur

Desoxycorticosteron (DC) ist imstande, eine Reihe der Wirkungen des Acetylcholins (ACh) auf die glatte¹ bzw. quergestreifte Muskulatur² abzuschwächen bzw. in sehr hohen Konzentrationen völlig aufzuheben. Diese Befunde sowie die von EICHHOLTZ *et al.*³ mitgeteilte Beobachtung einer lokalanästhetischen und kapillarabdichtenden Wirkung des DC weisen auf eine *d*-Tubocurarin-ähnliche gegenüber ACh kompetitiv antagonistische Wirkung des DC hin, die auch verschiedenen anderen Steroidhormonen eigen zu sein scheint². Um Anhaltspunkte bezüglich der Art des Wirkungsmechanismus zu erlangen, wurden in den vorliegenden Untersuchungen die Wirkungen von Desoxycorticosteronglukosid (DCG) auf die Kaliumleerausschüttung sowie Freisetzung von Kaliumionen durch intraarterielle ACh-Injektionen aus der innervierten und denervierten Säugetiermuskulatur unter gleichzeitiger Registrierung der mechanischen Spannungsänderungen der Muskeln studiert. An dieser Versuchsanordnung bewirken depolarisierend wirkende neuromuskulär lähmende Stoffe einen starken Anstieg der Kaliumfreisetzung, während *d*-Tubocurarin und ähnlich wirkende Stoffe die Kaliumionenkonzentrationen unverändert lassen und überdies die Kaliumausschüttung nach depolarisierenden Stoffen abzuschwächen bzw. aufzuheben vermögen⁴.

Die Versuche wurden an isoliert durchströmten, innervierten und chronisch denervierten, hinteren Extremitäten von Katzen in der bereits beschriebenen Weise⁵ durchgeführt. Die Registrierung der Spannungsänderungen der Mm. gastrocnemii erfolgte isometrisch mittels eines Philips-Dehnungsmeßstreifens und Aufzeichnung der Widerstandsänderungen desselben über die Messbrücke eines Sanborn Strain Gage Amplifiers an einem Sanborn Twin Viso Direktschreiber (genaue Angabe der Methodik siehe⁶). Die Bestimmungen der Kalium-Einfluss- und -Ausflusskonzentrationen wurden flammenphotometrisch mit dem Beckman-Flammenphotometer durchgeführt. ACh wurde als Bromid in den zur Aorta führenden Schlauch injiziert; DCG (Ciba) wurde der Durchströmungsflüssigkeit in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4} M/l$ zugesetzt. Die Versuche wurden bei Durchströmung mit normaler Ringer-Blutverdünnung (5:1) zur Testung der ACh-Empfindlichkeit begonnen und erst im weiteren Verlauf auf die DCG-Durchströmung umgeschaltet. Die Berechnung der nach den einzelnen ACh-Dosen zusätzlich in Freiheit gesetzten Kaliummengen erfolgte nach der in früheren Arbeiten angegebenen Weise⁵. Insgesamt wurden 5 Durchströmungsversuche durchgeführt.

¹ F. GROSS und R. STRAUSS, *Helv. physiol. Acta* 5, 137 (1947).

² H. HAEFELI, *Die Wirkung von Steroidhormonen auf die durch verschiedene Pharmaka ausgelösten Kontraktionen des Kaltblütermuskels*, Dissertation, Basel 1954.

³ F. EICHHOLTZ, A. STAAB und R. TAUGNER, *Arch. int. Pharmacodyn.* 86, 407 (1951). - F. EICHHOLTZ, *Klin. Wschr.* 28, 423 (1950).

⁴ H. KLUPP, O. KRAUPP, N. HONETZ, W. KOBINGER und M. LUDON, *Arch. int. Pharmacodyn.* 98, 340 (1954).

⁵ O. KRAUPP, G. WERNER, W. KOBINGER und H. STORMANN, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 226, 301 (1955). - O. KRAUPP, H. STORMANN, B. PILLAT und P. H. CLODI, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 1956 (im Druck).

⁶ O. KRAUPP, H. STORMANN, B. PILLAT und P. H. CLODI, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 1956 (im Druck).