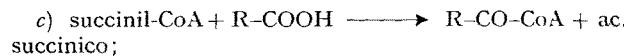


$\mu M$   $O_2$  consumate per l'ossidazione dell'acido caprilico nello spazio di tempo di 20 min da 100 mg di estratto enzimatico secco. Caprilato  $0,7 \times 10^{-3} M$ .  $\alpha$ -chetoglutarato  $1 \times 10^{-3} M$ .  $Mg^{++}$   $1 \times 10^{-2} M$ . G.T.P.  $10 \mu M$ .  $AsO_4^{4-}$   $40 \mu M$ . Tampone-Na-K pH 7,4 cm<sup>3</sup> 2,4. Preparato enzimatico secondo LEHNINGER  $0,2 \text{ cm}^3$

Attivatori	A $O_2$ totale consumato dal sistema enzimatico	B $O_2$ impiegato per la formazione di acido acetacetico
$\alpha$ -chetoglutarato . . . . .	12,20	8,50
$\alpha$ -chetoglutarato + $AsO_4^{4-}$ . . . . .	0,00	0,00
G.T.P. . . . .	9,80	7,10
G.T.P. + $AsO_4^{4-}$ . . . . .	8,30	6,00



2) oppure l'energia per la sintesi degli acil-CoA potrebbe essere fornita al sistema enzimatico dal G.T.P. in maniera diretta, e dall' $\alpha$ -chetoglutarico indirettamente tramite il G.T.P.: infatti dall'ossidazione dell' $\alpha$ -chetoglutarato si forma succinil-CoA [reazione b)] e l'energia del legame tioestero di questo può essere trasferita in quello anidridico del G.T.P. [reazione a) decorrente da destra a sinistra].

Il fatto che l'arsenato blocchi l'azione attivatrice dell' $\alpha$ -chetoglutarato<sup>2</sup> può accordarsi con tutte due le ipotesi su riferite: infatti in presenza di arsenato il succinil-CoA che deriva dall'ossidazione dell' $\alpha$ -chetoglutarato subisce un processo di scissione arsenolitica e quindi non può essere utilizzato né per il trasferimento diretto del CoA all'acido grasso [ipotesi 1)] né per la sintesi del G.T.P. [ipotesi 2)]. Ora, con le ricerche qui riferite l'azione dell'arsenato è stata determinata impiegando, quale attivatore del sistema enzimatico, non più  $\alpha$ -chetoglutarico, come si era fatto nelle ricerche precedenti, ma G.T.P.: è evidente che in questo caso l'arsenato, provocando la scissione arsenolitica del succinil-CoA eventualmente formatosi secondo la reazione a), avrebbe inibito il potere attivatore del G.T.P. soltanto se questo si fosse svolto tramite il succinil-CoA.

**Metodi.** L'intensità di azione del sistema enzimatico ossidasico degli acidi grassi è stato determinato mediante il metodo precedentemente descritto<sup>1-3</sup>, con il quale si misura sia la quantità di  $O_2$  consumata globalmente dal sistema per ossidare l'acido caprilico (Tabella, colonna A) sia la quantità di  $O_2$  impiegata per la formazione dell'acido acetacetico (Tabella, colonna B). L'arsenato è stato aggiunto in quantità di  $40 \mu M$ , concentrazione che nelle precedenti ricerche è risultata sufficiente a bloccare completamente l'azione attivatrice dell' $\alpha$ -chetoglutarato.

**Risultati e discussione.** I risultati ottenuti dimostrano che l'arsenato nel mentre inibisce completamente l'azione attivatrice esplicata dall' $\alpha$ -chetoglutarato sul sistema enzimatico ossidasico dei grassi, invece non modifica in maniera statisticamente significativa l'azione attivatrice del G.T.P. Ora, poiché in presenza di arsenato avviene la scissione arsenolitica del succinil-CoA eventualmente formatosi utilizzando l'energia del legame anidridico del G.T.P., si deve concludere che il potere attivatore di questo non si esplica tramite il succinil-CoA, ma piuttosto che il G.T.P. attiva i sistemi enzimatici fornendo direttamente energia per la sintesi degli acil-CoA.

C. R. ROSSI e M. SACCHETTO

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova (Italia), 20 ottobre 1958.

### Résumé

Dans le foie de cobaye l'arseniate ne modifie pas l'activation provoquée par le G.T.P. sur le système enzymatique des acides gras. De ces résultats on peut conclure que le G.T.P. donne directement l'énergie pour la synthèse des acyl-CoA.

### Il succinato ed il fumarato quali regolatori dei sistemi enzimatici ossidasici dei grassi. Nota V

EMMELOT e Bos<sup>1</sup> riferiscono numerosi dati sperimentali in appoggio all'ipotesi che nei tessuti animali l'intensità di ossidazione degli acidi grassi sia regolata da un lato dalla concentrazione dell'A.T.P., utilizzato per la sintesi degli acil-CoA, d'altro lato dalla concentrazione dell'A.D.P., utilizzato per i processi di fosforilazione legati all'ossidazione dell'acido grasso stesso. Ora nei sistemi enzimatici ossidasici dei grassi le concentrazioni dell'A.T.P. e dell'A.D.P. possono essere regolate da alcune reazioni concomitanti allo svolgersi del processo ossidativo a carico dell'acido grasso: diminuzione di A.D.P. e corrispettiva sintesi di A.T.P. tramite la fosforilazione ossidativa di un acido del ciclo di Krebs o per azione del sistema fosfocreatina-transfосорилази, diminuzione di A.T.P. e corrispettiva formazione di A.D.P. per azione dell'esocinasi, dell'atipiasi o di altre fosfatasi aspecifiche. Secondo EMMELOT e Bos tali sistemi esercitano la massima attività sull'ossidazione dell'acido grasso quando le reazioni su descritte si svolgono con intensità tale da mantenere continuamente nel sistema enzimatico una opportuna concentrazione di A.T.P. e di A.D.P. Con le ricerche qui riferite si è tentato di convalidare o meno tale ipotesi determinando il comportamento dell'intensità di azione dei sistemi enzimatici ossidasici dei grassi in rapporto al variare della concentrazione dell'A.T.P. e dell'A.D.P. Questo è stato ottenuto variando nel sistema la concentrazione del succinato o del fumarato: tali metaboliti vengono ossidati contemporaneamente all'acido grasso e con intensità variabile in rapporto alla loro concentrazione, quindi varia in maniera corrispondente anche la quantità di A.T.P. sintetizzata e quella di A.D.P. tolta al sistema enzimatico.

**Metodi.** Il sistema enzimatico ossidasico dei grassi è stato preparato dal fegato di cavia con il metodo di LEHNINGER<sup>2</sup>. Come attivatore si è impiegato A.T.P. ( $10 \mu M$ ). Si sono aggiunte inoltre quantità variabili (da 1 a  $100 \mu M$ ) di succinato o fumarato. Mediante la tecnica manometrica di Warburg, e seguendo le modalità prece-

<sup>1</sup> P. EMMELOT e C. J. Bos, Enzymologia 17, 13 (1954); Biochim. biophys. Acta 62, 620 (1955); 18, 281 (1955); 19, 565 (1956).

<sup>2</sup> A. L. LEHNINGER, J. biol. Chem. 161, 437 (1945).

$O_2/A.T.P. = \mu M O_2$  consumate per l'ossidazione dell'acido caprilico/ $\mu M$  A.T.P. sintetizzato durante l'ossidazione del succinato o fumarato. Caprilato  $0,7 \times 10^{-3} M$ ,  $Mg^{++} 1 \times 10^{-2} M$ , tampone Na-K-fosfato pH 7,4, 2,4 cm<sup>3</sup>, preparato enzimatico secondo LEHNINGER 0,2 cm<sup>3</sup>

$\mu M$ succinato agglutinato	$\mu M$ A.T.P. sintetizzato % mg enzima secco	$O_2/A.T.P.$	$\mu M$ fumarato agglutinato	$\mu M$ A.T.P. sintetizzato % mg enzima secco	$O_2/A.T.P.$
$\mu M$ 1	55	0,22	$\mu M$ 1	20	0,20
$\mu M$ 4	70	0,21	$\mu M$ 4	35	0,18
$\mu M$ 10	110	0,19	$\mu M$ 10	57	0,19
$\mu M$ 100	152	0,09	$\mu M$ 100	97	0,04

dentemente descritte<sup>3</sup>, si è misurata: a) la quantità di  $O_2$  consumata per l'ossidazione del solo succinato o fumarato, e da questa si è risaliti alla quantità di A.T.P. sintetizzato calcolando un P/O di 2 per il succinato e di 3 per il fumarato.

b) la quantità di  $O_2$  consumata per l'ossidazione dell'acido caprilico. I valori ottenuti, esposti nella Tabella, sono riferiti a 100 mg di enzima secco e sono espresso in  $\mu M$   $O_2$  consumate per l'ossidazione dell'acido caprilico/  $\mu M$  A.T.P. sintetizzato tramite l'ossidazione del succinato o del fumarato ( $O_2/A.T.P.$ ).

**Risultati e discussione.** Le ricerche compiute impiegando il succinato dimostrano che il rapporto  $O_2/A.T.P.$  ( $\mu M$   $O_2$  impiegate per ossidare l'acido caprilico/ $\mu M$  A.T.P. sintetizzate tramite l'ossidazione del succinato) diminuisce quando la quantità di A.T.P. sintetizzata supera il valore di 110  $\mu M$ /100 mg di enzima secco. Per rendere ragione di tale comportamento si potrebbero prospettare queste ipotesi: a) alla concentrazione di 110  $\mu M$  di A.T.P. è completamente saturata la capacità ossidativa del sistema; b) la fosforilazione legata all'ossidazione del succinato è limitata dalla disponibilità di A.D.P. e pertanto si svolge solo fino a che la quantità di A.T.P. sintetizzata raggiunge il valore di 110  $\mu M$ : in tal caso, dato che a questo livello di A.T.P. l'ossidazione del succinato sarebbe dissociata dalla fosforilazione, risulta errata per eccesso la quantità di A.T.P. calcolata in base al rapporto P/O = 2: di qui la diminuzione del rapporto  $O_2/A.T.P.$ . Riteniamo che tutte due queste ipotesi non possano essere sostenute perché a valori di A.T.P. superiori a 110  $\mu M$  l'ossidazione dell'acido grasso è diminuita anche in senso assoluto: infatti per 110  $\mu M$  di A.T.P. sintetizzato il consumo di  $O_2$  per l'ossidazione del caprilato è di 20  $\mu M$ ; e per 150  $\mu M$  di A.T.P. il consumo di  $O_2$  è di sole 14  $\mu M$ . Bisognerebbe allora ammettere che l'elevata ossidazione del succinato inibisce l'ossidazione del caprilato interferendo con fenomeni di competizione per l'A.D.P. o per i trasportatori di idrogeno.

Nei riguardi del fumarato viene innanzitutto confermato quanto è stato riferito in altra nota<sup>3</sup>, vale a dire il rapporto  $O_2/A.T.P.$  non varia fino a quando la quantità di A.T.P. sintetizzata raggiunge il valore di 50  $\mu M$ . Le ricerche qui riferite precisano che per valori di A.T.P. superiori a 50  $\mu M$  il rapporto  $O_2/A.T.P.$  diminuisce, mentre per il succinato si erano raggiunti valori di 110  $\mu M$  di A.T.P. Per rendere ragione di tale diversità di comportamento tra il fumarato ed il succinato, si potrebbe prospettare che nel caso del fumarato possano verificarsi fenomeni di competizione fra due sistemi enzimatici ossidasici – quelli interessati nell'ossidazione del fumarato e quelli nell'ossidazione del caprilato – per il D.P.N. Ciò non avviene per il succinato perché l'ossidazione di questo fino alla tappa che porta alla formazione di fumarato non richiede l'intervento del D.P.N.

M. SACCHETTO e C. R. ROSSI

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova (Italia), 20 ottobre 1958.

<sup>3</sup> M. SACCHETTO e C. R. ROSSI, Exper. 14, 253 (1958).

### Résumé

Dans le foie de cobaye, l'activité du système enzymatique oxydase des acides gras est renforcée par une faible oxydation des acides succiniques et fumariques, tandis qu'elle est inhibée par une oxydation élevée. Il s'agit, peut-être, d'une concurrence pour l'ADP ou bien pour les transporteurs d'hydrogène.

### Neue substituierte Indolderivate mit sympathicolytischer und blutdruckaktiver Wirkung

Zu einigen der gebräuchlichsten Hypotonica und Sympathicolytica gehören die Alkaloide der Rauwolfia, der Yohimbe-Rinde und des Mutterkorns. Die aus diesen Drogen isolierten Reinalkaloide haben ihr gemeinsames Merkmal darin, dass sie chemisch zu den Indol-Alkaloiden gehören. Wir haben es deshalb unternommen, einige einfache Indolderivate, die an den C-Atomen 2 und 3 durch verschiedene Reste substituiert sein können, und die am N-Atom durch den Imidazolinylmethylrest alkyliert sind, herzustellen und auf ihre sympathicolytische und blutdruckbeeinflussende Wirkung hin pharmakologisch zu prüfen. In der Tabelle I ist eine Auswahl der dargestellten Verbindungen aufgeführt.

Die sympathicolytische Wirkung dieser Stoffe wurde gegenüber Adrenalin und Arterenol sowohl an der isolierten Rattensamenblase als auch an den peripheren Gefäßen der isolierten Kaninchenhinterextremität vergleichend mit Ergotamintartrat und anderen wirksamen Sympathicolytica getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass die Indolderivate im Vergleich mit den Indolinderivaten fast ausnahmslos eine bessere sympathicolytische Wirkung entfalten.

Wie aus den Tabellen II und III ersichtlich ist, weist die Substanz XI, das 1-Imidazolinylmethyl-2- $\beta$ -naphthyl-indol, sowohl gegenüber Adrenalin als auch gegenüber Arterenol die stärkste antagonistische Wirkung auf.

Die nicht substituierten Indol- resp. Indolinderivate zeigen im Vergleich mit den substituierten Derivaten eine ausgesprochen schwache Sympathicolyse. Ebenfalls von Interesse ist die Tatsache, dass die relativ guten sympathicolytischen Eigenschaften durch Substitution am C<sub>3</sub> abgeschwächt werden. Der Stoff XXIII, das 1-Imidazolinylmethyl-2-phenyl-3-methyl-indol zeigt neben relativ schwacher sympathicolytischer Wirkung an den isolierten Samenblasen einen tonussteigernden Effekt, den wir in der Tabelle mit Eigenwirkung bezeichnet haben. Eine Auswahl der dargestellten Stoffe wurde in bezug auf ihre blutdruckbeeinflussende Wirkung an der mit Numal narkotisierten Katze untersucht. Einige Vertreter, in erster Linie aus der Gruppe der Indolin-Derivate, zeigen starke hypotensive Wirkung. Der Stoff XX, 1-Imidazolinylmethyl-2-p-tolyl-5-chlorindolin weist bei guten