

## LE FOSFATASI NEL METABOLISMO GLICIDICO (\*)

(Con una figura)

V. BACCARI e G. AURICCHIO

SUMMARY. — Auctores ostendunt qua ratione inter se vim habeat operatio glycidica, in operationem phosphatasicam, et in phosphatorum incrementum ac deminutionem in animalibus quae diabeta immunia sunt vel quae hoc morbo laborant.

Oggi si pensa che ai processi di fosforilazione presiedano enzimi diversi dalle fosfatasi. L'introduzione del radicale fosforico nei composti organici, durante il metabolismo glicidico, avviene infatti o per scissione del glicogeno ad opera della fosforolasi, o per trasporto dall'ATP ad opera dell'esocinasi, o per processi ossidativi con formazione di acilfosfati.

Molti autori per il passato e anche recentemente alcuni particolarmente competenti (Roche e coll. [1]; Folley e coll. [2]) hanno ammesso che le fosfatasi possano avere importanza per i processi di fosforilazione che si verificano nell'assorbimento intestinale del glicoso e dei lipidi, nella captazione del glicoso e sintesi di caseina da parte della ghiandola mammaria secernente, oltre che nella sintesi dei nucleoprotidi. Le fosfatasi, infatti, hanno, in accordo con la legge della re-

(\*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio S. E. Gaetano Quagliariello nella Tornata Ordinaria dell'8 febbraio 1948.

Dal Centro di Enzimologia del C. N. R. presso l'Istituto di Chimica biologica dell'Università di Napoli.

versibilità delle azioni enzimatiche, anche il potere di sintetizzare esteri fosforici, ma il punto d'equilibrio delle reazioni da esse catalizzate è talmente spostato a favore della scissione che la loro importanza nelle sintesi biologiche pare da considerare trascurabile. L'importanza delle fosfatasi resterebbe pertanto limitata ai processi di idrolisi degli esteri fosforici nella osteogenesi, nella digestione di alcune sostanze alimentari, nella liberazione di fosfati a livello del rene e, per quel che riguarda la demolizione dei glicidi, alla scissione del glicosio-fosfato, che nel fegato deve essere defosforilato a glicosio, e come tale essere immesso in circolo.

Tuttavia non mancano dati sperimentali, che mettono in evidenza una relazione tra attività fosfatasica ed assorbimento o metabolismo dei glicidi. La teoria di LUNDSGAARD [3], secondo il quale il diabete da florizina sarebbe dovuto a un disturbo del riassorbimento di glicosio nei tubuli renali per inibizione delle fosfatasi, ha ricevuto recenti conferme. Con tecnica istologica, GOMORI [4] ha mostrato che la fosfatasi è presente nei tubuli prossimali, dove avviene il riassorbimento di glicosio dal filtrato glomerulare, e KABAT e coll. [5] hanno precisato che essa è concentrata in quella parte delle cellule tubulari che forma il lume, dal quale il glicosio è assorbito. SAVIANO e BACCARI [6] inoltre hanno dimostrato una chiara inibizione dell'attività fosfatasica del rene di animali resi diabetici con iniezione di florizina. Ricerche istologiche sulla occorrenza di fosfatasi e deposizione di glicogeno in vari tessuti (endometrio e ghiandole di utero gravido, placenta) hanno dimostrato che l'enzima si trova in genere o nella zona di accumulo del poliosside o nelle vicinanze, e spesso nella regione che il glicosio, trasportato dalla corrente sanguigna, deve attraversare prima di sintetizzarsi a glicogeno (DEMPSEY e WISLOCKI [7]).

Per quanto riguarda i rapporti dell'attività fosfatasica con il metabolismo intermedio dei glicidi, esistono fino ad oggi soltanto poche, frammentarie e non concordi osservazioni. BODANSKY [8] trova un aumento della fosfatasi del siero in seguito a somministrazione orale di glicosio e FREEMAN e FARMER [9] osservano che una dieta ricca in carboidrati eleva durevolmente l'attività fosfatasica del siero, mentre il digiuno e una dieta proteica l'abbassano e una dieta lipidica è senza effetto. Iperfosfatasemia è stata inoltre osservata negli animali spancreatici (SCHELLING [10]; FREEMAN e JYV [11]) e in animali diabetici per

allossana (CANTON e coll. [12]). Questi dati non sono però d'accordo con quelli precedenti di BINET e coll. [13]. Per quanto riguarda i rapporti tra metabolismo glicidico e fosfati del siero, è noto che questi diminuiscono nell'animale normale e non nel diabetico per carico glicidico (BARNESCHEN e coll. [14]; BOLLIGER [15]) e nell'animale normale e diabetico in seguito a somministrazione di insulina (BRIGGS e coll. [16]; KAY e coll. [17]; BLATHERWICK e coll. [18]; WIGGLESWORTH e coll. [19]; HARROP e coll. [20]). Tale diminuzione deve essere messa in rapporto con la utilizzazione dei fosfati, dato che per somministrazione di glicoso e di insulina si hanno ipofosfaturia (BOLLIGER, *loc. cit.*, 15), e contemporaneo aumento di composti organici fosforati, come per esempio di ATP nel fegato (KAPLAN e coll. [21]).

Data la non chiara funzione della fosfatasi nel metabolismo glicidico, ci è parso interessante innanzi tutto studiare il comportamento di quest'enzima e dei fosfati del siero in seguito a carico di glicoso, sia in animali normali sia diabetici per allossana. Da tali esperienze è risultato che, mentre l'attività fosfatasica aumenta sia negli animali normali sia in quelli diabetici, i fosfati diminuiscono nei primi ed aumentano nei secondi. L'aumento dell'attività fosfatasica e dei fosfati negli animali diabetici va d'accordo con l'azione idrolitica dell'enzima, mentre l'aumento della prima e la diminuzione dei fosfati negli animali normali si può spiegare ammettendo che in questi ultimi l'utilizzazione del glicoso comporti l'esterificazione non solo dei fosfati liberati dalle fosfatasi ma anche di quelli preesistenti. Poichè, secondo BODANSKY e coll. [22], la fosfatasi del siero deriva per lo meno in parte da quella del fegato, abbiamo voluto indagare se in seguito a carico di glicoso si avesse un aumento dell'attività fosfatasica in quest'organo. Abbiamo così potuto fare l'interessante constatazione che anche l'attività fosfatasica del fegato subisce un notevole aumento.

Il meccanismo col quale il glicoso provoca un aumento dell'attività fosfatasica resta però oscuro. L'aggiunta di glicoso *in vitro* al siero o ad estratti di organi, la somministrazione d'insulina o l'aggiunta di quest'ormone a poltiglia o ad estratti di organo, sono privi di effetti degni di nota.

## ESPERIENZE

## 1. AZIONE DEL GLICOSO « IN VIVO ».

a) *Esperienze sul sangue.* — Come animali da esperimento sono stati usati conigli del peso di 2 kg. circa, digiuni da 24 h, ai quali è stato praticato per via endovenosa (vena marginale dell'orecchio) un carico di glicoso, iniettando una soluzione ipertonica (al 40 %) nella quantità di 5 cc. circa.

Prima del carico e a diversi tempi dopo di questo, si eseguivano prelievi di sangue dalla vena marginale dell'orecchio, con siringa o nel vuoto (MADERNA [25]), in quantità il più possibile piccole per evitare effetti secondari da salasso. La determinazione del glicoso veniva eseguita su 0,1 cc. di sangue col metodo di HAGEDORN e JENSEN, quella dei fosfati col metodo di BRIGGS ridotto a micrometodo (0,2 di siero) ed eseguendo la lettura al fotometro graduale di Pulfrich (filtro S 72), con microcuvette da 5 cm. di spessore. La determinazione dell'attività fosfatasica (glicerofosfatasi) è stata eseguita cimentando 0,1 cc. di siero con  $\beta$ -glicerofosfato di sodio purissimo (0,005 M) per 24 h in puffer di glicocollo-soda (pH 9,31).

I conigli venivano quindi resi diabetici con allossana. Agli animali digiuni da 24 h s'iniettavano per via endovenosa mg 200 per kg. di peso di allossana in soluzione al 5 % di recente preparata. Un'alimentazione ricca di glicidi (crusca impastata con saccarosio o glicoso) ha permesso agli animali di superare, nella maggioranza dei casi, la crisi ipoglicemica caratteristica del secondo stadio d'azione dell'allossana. Dopo 1 o 2 giorni appariva la classica sindrome diabetica (glicosuria, iperglicemia, poliuria ecc.). Gli animali venivano quindi sottoposti di nuovo al carico glicidico e alle determinazioni suaccennate, con le stesse modalità usate prima di provocare la sindrome morbosa. I dati sono riportati nella tabella I e nel grafico I, e da essi risulta che il carico glicidico provoca aumento dell'attività fosfatasica negli animali normali e nei diabetici, diminuzione di fosfati nei primi e aumento nei secondi.

b) *Esperienze sul fegato.* — Per lo studio dell'attività fosfatasica del fegato sono stati adoperati ratti bianchi di 200 gr. circa di

peso, ad una metà dei quali (l'altra metà è servita di controllo) si è praticato il carico glicidico. Questo veniva eseguito iniettando la soluzione ipertonica di glicosio (40 %), in quantità di 1 cc. circa, in una vena della coda. Il fegato veniva prelevato dagli animali decapitati, dopo 60' dal carico glicidico. Su una piccola aliquota di tale organo

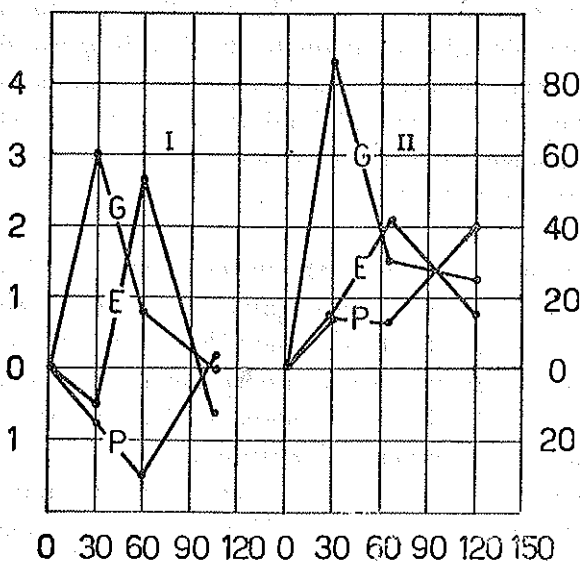


FIG. 1.

Sull'ascissa è segnato il tempo in minuti primi. Sull'ordinata a sinistra sono indicate le variazioni in g% di glicosio e in mg% di fosforo, sull'ordinata a destra le variazioni percentuali dell'attività fosfatasi. I: animale normale; II: animale diabetico; G: glicosio; E: attività fosfatasi; P: fosforo.

si determinava il residuo secco, tenendola prima in stufa a 70°C e poi in essiccatore su cloruro di calcio fino a peso costante. Il resto dell'organo veniva triturato con sabbia di quarzo, estratto con 6 volumi di H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente per 24 h, e centrifugato. Il liquido sovrastante al precipitato veniva cimentato contro glicerofosfato (0,005 M a pH 9,31). Dopo circa 5 h, si procedeva alla determinazione del fosforo col metodo di Briggs. Prove con fegato di animali non iniettati con soluzione di glicosio venivano sempre eseguite contemporaneamente e con le stesse modalità. Per ogni prova

si eseguiva un controllo senza glicerofosfato, il cui valore in fosforo (fosfati preesistenti + quelli derivanti dall'idrolisi di esteri del fegato) veniva sottratto da quello della prova con glicerofostato. I risultati, riassunti nella tabella II, mostrano negli animali sottoposti al carico un'attività fosfatasica costantemente più alta che nei controlli.

2. AZIONE DEL GLICOSO « IN VITRO ». — Si è voluto inoltre sperimentare l'azione del glicoso, aggiunto *in vitro*, in prove di attività fosfatasica di animali normali, allestite come si è detto sopra. Il glicoso è stato aggiunto nelle quantità indicate nella tabella III. Dai dati riportati nella stessa tabella risulta che il glicoso, in queste condizioni, è praticamente privo di effetto.

3. AZIONE DELL'INSULINA. — Queste esperienze sono state eseguite con poltiglia (esp. 1 e 2) e con estratto (esp. 3) di fegato di animale normale, nonché con estratto di fegato di animale diabetico (esp. 4). L'ormone è stato aggiunto nella miscela nelle quantità indicate nella tabella IV. Nell'esp. 2 l'insulina è stata incubata con la poltiglia, a 37° per 2 h, prima dell'aggiunta del substrato.

A ratti del peso di circa 200 gr. è stata somministrata insulina fino a ridurre la glicemia a un valore di circa 0,4‰: gli animali venivano decapitati, e il fegato trattato come sopra per la determinazione dell'attività fosfatasica (esp. 5).

Dalla tabella IV risulta che, nelle diverse condizioni sperimentali in cui ci siamo posti, l'insulina non esercita alcuna attivazione sulla fosfatasi, se mai la inibisce leggermente sia *in vitro* sia *in vivo*.

TABELLA I.

Tempo m'	Glicosio (G) g ‰	Fosfati (P)		Attività fosfatasi (E)	
		mg ‰	variazione ‰	Idrolisi ‰ del glicorofosfato	variazione ‰
<i>Animale normale</i>					
0	0,91	4,67	—	16,1	—
30	3,94	3,91	- 16,2	14,4	- 10,5
60	1,75	3,14	- 32,8	24,9	+ 54
105	0,91	4,84	+ 3,6	12,5	- 22,3
<i>Animale diabetico</i>					
0	2,59	3,94	—	21,2	—
30	6,90	4,77	+ 21	24,7	+ 16,5
65	4,15	4,60	+ 16,7	30,2	+ 42
120	3,88	5,92	+ 50,2	24,6	+ 16

TABELLA II.

Esperienze	Ratto controllo		Ratto + glicoso		Variazioni % dell'attività fosfatasi
	Idrolisi % del glicerofosfato	Resid. secco % di tessuto fresco	Idrolisi % del glicerofosfato	Resid. secco % di tessuto fresco	
1	14,6	30,5	24,9	28,9	+ 70,5
2	16	29,1	28,9	29	+ 80,6
3	17,9	31	23,9	28,4	+ 33,5
4	10,7	30,7	19,9	31,5	+ 86
5	14,3	—	19,5	—	+ 36,4
6	18,9	29,9	20,1	32	+ 6,3
7	11	29,2	28,9	29,4	+ 163
8	13,3	—	25,3	—	+ 90,2
9	6,7	—	15,8	—	+ 163
10	13,9	—	25,2	—	+ 81,3
<i>Media</i>	13,7	30	23,2	29,8	+ 69,3

TABELLA III.

Esperienze	Preparato enzimatico	+ glucosio ‰	Idrolisi ‰ del glicerofosfato
1	Estratto di rene . . . . .	0	39,8
2	» » . . . . .	0,2	39,8
3	» » . . . . .	0,4	40,9
4	Estratto di fegato . . . . .	0	10,4
5	» » . . . . .	0,2	10,1
6	» » . . . . .	0,4	11,1
7	Siero . . . . .	0	53
8	» . . . . .	0,2	53
9	» . . . . .	0,4	56

TABELLA IV.

Esperienze	Preparato enzimatico	+ Insulina (U. C.) <i>in vitro</i>	Idrolisi ‰ del glicerofosfato	Variazione ‰
1	Poltiglia (animale normale)	0	28	—
	» » »	0,4	26,4	- 5,7
	» » »	0,04	27,5	- 1,7
2	» » »	0	27,4	—
	» » »	0,4	24,4	-10,9
	» » »	0,04	25,6	- 6,5
3	Estratto » »	0	18,3	—
	» » »	0,4	16,9	- 7,6
	» » »	0,04	17,6	- 3,8
4	Estratto (animale diabetico)	0	53,6	—
	» » »	0,4	57,9	+ 8
	» » »	0,04	49,7	- 7,2
5	Estratto (animale normale)	0	23,4	—
	» (animale trattato con insulina)	0	21,9	- 6,3



## DISCUSSIONE

Dai dati riferiti si nota che per somministrazione di glicoso si ha un notevole aumento dell'attività fosfatasica non solo del siero, ma anche del fegato. Quando le nostre esperienze erano già terminate abbiamo potuto leggere un lavoro di MARSH e coll. [26] i quali, studiando il riassorbimento di glicoso nel rene, hanno messo in evidenza, in seguito a somministrazione orale di questo zucchero, un cospicuo aumento dell'attività fosfatasica del rene. Questo reperto, mentre conferma le nostre osservazioni, dà al fenomeno dell'aumento delle fosfatasi per carico glicidico un significato più generale, in quanto dimostra che si verifica anche in altri organi.

Sul meccanismo di tale fenomeno non conosciamo nulla; possiamo soltanto dire che l'aumento dell'attività fosfatasica non è in relazione con l'utilizzazione dei glicidi, in quanto si verifica anche nell'animale diabetico. Dalle nostre esperienze risulta inoltre che il glicoso aggiunto *in vitro*, nelle nostre condizioni sperimentali, è praticamente senza effetto. L'insulina, *in vivo* e *in vitro*, certamente non produce attivazione, se mai una costante per quanto debole inibizione. L'aumento dell'attività fosfatasica può dipendere o da un aumento della fosfatasi o più verosimilmente da una sua attivazione, riferibile in via di ipotesi ad ormoni — diversi dell'insulina — secreti sotto lo stimolo del carico glicidico, o a metaboliti del glicoso. Per quanto riguarda i primi ricordiamo l'azione sull'attività fosfatasica esercitata dagli ormoni tiroideo (SCOZ e coll. [27]), paratiroideo (ROCHE e coll. [28]), estrogeni (FOLLEY [29]), dal progesterone (RUFFO [30]), dal testosterone (CUTILLO [31]).

Viene ora fatto di chiedersi quale sia la funzione della fosfatasi nel metabolismo glicidico. Come si è detto nell'introduzione, quest'enzima ha soprattutto importanza nella scissione degli esteri e questa sua azione si manifesta chiaramente nell'animale diabetico, nel quale accanto all'aumentata attività dell'enzima si riscontra un aumento dei fosfati.

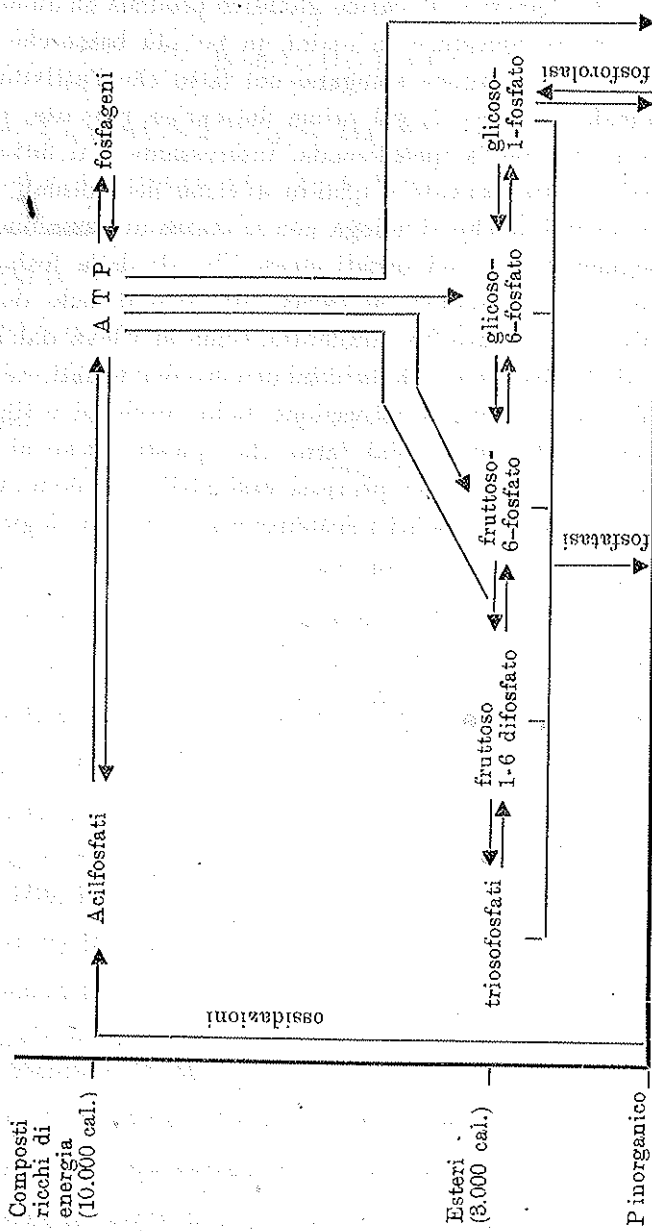
Il fatto che negli animali normali, accanto all'aumento dell'attività fosfatasica, si riscontra una diminuzione dei fosfati, sta ad indicare una utilizzazione di questi nei processi fosforilanti, che si verificano du-

rante l'utilizzazione del glicoso e che in questo caso prevalgono su quelli idrolitici. La fosfatasi avrebbe quindi la funzione di liberare fosfati inorganici e metterli a disposizione dei processi fosforilanti.

MARSH e coll. (*loc. cit.*, 26) osservano una diminuzione dei processi di fosforilazione *in vitro*, quando usano organi di animali ai quali è stato praticato carico di glicoso. Gli autori attribuiscono tale fatto all'aumentata attività fosfatasica, e difatti trovano che l'aggiunta di quantità crescenti di fosfatasi inibisce progressivamente la fosforilazione *in vitro*. Questa discordanza con i nostri risultati è però solo apparente, in quanto *in vitro* i processi di fosforilazione sono, per la labilità degli enzimi catalizzanti le reazioni accoppiate fornitrici di energia libera, meno intensi, e quindi facilmente controbilanciati dall'attività fosfatasica, devoluta ad enzimi più resistenti.

I nostri dati e anche quelli di MARSH mettono in evidenza rapporti tra i processi fosforilanti e defosforilanti, che possono essere precisati nella seguente maniera. La fosforilazione utilizza fosfati inorganici attraverso la formazione di legami ricchi di energia ed accumulo di ATP, dal quale il radicale fosforico passa ad altre sostanze organiche formando esteri notevolmente meno ricchi di energia, e questi infine vengono idrolizzati dalle fosfatasi, che pertanto hanno una parte indispensabile nel ciclo dei fosfati, riassunto nel seguente schema.

Per quel che riguarda l'assorbimento intestinale e il riassorbimento nei tubuli renali del glicoso, LIPMANN [32] pensa che i processi di fosforilazione si verifichino per passaggio del radicale fosforico da composti con legame anidridico ad alto contenuto energetico (circa 10.000 cal), ad altri con legame di estere a basso contenuto (3.000 cal), mentre la differenza di energia verrebbe utilizzata in modo non precisabile. Comunque sia, si forma l'estere, e questo deve essere defosforilato dalle fosfatasi perchè il glicoso sia immesso come tale nel circolo sanguigno. Con l'uso degli isotopi è stato inoltre dimostrato che la penetrazione di glicoso nel muscolo avviene sotto forma di glucoso-6-fosfato: a contatto della membrana cellulare, l'estere si scinde, il componente glicidico penetra nella cellula e il fosfato resta nel liquido interstiziale (da HERLITZKA [33]). Esisterebbe quindi anche nei fenomeni di assorbimento del glicoso un equilibrio tra fosforilazione e defosforila-



zione: alla prima partecipano enzimi ossidanti, fosfoferasi e fosforolasi, alla seconda le fosfatasi.

Nell'animale diabetico, il carico glicidico produce un aumento dell'attività fosfatasica. Questo è in realtà un po' più basso che nell'animale normale, e ciò potrebbe spiegarsi col fatto che l'attività fosfatasica dell'animale diabetico è, già prima del carico, più alta, probabilmente in rapporto con la iperglicemia. Interessante è il fatto che in questi animali, contrariamente a quanto avviene nei normali, si ha un aumento dei fosfati, il che si spiega con la scarsa utilizzazione dei glicidi e conseguentemente dei fosfati stessi, liberati dalla fosfatasi.

In altre parole, in seguito al carico glicidico, il ciclo dei fosfati negli animali normali sarebbe accelerato, come si rileva dall'aumento dell'attività della fosfatasi e della diminuzione dei fosfati. L'accelerazione avrebbe inizio con un'attivazione delle fosfatasi e liberazione di fosfati, come è dimostrato dal fatto che questi ultimi si accumulano, se esiste un ostacolo nei processi ossidativi, che fanno parte del ciclo in quanto legano i fosfati a sostanze organiche con legami ricchi di energia.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] ROCHE J. e COURTOIS J., «Expos. Ann. Bioch. Méd.», 1944, 4, 221.
- [2] FOLLEY S. J. e GREENBAUM, «Bioch. Journ.», 1947, 41, 261.
- [3] LUNDGAARD E., «Bioch. Zeit.», 1933, 264, 209 e 211.
- [4] GOMORI G., «Proc. Soc. exp. Biol. and Med.», 1939, 42, 23.
- [5] KABAT E. A. e FURTH J. da «Lipmann Advances in Enzymology», 1941, 1, 99.
- [6] SAVIANO M. e BACCARI V., «Boll. Soc. It. Biol. Sperim.», 1946, 22, 560.
- [7] DEMPSEY E. W. e G. B. WISLOCK, «Physiol. Rev.», 1946, 26, 1.
- [8] BODANSKY A., «J. Biol. Chem.», 1934, 104, 473.
- [9] FREEMAN S., FARMER C. J., «Am. J. Physiol.», 1935, 113, 209.
- [10] SCHELLING V., «Arch. Path.», 1935, 20, 162.
- [11] FREEMAN S. e IVY A. C., «Am. Journ. Physiol.», 1937, 118, 541.
- [12] CANTOR M. M., TUBA J., CAPSEY P. A., «Science», 1947, 105, 476.
- [13] BINET L. e PAUTRAT J., «C. R. S. B.», 1934, 116, 709.
- [14] BARRENSCHEEN H. K., DOLESCHALL F., POPPER L., «Bioch. Zeit.», 1926, 177, 50.
- [15] BOLLIGER A., HARTMAN F. W., «J. Biol. Chem.», 1925, 64, 91.
- [16] BRIGGS A. P., KOENIG I., DOISY E. A., WEBER C. I., «J. biol. Chem.», 1923-1924, 58, 721.
- [17] KAY H. P., ROBISON R., «Bioch. J.», 1924, 18, 1139.
- [18] BLATHERWICK N. R., BELL M., HILL E., «J. Biol. Chem.», 1924, 61, 241.
- [19] WIGGLESWORTH V. B., WOODROW C. E., SMITH W., WINTER L. B., «J. Physiol.», 1922-1923, 57, 447.
- [20] HARROP G. A., BENEDICT E. M., «J. Biol. Chem.», 1924, 59, 683.
- [21] KAPLAN N. O. e GREENBERG D. M., «J. Biol. Chem.», 1944, 156, 525.
- [22] BODANSKY A., JAFFÉ H. L., «Proc. Soc. exp. Biol. and Med.», 1933, 31, 107.
- [23] BODANSKY A., «Enzymol.», 1937, 3, 258.

- [24] BODANSKY A., «Proc. Soc. exp. Biol. and Med.», 1939, **42**, 800.
- [25] MADERNA N., «Boll. Soc. It. Biol. Sperim.», 1941, **16**, 449.
- [26] MARSH J. B. e D. L. DRABKIN, «J. Biol. Chem.», 1947, **168**, 61.
- [27] SCOZ G. e MARANGONI P. L., «Boll. Soc. It. Biol. Sperim.», 1934, **9**, 969.
- [28] ROCHE J. e FILIPPI A., «Bull. Soc. Chim. Biol.», 1938, **20**, 1147.
- [29] FOLLEY S. J., «Bioch. Journ.», 1936, **30**, 2262.
- [30] RUFFO A., «Boll. Soc. It. Biol. Sperim.», 1940, **15**, 54.
- [31] CUTILLO F., «Ibidem», 1944, **19**, 175.
- [32] LIPMANN F., «Advances in Enzymologic», 1941, **1**, 99.
- [33] HERLITZKA A., «Boll. Soc. It. Biol. Sperim.», 1947, **23**, 153.