

STUDI SUGLI ENZIMI RESPIRATORI (*)

(OSSIDASI - DEIDROGENASI)

MARIO GHIRON

SUMMARIVM. — Hae Nota Auctor exponit experimenta et investigationes super quodam enzimate dehydrogenanti (quod diu durare potest) peractas, quod enzima ipse e variis internis organis seiunxit, quodque simili modo operatur atque insulina, glycaemiam in hominibus et animalibus multum minuens.

Nel corso delle nostre ricerche sugli enzimi lipolitici contenuti nel fegato ⁽¹⁾ avevamo notato la presenza in quest'organo di un enzima dotato di forte potere ossidante ad azione diversa da quello estratto da HARRISON.

Quest'ultimo, infatti, ha estratto dal fegato ⁽²⁾ un enzima capace di ossidare il glucosio in acido d-gluconico e, quindi, dotato di potere ossidativo limitato ad una iniziale scomposizione.

L'enzima da noi ottenuto ha, invece, un forte potere ossidante e produce una scissione che non si arresta ai composti a catena aperta sotto forma di aldeide, come aveva osservato HARRISON, ma determina la trasformazione del glucosio in acqua ed anidride carbonica, il che dimostra che la molecola di glucosio può essere completamente bruciata dall'enzima deidrogenante estratto dal fegato.

(*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio Aldo Castellani il 30 ottobre 1941.

(¹) M. GHIRON, « Rendiconti della R. Accademia Nazionale dei Lincei », Vol. XIV, serie 6^a, 2^o sem., fasc. 1-2, luglio 1931; M. GHIRON, « Journal of tropical Medicine and Hygiene », May 1, 1935.

(²) D. C. HARRISON, « Proceedings of the Royal Society of London », series B, Vol. CXIII, October 1933.

L'acido ossalico, che si trova fra i prodotti di ossidazione chimica dello zucchero, è stato anch'esso usato da noi come substrato per saggiare l'attività dell'enzima deidrogenante ed abbiamo constatato che si ottiene sviluppo di CO_2 , ciò che attesta la scomposizione dell'acido ossalico.

L'enzima fu preparato nel seguente modo: gr. 10 di polvere di fegato, residua dall'estrazione dell'enzima lipolitico, vengono trattati con cc. 200 di acqua distillata alcalinizzata con fosfato sodico e potassico ad un $\text{pH} = 7,8$. Si filtra dopo 20 minuti per carbone e caolino; così viene usato per le esperienze.

Gli esperimenti furono eseguiti usando materiale sterile in tubi di Thunberg opportunamente modificati e accuratamente privati di aria. Usammo per ogni tubo di Thunberg cc. 2,0 di soluzione acquosa di enzima, cc. 1,0 di soluzione di glucosio al 10%, cc. 2,0 di sostanza tampone per mantenere un $\text{pH} = 7,8$ e cc. 0,5 di una soluzione acquosa 1/5000 di bleu di metilene. Nei tubi di Thunberg fu fatto il vuoto e furono posti in termostato a 37°. Si prepararono due controlli, contenenti il primo il glucosio, il bleu di metilene e la sostanza tampone, il secondo contenente enzima, il bleu di metilene e la sostanza tampone.

Dopo 4 ore fu osservata la decolorazione dei tubi, tranne quelli di controllo. Dopo 8 ore venne determinata la quantità di CO_2 prodotta.

Dall'esperimento, come si vedrà nei protocolli, consegue che *l'enzima deidrogenante, ottenuto col nostro processo di estrazione, riesce ad una completa scomposizione del glucosio e dell'acido ossalico con produzione di CO_2 (protocolli 1-2-3).*

La costanza del fenomeno dell'ossidazione totale dello zucchero per mezzo dell'enzima estratto dal fegato ci indusse a provare se l'aggiunta di altre sostanze ne modificava l'azione deidrogenante. Abbiamo esperimentato l'aggiunta di vari ormoni.

Abbiamo osservato così che l'aggiunta di piccole quantità di insulina, per sè inattive sullo zucchero, aumenta la quantità di CO_2 prodotta, ossia di zucchero bruciato (protocollo 4).

Abbiamo preparato in fiale sterili ed atossiche l'enzima in esame e naturalmente l'abbiamo sperimentato nel coniglio prima e poi nell'uomo.

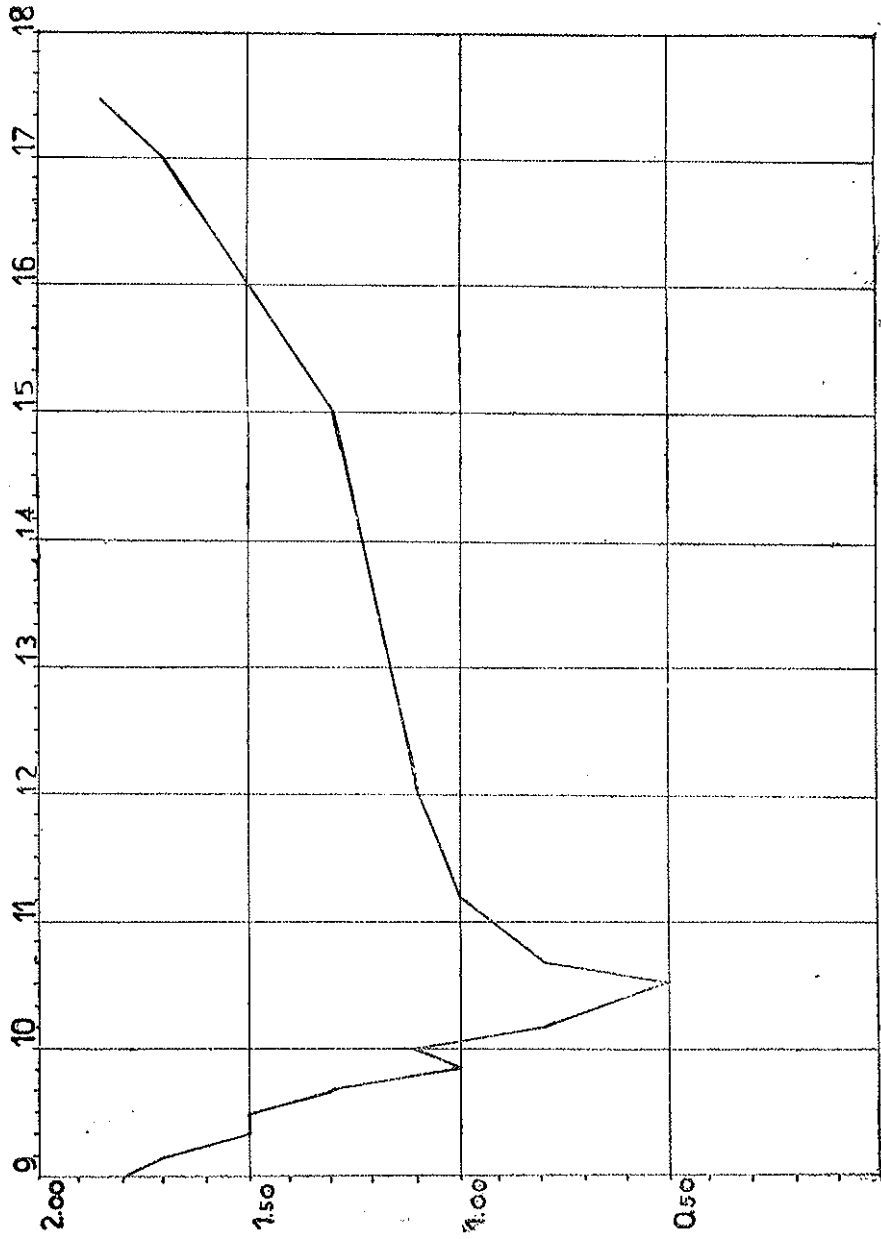


FIG. 1.

Tralasciando i numerosi protocolli riguardanti questi esperimenti *in vivo* ad un più lungo e dettagliato lavoro, riteniamo di poter esporre alcune conclusioni sulla base delle molte decine di osservazioni fatte.

Nel coniglio a digiuno come per la prova dell'insulina, l'iniezione endovenosa di cc. 5 di enzima determina un progressivo abbassamento del tasso glicemico che s'inizia già dopo 10 minuti dall'iniezione e produce una curva di ipoglicemia del tutto paragonabile a quella ottenuta dalle iniezioni di insulina, con una discesa graduale nelle prime ore e una ripresa fino al tasso glicemico di partenza e talora superiore. Non abbiamo mai osservato fenomeni di choc, neppure quando la ipoglicemia era arrivata a 0,40 % (protocollo 5).

Nell'uomo a glicemia normale si ha un costante abbassamento nelle prime ore dall'iniezione, talora con fenomeni subiettivi di malessere correggibili con la somministrazione di zucchero.

Nei diabetici pancreatici gravi giovanili la iniezione endovenosa dell'enzima deidrogenante è seguita da un abbassamento del tasso glicemico, dalla diminuzione dell'acetone e dalla scomparsa dei fenomeni di intossicazione acida. Nei diabetici colpiti da malattie febbrili intercorrenti, l'insulina dimostra scarsa efficacia, mentre l'associazione dell'insulina e dell'enzima porta a un *forte* abbassamento della curva glicemica della durata di sei o sette ore.

Per interpretare queste osservazioni è della massima importanza studiare i rapporti che esistono fra l'enzima e l'insulina, nel senso che la scomposizione dello zucchero viene operata dall'enzima ossidante. In questo processo l'insulina gioca una parte di grande importanza, probabilmente come regolatore della funzione enzimatica.

Dagli esperimenti sopra riferiti risulta che l'enzima è capace di ridurre rapidamente il tasso glicemico sia nell'uomo normale che nell'ammalato. In altre parole l'enzima è capace di bruciare nell'organismo umano lo zucchero circolante.

È vero che l'insulina iniettata abbassa il tasso glicemico, e nelle curve che si possono costruire negli animali e nell'uomo vi è parallelismo fra l'iniezione di insulina e l'iniezione di enzima. Ma *in vitro* l'insulina da sola non produce ossidazione dello zucchero come l'enzima, mentre l'associazione di enzima più insulina nella provetta produce un aumento della ossidazione dello zucchero, superiore a quella ottenuta col solo enzima. L'iniezione nell'uomo di insulina e di enzima

produce una diminuzione del tasso glicemico maggiore di quello ottenuto dall'uno o dall'altro dei due preparati. Il che porta a concludere che l'azione insulinica è in funzione dell'enzima ossido-riducente.

Certo è che si tratta di azioni diverse: l'enzima produce bruciamento dello zucchero, l'insulina verosimilmente è un regolatore di questo fenomeno, della massima importanza per la vita.

Molteplici fattori possono rendere gli enzimi inattivi o insufficienti come ad esempio le malattie infettive e le loro tossine. Sia gli enzimi ossido-riducenti, sia i lipolitici, come anni addietro noi abbiamo potuto ampiamente dimostrare⁽¹⁾, sono inibiti nella loro azione durante il decorso di malattie infettive. Cioè nel decorso di queste l'enzima ossido-riducente viene danneggiato e l'insulina, che agisce in quanto trova l'enzima attivo, rimane anch'essa inefficace; l'introduzione dell'enzima produce allora una ripresa del funzionamento dell'insulina.

Riassumendo: *l'enzima ossido-riducente scompone il glucosio tanto nella provetta quanto nell'organismo, mentre l'insulina regola l'azione enzimatica. Ciò è confermato dal fatto che l'insulina non agisce quando per cause infettive l'enzima è attenuato o distrutto. Le variazioni nei processi ossidativi sono conseguenza dell'azione enzimatica, regolata, aumentata, diminuita dall'azione ormonale.*

L'ormone insulinico non agisce direttamente sulla sostanza da scomporre, ma agisce sull'enzima, per cui se questo viene distrutto rimane nulla l'azione ormonale.

PROTOCOLLO 1.

- 1) cc. 2,0 enzima n. 3 + cc. 1,0 soluzione di glucosio 10 % + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 soluzione bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 ++++ (precipitato molto abbondante)
- 2) cc. 2,0 enzima n. 5 + cc. 1,0 soluzione di glucosio 10 % + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 +++

⁽¹⁾ M. GHIRON, «Zentralblatt für innere Medizin», 1933, n. 16; «Forschung», Bd. 14, Heft 2 (1934).

- 3) cc. 2,0 enzima n. 6 + cc. 1,0 soluzione di glucosio 10 % + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 +++
- 4) controllo 1 = cc. 1,0 soluzione glucosio 10 % + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = nessuna decolorazione
dopo 8 ore = nessun precipitato e nessuna decolorazione
- 5) controllo 2 = cc. 2,0 enzima + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = nessuna decolorazione
dopo 8 ore = nessun precipitato e nessuna decolorazione.

PROTOCOLLO 2.

- 1) cc. 2,0 enzima n. 6 + cc. 1,0 soluzione di glucosio 10 % + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato.
dopo 8 ore = BaCO_3 ++
- 2) cc. 2,0 enzima n. 6 + cc. 1,0 soluzione di maltosio 10 % + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 ++
- 3) cc. 2,0 enzima n. 6 + cc. 1,0 soluzione di lattosio 10 % + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 ++
- 4) cc. 2,0 enzima n. 6 + cc. 1,0 soluzione di saccarosio 10 % + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 di bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 +
- 5) controllo = cc. 2,0 enzima + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = nessuna decolorazione
dopo 8 ore = nessun precipitato e nessuna decolorazione.

PROTOCOLLO 3.

- 1) cc. 2,0 enzima n. 3 + cc. 1,0 soluzione satura di ossalato di ammonio + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene.
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 +++
- 2) cc. 2,0 enzima n. 6 + cc. 1,0 soluzione satura di ossalato di ammonio + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 +++
- 3) controllo = cc. 1,0 soluzione satura di ossalato di ammonio + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorazione
dopo 8 ore = nessun precipitato e nessuna decolorazione

PROTOCOLLO 4.

- 1) cc. 1,0 insulina (10 unità) + cc. 1,0 soluzione di glucosio 10% + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = nessuna decolorazione
dopo 8 ore = nessun precipitato e nessuna decolorazione
- 2) cc. 2,0 enzima n. 8 + cc. 1,0 soluzione di glucosio al 10% + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 +++
- 3) cc. 1,0 insulina (10 unità) + cc. 2,0 enzima n. 8 + cc. 1,0 soluzione di glucosio al 10% + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
dopo 4 ore = decolorato
dopo 8 ore = BaCO_3 +++
- 4) cc. 1,0 enzima n. 8 + cc. 1,0 soluzione di glucosio 10% + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
Dopo 4 ore = decolorato
Dopo 8 ore = BaCO_3 +

- 5) cc. 1,0 insulina (10 unità) + cc. 1.0 enzima n. 8 + cc. 1,0 soluzione di glucosio 10% + cc. 2,0 sostanza tampone + cc. 0,5 bleu di metilene
Dopo 4 ore = decolorato
Dopo 8 ore = BaCO_3 ++

PROTOCOLLO 5.

Coniglio del peso di kg. 2,500 a digiuno

Ore 9,00 glicemia 1,70‰

Iniezione endovenosa di cc. 5,0 di enzima n. 8

Ore	9,10	glicemia	1,60‰
»	9,20	»	1,40‰
»	9,30	»	1,40‰
»	9,40	»	1,20‰
»	9,50	»	0,90‰
»	10,00	»	1,00‰
»	10,10	»	0,70‰
»	10,30	»	0,40‰
»	10,40	»	0,70‰
»	11,00	»	0,90‰
»	12,00	»	1,00‰
»	15,00	»	1,20‰
»	17,00	»	1,60‰
»	17,30	»	1,75‰