



~~31189~~

RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estratto dal vol. XXIII, serie 6^a, 1^o sem., fasc. 5. - Roma, marzo 1936-XIV

Fisiologia generale. — *Attività enzimatica e tensione superficiale.* — *Azione di alcune sostanze tensioattive sulla lipasi pancreatica* ⁽¹⁾. Nota di E. TRIA, presentata ⁽²⁾ dal Corrisp. S. VISCO.

I. — INTRODUZIONE.

Fin dal 1924, Viscò ⁽³⁾ per spiegare il fatto, che l'esterasi contenuta nel lattice del «*ficus carica*» non scinde la trioleina, mentre ha azione notevole sulla tributirina, ammetteva che ciò potesse dipendere, per lo meno in parte, dalla notevole differenza della tensione superficiale tra i due sistemi, lattice-trideina e lattice-tributirina.

Numerose ricerche, e tra queste importantissime quelle di Willstätter e dei suoi collaboratori ⁽⁴⁻¹⁰⁾, hanno in seguito dimostrato che alcune sostanze tensioattive hanno notevole potere attivante sulla lipasi pancreatica, ma nessuno ha cercato di studiare sistematicamente le relazioni che passano tra attività enzimatica e tensione superficiale del mezzo.

Solo due autori, Glick e King ⁽¹¹⁾ dell'Università di Pittsburgh, allo scopo di spiegare il meccanismo di attivazione e di inibizione di numerose sostanze sulla lipasi del pancreas e sulla esterasi del fegato, hanno ammesso che vi fossero delle relazioni tra tensione superficiale ed attività enzimatica. Infatti essi hanno visto che col crescere del potere tensioattivo della sostanza usata,

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia generale della R. Università di Roma.

(2) Nella seduta del 1^o marzo 1936.

(3) S. VISCO, *Sui fermenti esistenti nel lattice del «Ficus Carica»*. Nota I: Esterasi. («Arch. Farmacol. Sperim.», 1924).

(4) R. WILSTÄTTER, WALDSCHMIDT-LEITZ u. F. MEMMEN, *Bestimmung der pankreatischen Fettsäurelipase. Erste Abhandlung über Pankreasenzyme*. («Ztschr. f. phys. Chem.», 125, 93), 1923.

(5) *Id.*, *Id.*, *Ueber Pankreaslipase. Zweite Abhandlung über Pankreasenzyme*. («*Ibidem*», 125, 132, 1923).

(6) *Id.*, *Id.*, u. F. MEMMEN, *Zur staltymetrischen Bestimmung der lipatischen Tributirylhydrolyse. Dritte Abhandlung über Pankreasenzyme*. («*Ibidem*», 129, 1, 1923).

(7) *Id.*, *Id.*, *Ueber die Wirkung der Pankreaslipase auf verschiedene Substrate. Sechste Abhandlung über Pankreasenzyme*. («*Ibidem*», 133, 220, 1921).

(8) *Id.*, *Id.*, *Vergleich von Magendipase mit Pankreaslipase. Siebente Abhandlung über Pankreasenzyme*. («*Ibidem*», 133, 217, 1921).

(9) *Id.*, *Id.*, *Vergleich von Leberesterase mit Pankreaslipase; über die stereochemische Spezifität der Lipasen. Achte Abhandlung über Pankreasenzyme*. («*Ibidem*», 134, 216, 1924).

(10) *Id.*, *Id.*, *Neue Probleme der Enzymchemie*. («Scientia», 1935, p. 280).

(11) D. GLICK and C. G. KING, *Relationships between the activation of pancreatic lipase and the surface effects of the compounds involved. The mechanism of inhibition and activation*. («J. Biol. Chem.», 97, 673, 1932).

M. 2
B
55
23

aumenta l'attivazione della lipasi e l'inibizione della esterasi. Per spiegare questo fatto gli autori ammettono che quando sostanze estranee sono aggiunte a una soluzione contenente enzima e substrato, si generano due meccanismi: l'uno che tende a produrre una inibizione enzimatica per una combinazione fisica o chimica del composto estraneo con l'enzima, con formazione di un complesso inattivo; l'altro che tende a produrre un abbassamento della tensione interfaciale e per conseguenza un'attivazione dell'enzima rendendo le molecole dell'enzima e del substrato più accessibili l'una a l'altra. Nel caso della esterasi del fegato prevale il primo effetto e quindi la inibizione, nel caso della lipasi pancreatica prevale il secondo cioè l'attivazione.

Gli autori riportano le curve di tensione superficiale dei vari attivatori adoperati in funzione della concentrazione; ma non ci dicono quale tensione superficiale si raggiunge quando queste sostanze sono aggiunte alla soluzione di lipasi e substrato; per conseguenza non è possibile seguire come vari l'attivazione enzimatica col variare della tensione superficiale.

Sembrandomi la questione di notevole interesse, ho ritenuto utile riprenderne lo studio.

II. — TECNICA SEGUITA.

Per la determinazione del potere lipolitico esistono vari metodi, che si possono distinguere in tre gruppi fondamentali:

1) Metodi titrimetrici, che consistono nella determinazione alcalimetrica degli acidi grassi messi in libertà;

2) Metodi tensiometrici con i quali si misura la variazione della tensione superficiale che si ha nel corso della scissione;

3) Metodi gassometrici che consistono nel determinare la quantità di CO_2 spostata da una soluzione di bicarbonato dagli acidi grassi che si formano nel corso della lipolisi.

Nelle mie ricerche mi sono servito di metodi appartenenti ai tre gruppi citati.

Come substrato ho per lo più adoperata una soluzione satura di tributirina preparata secondo le indicazioni di Michaelis (1). Solo in poche ricerche ho adoperato trileina o monobutirina o olio di olivo.

Le prime determinazioni sono state eseguite con la lipasi del ricino preparata col metodo descritto da Euler (2), che consiste nel fare adsorbire la lipasi contenuta nei semi con farina fossile (Kieselgurlipase).

La lipasi pancreatica mi è stata gentilmente fornita allo stato di polvere dall'Istituto Serono, e di essa ho preparato soluzioni gliceriche, trattandola per 24 ore a temperatura ambiente con 15 volte il suo peso di glicerolo 85% e filtrando alla pompa con debole aspirazione attraverso garza. In taluni casi, ho adoperato senz'altro la lipasi allo stato di polvere.

Nelle determinazioni acidimetriche ho operato nella maniera seguente: in beute della capacità di circa 50 cc. si introducono 10 cc. di soluzione satura di tributirina, 2 cc. di una soluzione tampone costituita da due parti di soluzione normale di NH_4Cl e una parte di soluzione normale di NH_3 (pH 8,9 a 30°). In una o più beute non si aggiungono atti-

(1) I. MICHAELIS, *Praktikum der physikalischen Chemie*. (Berlin, S. 83, 1926).

(2) H. v. EULER, *Chemie der Enzyme*. (München, II Teil, 1. Abschn., S. 49, 1928).

(3) G. QUAGLIARIELLO e G. SCOXI, *Sulla esistenza di una lipasi nel tessuto adiposo*. («Arch. Sc. Biol.», 17, 513, 1932).

vatori, alle altre se ne aggiungono quantità crescenti. A tutte le beute 0,2 cc. di soluzione glicerica di lipasi o 10 mg. di polvere. Si determina subito la tensione superficiale delle varie soluzioni così preparate. Poi esse vengono lasciate due ore in termostato a 37°. Alla fine di questo tempo si aggiungono 20 cc. di alcool al 95 % per arrestare l'azione dell'enzima e si titola in presenza di timoltaleina con soluzione alcoolica 0,1 N di KOH fino a netta colorazione azzurra. Dal volume di KOH adoperato in questa titolazione, si sottrae la somma dei volumi della stessa soluzione occorrenti per portare allo stesso pH separatamente la soluzione senza estratto e l'estratto glicerico di lipasi, tenuti pure in termostato per due ore.

Nelle determinazioni stalagmometriche ho seguito il metodo di Rona e Michaelis, adoperando uno stalagmometro di Traube che per l'acqua distillata dava alla temperatura di 20°C. 38 gocce e 37 centesimi, ed eseguendo la prima determinazione dopo 10 minuti dall'aggiunta della lipasi alla soluzione, l'ultima dopo 24 ore e numerose determinazioni intermedie.

Nelle ricerche manometriche ho proceduto nella maniera indicata da Quagliariello e Scoz (3). Nel barattolo di un apparecchio di Barcroft-Warburg si versano 0,5 cc. di estratto neutralizzato, 0,5 cc. di una soluzione 1,5 % di bicarbonato di sodio, 0,5 cc. delle soluzioni dei vari attivatori, 0,5 cc. di acqua distillata. Nel diverticolo laterale si introducono 0,5 cc. di soluzione di tributirina. All'atto della mescolanza non si ha contrazione di volume dovuta alla diluizione della glicerina, perchè col metodo adottato l'estratto glicerico è già notevolmente diluito. Si riempie l'apparecchio con una miscela di 95 volumi di azoto privo di ossigeno e 5 volumi di anidride carbonica. Si porta in termostato a 37° e si agita. Quando non si osservano più variazioni di volume dovute al cambiamento di temperatura, si mescolano i due liquidi e si registrano ad intervalli regolari le variazioni di volume.

Le misure di tensione superficiale statica sono state eseguite col metodo dell'anello mediante il tensiometro di Leconte du Nouy, adoperando vetrini di orologio di 7 cm. di diametro, accuratamente puliti e sgrassati.

III. — ESPERIMENTI.

Nelle seguenti tabelle vengono riportati in forma riassuntiva i risultati ottenuti nelle numerose esperienze eseguite:

TABELLA I.

	mgg.	Tens. superf.	KOH o. n cc.	Attivazione %.
Oleato di sodio .	—	41	0.8	—
	0.25	43	1.2	50
	2.5	38.5	1.6	100
	25	36	1.4	75
	50	28	1.2	50
	100	26.5	1.2	50
Glicocolato di sodio	—	44	0.9	—
	0.25	42	1.2	33
	0.5	38	1.6	77
	1	32	1.4	55
	1.5	30	1.2	33
	2	28	1.2	33
	5	27	1	11
	10	26	0.5	— 44
20	26	0.5	— 44	
Taurocolato di sodio	—	41	0.8	—
	0.25	39	1.5	87
	0.5	35	1.8	125
	1	30	1.8	125
	10	26	1.2	50
	50	25	0.6	— 25
	100	25	0.6	— 25
	200	24	0.3	— 50
Bile	—	39	0.6	—
	0.1	38	1.2	100
	0.5	39	1.2	100
	1	41	0.8	25
	10	41	0.8	25
	50	42	0.8	25
	100	42	0.8	25
Alcool ottico .	—	49	0.8	—
	0.01 (circa)	49	1.1	37.05
	0.05	45	0.8	0
	0.1	30	0.5	— 37.05
	1	26	0	—
	5	26	0	—
Alcool isoamilico	—	50	0.9	—
	0.01	50	0.9	0
	0.05	48	1	11
	0.1	47	1	11
	1	40	1.8	100
	5	35	0.5	— 44
Ovalbumina . . .	—	44	0.9	—
	5	44	0.8	— 10
	10	42	0.6	— 33
	20	42	0.6	— 33
	50	42	0.5	— 44

TABELLA II.

Azione combinata del taurocolato e dell'oleato di sodio.

Oleato mmg	Taurocolato mmg	Tens. superf. dine	KOH 0,1 N cc.	Attivazione %
—	—	39	0,9	—
—	0,5	35	1,8	100
—	1	30	1,8	100
2,5	0,5	35	1,7	88
5	5	30	3,2	255
10	5	29	2	122

TABELLA III.

Medie di tre esperienze eseguite col metodo stalagmometrico.

Soluzione satura di tributirina. Concentrazioni variabili di oleato di sodio.

Tempo	Beuta n. 1	Beuta n. 2	Beuta n. 3	Beuta n. 4	Beuta n. 5	Beuta n. 6
	T. S. 41,8	T. S. 44	T. S. 42,8	T. S. 41	T. S. 39	T. S. 35
—	100	100	100	100	100	100
15'	85	78	64	63	79	81
30'	70	62	58	57	70	72
60'	69	60	51	56	64	65
2 h	65	58	52	54	60	60
8 h	60	56	51	51	52	56
14 h	52	53	51	50	51	54
21 h	50	51	49	50	50	52

TABELLA IV.

Valori medi di tre esperienze eseguite con i manometri di Warburg. Quantità di tributirrina presente: 0.027 millimol. La tensione superficiale viene abbassata aggiungendo quantità variabili di oleato di sodio.

	Tributirrina idrolizzata %				
	App. n. 1 T. S. 43	App. n. 2 T. S. 42	App. n. 3 T. S. 39	App. n. 4 T. S. 31	App. n. 5 T. S. 28
dopo 15' . . .	8.2	15.1	18.2	12	10
» 30' . . .	14	20	29	18.2	17
» 60' . . .	20.4	26.5	34.5	22	22.7
» 120' . . .	31	31.8	36	30.8	32
» 180' . . .	38.6	40	40.2	37	38

Tali valori sono stati ottenuti col seguente calcolo: Poichè la quantità totale di tributirrina presente nei vari apparecchi era 0.027 millimol. la quale, se scissa totalmente avrebbe dato 0.027×3 millimol di acido butirrico e quindi di acido carbonico, dal numero di mmc di CO_2 prodotto alle fine dei vari intervalli di tempo considerati, si può risalire alla quantità di estere scisso.

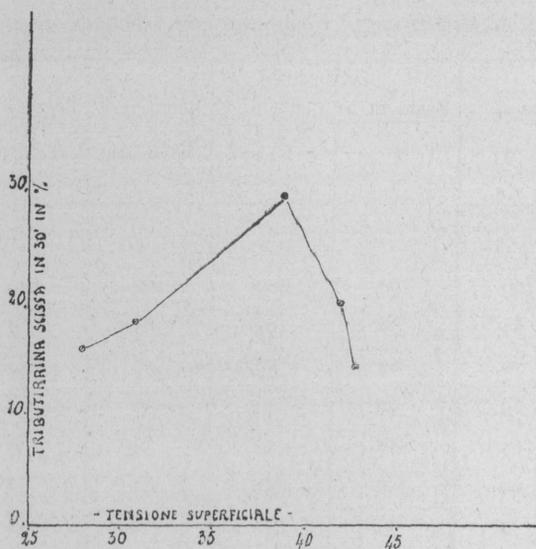


Fig. 1. - Quantità di tributirrina scissa in 30' a varie tensioni superficiali (Costruita coi dati della tabella IV).

IV. — DISCUSSIONE DEI RISULTATI.

Dalle mie esperienze risulta che nel sistema tributirina-lipasi esiste per le sostanze studiate un *optimum* di concentrazione, a cui corrisponde una tensione superficiale alla quale l'attivazione è massima. Tale tensione superficiale corrisponde abbastanza bene per l'oleato di sodio, il taurocolato, il glicocolato di sodio, la bile e l'alcool isoamilico; se ne discosta per l'alcool ottilico che ha azione attivante solo a concentrazione estremamente bassa, a cui corrisponde una tensione superficiale relativamente elevata.

Risulta altresì (dalle tabelle 3 e 4) che le maggiori differenze di attività enzimatica si hanno nei primi 60 minuti; evidentemente perchè col procedere ulteriore della scissione, le differenze iniziali di tensione superficiale vanno mano mano riducendosi fino a scomparire del tutto. Ed è perciò che nello studio che mi sono proposto ho tenuto conto soltanto della tensione superficiale iniziale.

Che l'oleato di sodio già in piccole concentrazioni avesse un'azione attivante sulla scissione pancreatico della tributirina era stato già visto da Willstätter e Memmen. Tale fatto è stato in seguito confermato da numerosi autori e tra gli altri da Woodhouse⁽¹⁾, il quale ha studiato l'effetto dell'aggiunta di numerosi sali di sodio di acidi organici (oleato, acetato, citrato ecc.) sulla lipolisi di olio di oliva, ed ha trovato che tali sali causano tutti, allo stesso modo dell'oleato di sodio, un aumento della lipolisi. L'autore pensa che tale fatto sia dovuto a una stabilizzazione della emulsione di olio. Egli non ci dice però a che pH sono state eseguite le sue determinazioni. Esperienze da me fatte per studiare la eventuale azione attivante dell'acetato, del citrato, del lattato di sodio sulla scissione della tributirina a pH 8,9 hanno dato sempre risultato negativo.

Per quanto riguarda i sali biliari e la bile la loro azione attivante è già conosciuta da molti anni. Nenki⁽²⁾, Pawlow⁽³⁾, Magnus⁽⁴⁾, v. Fürth e Schutz⁽⁵⁾, ed in seguito Willstätter⁽⁶⁾, Waldschmidt-Leitz⁽⁶⁾, e tra noi Visco⁽⁶⁾ e numerosi altri autori la hanno sempre riscontrata. Si era anche trovato che per la scissione dei trigliceridi a basso peso molecolare esiste un *optimum* di concentrazione dei sali biliari, che secondo Terroine⁽⁷⁾ è

(1) D. L. WOODHOUSE, *Investigations in enzyme action directed towards the study of the biochemistry of cancer. The activation of pancreatic prolipase.* («*Bioch. J.*», 26, 1512, 1932).

(2) NENKI (citato da EULER, loc. cit., I Teil, p. 209).

(3) PAWLOW (citato da EULER, loc. cit., I Teil, p. 209).

(4) MAGNUS («*Ztschr. f. physiol. Chemie*», 12, 149, 1902).

(5) FÜRTH v. und SCHÜTZ (citati da EULER, loc. cit., II Teil, I Abschn. S. 17).

(6) S. VISCO, *Sull'azione della lipasi pancreatico. Contributo alla biologia degli enzimi.* («*Rend. R. Acc. Lincei*», Cl. Sc. Fis. Mat. e Nat., 20, ser. 5^a, t. 10, 1911).

(7) TERROINE (citato da EULER, loc. cit., II Teil, I Abschn., S. 18).

del 0,33%. Ma se il fatto è certo, tutt'altro che assodato è il meccanismo di azione dei sali biliari. Prescindendo dalla ipotesi di Hewlett⁽¹⁾ e Küttner⁽²⁾, secondo i quali la azione attivante della bile sarebbe dovuta al suo contenuto in lecitina, ipotesi oramai definitivamente caduta dopo le ricerche di v. Fürth e Schutz, e dalla ipotesi di Bradley⁽³⁾, che riteneva che i sali biliari agissero favorendo l'emulsione del substrato, il che è in contrasto col fatto sperimentalmente accertato, che i sali biliari agiscono anche su substrati completamente solubili; le teorie che attualmente si contendono il campo sono: 1° quella sostenuta da Magnus dell'attivazione di un zimogeno in enzima, e 2° quella ammessa da Willstätter, Waldschmidt-Leitz e Memmen i quali pensano che i sali biliari, come del resto molti altri attivatori, agiscano favorendo la formazione di prodotti di adsorbimento tra enzima e substrato.

Nelle mie esperienze si ha una attivazione la quale va aumentando col l'aumentare della concentrazione dei sali biliari per poi diminuire. Esiste quindi per i sali biliari una concentrazione alla quale corrisponde un *optimum* di attività enzimatica. Secondo la concezione di Alexander⁽⁴⁾ l'azione degli enzimi dipende principalmente, ma non completamente dall'esposizione di grandi aree interfaciali aventi campi specifici elettronici di forza. Se il grado di aggregazione di un enzima è troppo grande, sono in presenza aree non sufficienti a produrre una notevole attività. D'altra parte se il grado di dispersione è molto notevole, si determina una attività cinetica esageratamente grande, per cui il numero di urti efficaci tra enzima e substrato viene ad essere notevolmente ridotto. L'attività enzimatica sarebbe quindi legata a due fatti fondamentali: 1° larga esposizione di aree specificamente attive; 2° grande, ma non esagerata attività cinetica.

Ora, quando si abbassa la tensione superficiale del mezzo nel quale si trovano enzima e substrato, si ha, per un noto principio di chimica-fisica, una diminuzione della tensione interfaciale tra le due fasi presenti; per conseguenza le molecole dell'enzima e del substrato diventano più accessibili l'una all'altra e la loro energia cinetica aumenta. Si avrebbe quindi, ammettendo l'ipotesi di Alexander, un'attivazione dell'enzima. Abbassandosi ulteriormente la tensione superficiale, i moti di agitazione molecolare diventano sempre più notevoli, ma disordinati, il numero degli urti efficaci viene ridotto e si avrebbe pertanto una diminuzione dell'attivazione.

Con questa semplice ipotesi si potrebbe quindi spiegare l'esistenza per la lipasi pancreatica di un *optimum* di tensione superficiale. Certo molte cose non sono chiare. Così non è facile dare una spiegazione di quello che

(1) HEWLETT (citato da EULER, loc. cit., II Teil, I Abschn., S. 17).

(2) KÜTTNER («Ztschr. f. physiol. Chemie», 50, 472, 1907).

(3) BRADLEY («J. Biol. Chem.», 133, 6, 1909).

(4) J. ALEXANDER, *Enzymes, vitamins and the zone of maximum colloidal stability*. («Science», 80, 79, 1934).

si verifica quando alla soluzione di lipasi e substrato si aggiungono simultaneamente due o più attivatori. Altri fattori devono intervenire, e primo fra questi, un'azione specifica dipendente dalla natura chimica dei singoli attivatori e dai processi chimici e chimico-fisici a cui essi possono dare origine. Così il fatto che per l'alcool ottilico l'*optimum* di tensione superficiale è più elevato che per l'oleato di sodio e i sali biliari, si potrebbe spiegare per l'azione tossica di questo alcool, per cui solo a piccolissima concentrazione, a cui corrisponde una tensione superficiale relativamente elevata prevale l'azione attivatrice, e viceversa a concentrazione solo di poco più alta, prevale l'azione tossica.

V. — CONCLUSIONI.

Si è trovato che per l'attività tributirrasica della lipasi pancreatica esiste un *optimum* di tensione superficiale statica, che per l'oleato, il glicocolato, il taurocolato di sodio, la bile e l'alcool isoamilico corrisponde a 38-40 dine

55727

