

RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estratto dal vol. XXV, serie 6^a, 1^o sem., fasc. 2. - Roma, gennaio 1937-XV

RICERCHE SULLA GLICOLISI DELLA RETINA

NOTA

DI

L. CALIFANO



Bia
B
57
54

ROMA

DOTT. GIOVANNI BARDI

TIPOGRAFO DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

1937-XV



Patologia. — *Ricerche sulla glicolisi della retina* ⁽¹⁾. Nota di L. CALIFANO, presentata ⁽²⁾ dal Socio P. RONDONI.

Il ricambio della retina è caratterizzato da valori altissimi sia della glicolisi che della respirazione. La glicolisi anaerobica ($Q_M^{N_2}$) della retina di ratto è secondo Warburg ⁽³⁾ + 88 e la respirazione (Q_{O_2}) — 31, valori entrambi che sono i più elevati finora noti, sia per le cellule adulte quiescenti, che per quelle in sviluppo embrionale o neoplastico. Di conseguenza l'U ($Q_M^{N_2} - 2 Q_{O_2}$), cioè il predominio della glicolisi sulla respirazione raggiunge la cifra di + 26, che è la più alta nota finora.

Se nelle prime ricerche sembrava che la elevata glicolisi retinica fosse espressione del danneggiamento portato sugli elementi durante la preparazione, ora non esiste più dubbio che essa rappresenti una caratteristica metabolica fondamentale del tessuto. Appare perciò interessante lo studio del meccanismo con cui essa si effettua, fatto su cui finora non esistono che poche e frammentarie nozioni.

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Patologia generale della R. Università « B. Mussolini » di Bari.

(2) Nella seduta del 3 gennaio 1937.

(3) O. WARBURG, « Bioch. Zeitschr. », 181, 481, 1927.

La scissione dello zucchero si avvera nei vari protoplasmici con modalità differenti. Lo schema meglio noto è quello del tessuto muscolare in cui dal glicogeno, per un processo di fosforizzazione si forma acido fruttosiofosforico, che si scinde in una molecola di acido gliceroaldeido-fosforico ed in una di acido diossiacetonefosforico. Per dismutazione di questi due triosi si ha come corpo ridotto l'acido α -glicerofosforico e come corpo ossidato l'acido fosfoglicerico, che dà luogo ad acido piruvico. Da una molecola di questo ed una di acido α -gliceriofosforico si ha una molecola di acido lattico ed una di acido trioso-fosforico che rientra in circolo. Questo schema formulato da Embden è stato poi perfezionato da Meyerhof e Collaboratori nel senso che è stato veduto che la trasformazione dell'acido fosfoglicerico ad acido piruvico attraversa due stadi reversibili e cioè dall'acido 3-fosfoglicerico si passa al 2-fosfoglicerico e quindi all'acido fosfopiruvico, che in presenza di acido adenosintrifosforico e creatina dà luogo ad acido piruvico. La trasformazione dell'acido esosodifosforico avviene per opera di un enzima denominato da Meyerhof « zimoexasi ».

Lo schema di Embden-Meyerhof è stato sostanzialmente trovato valido per la fermentazione alcoolica (Meyerhof ⁽¹⁾) e per quanto pare anche per la glicolisi dei globuli rossi (Dische ⁽²⁾). Anche nella demolizione batterica dello zucchero si hanno fatti analoghi, complicati dalla rapida successione delle altre fermentazioni che si avverano (vedi Kluyver ⁽³⁾). Per il sistema nervoso centrale, su cui si è molto lavorato, si ammette che esistano due vie di demolizione: una che dal glucosio, senza fosforizzazione, porta all'acido lattico ed un'altra che partendo dal glicogeno implica la formazione di corpi fosforati (Ashford e Holmes ⁽⁴⁾). Questa via, che in sostanza è quella seguita dal tessuto muscolare, appare sempre più importante (Peters e Thompson ⁽⁵⁾, Mazza e Malaguzzi ⁽⁶⁾).

Per la glicolisi delle cellule neoplastiche esistono dati alquanto disparati e per quanto sia dimostrata una larga capacità alla fosforizzazione non si può dire se e in quale misura risulti valido lo schema di Embden (vedi Calò ⁽⁷⁾, ove è riassunta la questione).

Per quanto riguarda la glicolisi retinica risultò dalle prime ricerche che i fosfati non hanno parte attiva nella fermentazione del glucosio, sia perchè non si liberano fosfati nè l'aggiunta di questi incrementa sensibilmente la formazione di acido lattico, sia perchè l'aggiunta di arseniato, che nel muscolo attiva la formazione di acido lattico, per aumentata scissione dell'esosofosfato,

(1) O. MEYERHOF, « Ergebnisse der Enzymforschung », 4, 208, 1935.

(2) Z. DISCHE, « Bioch. Zeitschr. », 274, 51, 1934.

(3) A. J. KLUYVER, « Ergebnisse der Enzymforschung », 4, 230, 1935.

(4) CH. A. ASHFORD, e E. G. HOLMES, « Bioch. Journ. », 23, 748, 1929.

(5) R. A. PETERS, e R. H. S. THOMPSON, « Bioch. Journ. », 28, 916, 1934.

(6) F. P. MAZZA, e C. MALAGUZZI, « Arch. Scienze biol. », 21, 444, 1935.

(7) A. CALÒ, « Riv. di Patol. sper. », 6 (N. S.); 299, 1936.

non spiega nessuna azione sulla glicolisi retinica (Bumm e Fehrenbach⁽¹⁾). Contro di ciò esiste però il fatto che la florizina, che ha azione specifica sul processo di fosforizzazione, inibisce notevolmente la glicolisi, ciò che farebbe supporre l'intervento di un ciclo del fosforo nella demolizione dello zucchero (de Conciliis⁽²⁾). Da ricerche fatte eseguire da Possenti⁽³⁾ risultò che una tenue produzione di acido lattico si ha sia dall'esosodifosfato che dalla miscela di α -glicerofosfato e fosfoglicerato, ciò che però non autorizza ancora a ritenere valido per la retina il meccanismo glicolitico del muscolo; in ogni caso la produzione di acido lattico a partire dal glucosio avviene con velocità enormemente superiore.

Che, in effetti, differenze sostanziali esistano nel meccanismo di produzione di acido lattico tra i vari tessuti sede di glicolisi risulta da vari fatti. Sin dalle prime ricerche fu, per esempio, veduto che mentre nel muscolo in cui la glicolisi è prevalentemente da glicogeno non esiste nessuna differenza nella produzione di acido lattico sia che si parta dal glucosio che dal fruttosio (Meyerhof, Laquer e Meyer⁽⁴⁾) i tumori invece non fermentano che i soli esosi e tra questi oltre il glucosio, il mannosio, il fruttosio ed il galattosio con i seguenti valori del $Q_{CO_2}^{N_2}$ *d*-glucosio 23.9; *d*-mannosio 21.6; *d*-fruttosio 3.3; *d*-galattosio 1.3. L' α ed il β glucosio sono fermentati quasi con la stessa velocità (Warburg, Posener e Negelein⁽⁵⁾). Inoltre mentre la glicolisi muscolare è eccitata dai narcotici indifferenti (Meyerhof⁽⁶⁾) quella dei tumori è inibita, così come è inibita la respirazione (Minami⁽⁷⁾). Più di recente, infine, è stato veduto che mentre la glicolisi a partire dal glicogeno è lievemente inibita dal glutatione ridotto, quella del glucosio è fortemente accelerata (Geiger⁽⁸⁾).

Che zuccheri differenti dal glucosio sieno fermentabili risulta anche per i muscoli da successive ricerche del Meyerhof⁽⁹⁾ il quale stabilì le percentuali di scissione dei vari zuccheri⁽¹⁰⁾ da parte di estratti muscolari, venendo alla conclusione che con gli estratti di rana la produzione di acido lattico a partire

(1) E. BUMM, e K. FEHRENBACH, « Zeitschr. f. physiol. Chemie », 195, 101, 1931.

(2) N. DE CONCILIIIS, « Lo Sperimentale », 89, 82, 1935.

(3) G. POSSENTI, « Riv. di Patol. sper. », 4 (N. S.), 183, 1935.

(4) O. MEYERHOF, F. LAQUER, P. MEYER, « Zeitschr. f. physiol. Chemie », 124, 211, 1923.

(5) O. WARBURG, K. POSENER, E. NEGELEIN, « Bioch. Zeitschr. », 152, 309, 1924.

(6) O. MEYERHOF, « Pflüger's Arch. », 188, 148, 1921.

(7) S. MINAMI, « Bioch. Zeitschr. », 142, 334, 1923.

(8) A. GEIGER, « Bioch. Journ. », 29, 811, 1935.

(9) O. MEYERHOF, « Bioch. Zeitschr. », 183, 176, 1927.

(10) Con estratto muscolare di rana senza attivatori il Meyerhof riporta, ad esempio, i seguenti dati:

Glicogeno 63 %; amido 100 %; glucosio 20 %; fruttosio 17 %; mannosio 13 %; galattosio 3 %; e per un'altra determinazione: amido 100 %; glucosio 42 %; maltosio 13 %; amilobiosio 13 %; saccarosio 0.

dal glicogeno è sempre più cospicua che dal glucosio; nel coniglio si possono avere anche valori non molto differenti (100 % per il glicogeno, 95 % per il glucosio) ma con l'invecchiamento degli estratti mentre permangono immutate l'attività glicolitica per il glicogeno, quella per il glucosio si attenua sino a scomparire.

Per i tumori ricerche di Downes⁽¹⁾ mostrano che essi scindono il glucosio, il maltosio e il mannosio con pari velocità, meno rapidamente il fruttosio e l'esosofosfato, niente del tutto il lattosio il galattosio ed il glicogeno. Altri tessuti e specialmente il sistema nervoso centrale presentano un comportamento analogo a quello dei tumori e quindi differente da quello dei muscoli, così il glicogeno, il fruttosio ed il maltosio come l'aldeide glicerica e il diossioacetone sono poco o punto fermentati il mannosio lo è largamente, meno l'acido esosofosforico (Loebel⁽²⁾).

Nella tabella I sono riportati i dati della capacità fermentativa della retina verso vari zuccheri. Le determinazioni manometriche, secondo Warburg, si sono eseguite su frammenti di retina di bue in liquido di Ringer secondo Warburg ed in ambiente 5 % CO₂ in N₂. Gli occhi venivano rapidamente asportati dagli animali appena abbattuti e trasportati in laboratorio. Non trascorrevano in genere più di 10-15 minuti tra la morte degli animali e l'inizio delle letture manometriche, lasso di tempo che è senza importanza sull'altezza della glicolisi e respirazione del tessuto.

Nella tabella II sono riportati i dati relativi alla fermentazione di 3 esteri esosofosforici; l'estere di Harden e Young (ac. 1:6 fruttosodifosforico) l'estere di Neuberger (acido 6-fruttosofosforico) e l'estere di Robison (acido 6-glucosofosforico). È ora noto il significato fisiologico e la struttura di questi tre composti: l'estere di Embden (lattacidogeno), che si trova nel muscolo vivente, è identico all'estere di Robison che, come Meyerhof e Lohmann⁽³⁾ hanno dimostrato, non è una sostanza unitaria ma una miscela di cui 3/4 sono rappresentati da acido aldoso monofosforico e 1/4 da acido chetoso monofosforico. Dall'idrolisi enzimatica dell'estere difosforico non si forma mai estere di Neuberger, come avviene nella idrolisi acida, ma sempre quello di Robison-Embden giacché si stabilisce subito, per azione enzimatica, un equilibrio tra i due componenti sia che si parta dall'estere del glucosio che da quello del fruttosio.

Gli estratti muscolari, secondo ricerche di Meyerhof e Lohmann⁽⁴⁾, trasformano rapidamente i due monoesteri naturali, giacché una parte si scinde in acido lattico ed un'altra si sintetizza ad acido esosodifosforico. La velocità di trasformazione va progressivamente scemando sino a ridursi a quella dell'acido esosodifosforico e anche meno o quando per la sintesi

(1) H. R. DOWNES, « Journ. Canc. Research. », 13, 268, 1929.

(2) R. O. LOEBEL, « Bioch. Zeitschr. », 167, 219, 1925.

(3) O. MEYERHOF e K. LOHMANN, « Bioch. Zeitschr. », 185, 113, 1927.

(4) O. MEYERHOF e K. LOHMANN, « Bioch. Zeitschr. », 185, 113, 1927.

TABELLA I.

Substrati (in concentra- zione M/100)	1ª ora		2ª ora	
	$Q_M^{N_2}$	Acido lattico in % di tessuto secco per ora	$Q_M^{N_2}$	Acido lattico in % di tessuto secco per ora
Glucosio	+ 21.8	8.76	—	—
Fruttosio	+ 5.60	2.25	—	—
Mannosio	+ 26.80	10.77	—	—
Galattosio	+ 2.46	0.888	—	—
Arabinosio	+ 0.70	0.281	—	—
Xilosio	0	0	—	—
—	+ 0.320	0.128	+ 0.336	0.135
Glucosio	+ 30.50	12.26	+ 25.90	10.41
Fruttosio	+ 8.50	3.42	+ 7.70	3.095
Mannosio	+ 31.80	12.78	+ 27.00	10.85
Galattosio	+ 2.86	1.14	+ 1.01	0.406
Amido	+ 0.53	0.213	+ 0.705	0.283
—	+ 1.22	0.490	+ 1.49	0.598
Glucosio	+ 35.6	14.31	+ 21.00	8.44
Glicogeno	+ 2.34	0.94	+ 1.54	0.62
Saccarosio	+ 1.86	0.747	+ 1.68	0.675
Maltosio	+ 3.42	1.37	+ 3.84	1.54
Lattosio	+ 2.10	0.844	+ 2.25	0.945

e scissione tutto il monoestere è stato consumato, ovvero quando tutti i fosfati anorganici della soluzione sono stati esterificati.

I tre composti da me adoperati provenivano da sali di calcio o di bario, che venivano trasformati in sali sodici per trattamento con le quantità calcolate di ossalato e rispettivamente di solfato sodico. Il precipitato di ossalato di calcio o di solfato di bario veniva allontanato per centrifugazione (1).

(1) Ringrazio vivamente anche qui il prof. C. Neuberg che mi ha gentilmente favorito alcuni dei composti adoperati.

Per la presenza di fosfati si è naturalmente determinata la « ritenzione » del CO₂ da parte del liquido alla fine dell'esperienza. Nei valori riportati è tenuto perciò conto di tale « ritenzione » che si è aggirata tra il 15% e il 18% del valore globale del CO₂ sviluppato.

TABELLA II.

Substrati (in concentra- zione M/100)	1 ^a ora		2 ^a ora		3 ^a ora	
	Q _M ^{N₂}	Acido lattico in % di tes- suto secco per ora	Q _M ^{N₂}	Acido lattico in % di tes- suto secco per ora	Q _M ^{N₂}	Acido lattico in % di tes- suto secco per ora
—	+ 1.04	0.418	+ 0.97	0.389	+ 0.97	0.389
Glucosio . .	+ 28.3	11.30	+ 15.60	6.27	+ 14.00	5.62
Difosfato . .	+ 3.46	1.39	+ 2.77	1.13	+ 2.77	1.13
Estere di Neu- berg . . .	+ 3.89	1.60	+ 3.11	1.23	+ 2.72	1.09
Estere di Ro- bison . . .	+ 4.50	1.81	+ 2.77	1.11	+ 2.42	0.97

La fermentazione, dunque, dei vari carboidrati ha nella retina il seguente sviluppo: i pentosi (arabinosio e xilosio) non sono fermentabili; gli esosi lo sono con velocità decrescente nel seguente senso: mannosio, glucosio, fruttosio, galattosio. La velocità di fermentazione è per il fruttosio circa un quarto e per il galattosio circa un decimo di quella corrispondente al mannosio e glucosio. Dei disaccaridi il maltosio è intaccato appena, il saccarosio ed il lattosio affatto. Dei polisaccaridi il glicogeno da origine solo a tracce di acido lattico, l'amido è del tutto inattaccabile.

Gli zuccheri fosforati danno sicuramente luogo a formazione di acido lattico; il più attivo appare essere l'estere di Neuberger, mentre il difosfato e l'estere di Robison sono fermentati con pari velocità. La fermentazione dei tre esosofosfati è in ogni caso assai più limitata di quello del glucosio e perciò appare più verosimile che la produzione di acido lattico, che si riscontra con gli esteri fosforici, sia piuttosto espressione della fermentazione del carboidrato defosforato perchè necessariamente esposto all'azione della attiva fosfatasi retinica (De Conciliis⁽¹⁾), che non ad un vero e proprio ciclo dell'estere come tale.

L'aggiunta di fosfati non determina nessuna variazione sulla velocità di fermentazione degli zuccheri nè diventano fermentescibili, in tali condizioni, altri carboidrati.

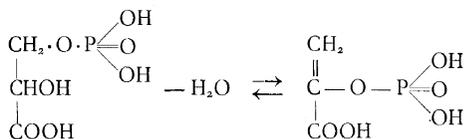
(1) N. DE CONCILII, « Lo Sperimentale », 88, 793, 1934.

Degno di rilievo appare il comportamento dell'acido monoiodoacetico che limita notevolmente, fino ad arrestarla, la fermentazione del glucosio e del mannosio.

TABELLA III.

		$Q_M^{N_2}$ Glucosio	$Q_M^{N_2}$ Glucosio con iodoacetato n/1000	$Q_M^{N_2}$ Mannosio	$Q_M^{N_2}$ Mannosio con iodoacetato n/1000
1	60'	+ 39.4	+ 5.08	+ 46	+ 6.35
	120'	+ 17.5	+ 0.88	+ 25	0
2	60'	+ 21.2	+ 2.92	+ 24.6	+ 3.48
	120'	+ 16.5	+ 0.366	+ 16.4	0

Dalle ricerche di Meyerhof e Kiessling ⁽¹⁾ risulta che mentre i fluoruri inibiscono la glicolisi muscolare perchè agenti elettivamente sulla enolasi, cioè sull'enzima che determina la trasformazione dell'acido fosfoglicerico in acido fosfopiruvico:



l'acido monoiodoacetico non ha nessuna azione su questo sistema. Agisce esso invece sulla ossidazione dell'acido triosofosforico ad acido fosfoglicerico così che, mentre in presenza di fluoruri si ha formazione di acido fosfoglicerico ed il processo si arresta a questo punto, in presenza di iodoacetato è inibita la formazione di acido fosfoglicerico mentre non è ostacolata la reazione successiva cioè la trasformazione in acido fosfopiruvico.

La inibizione riscontrata con l'acido monoiodoacetico, se se ne deve ritenere elettiva l'azione, farebbe pertanto pensare che nella glicolisi della retina del glucosio e del mannosio si abbia formazione di triosi e l'acido monoiodoacetico inibisca la glicolisi perchè paralizzava l'ossidazione di questi. Ciò sarebbe avvalorato dal fatto dimostrato da Meyerhof e Lohmann ⁽²⁾ che nella retina esiste una zimoexesasi - il fermento cioè determinante la tra-

(1) O. MEYERHOF e W. KIESSLING, « Bioch. Zeitschr. », 264, 40, 1933; 267, 313, 1933.
 (2) O. MEYERHOF e K. LOHMANN, « Bioch. Zeitschr. », 273, 413, 1934.

sformazione dell'acido esodifosforico in triosi - discretamente attiva (quantità relative: muscolo 100, cuore 4, retina 2, cervello 1.6, carcinoma 1.3 ecc.).

La glicolisi della retina, dunque, che è essenzialmente una glicolisi da glucosio, e in cui un ciclo del fosforo sarebbe da escludersi per le esposte considerazioni, è pure inibita dagli stessi agenti che paralizzano la glicolisi muscolare, corpi che agiscono sul processo di fosforizzazione (florizina) o sulla ossidazione di corpi intermedi originanti da composti fosforati (acido iodoacetico), ciò che è indice della complessità dei fenomeni che intervengono, fatto cui sono indirizzate ricerche in corso.

~~310011~~

54708

