

Valutazione sperimentale dell'effetto di sostanze biologiche su alcuni parametri biochimici correlati al metabolismo energetico muscolare

2. Azione dell'uridin-5'-difosfoglicosio (UDPG)

Ornella Pastoris, Maurizia Dossena, Donatella Fulle, Marco Taglietti, Roberto Bernardi, GianMartino Benzi

O. Pastoris

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

M. Dossena

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

D. Fulle

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

M. Taglietti

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

R. Bernardi

*Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia*

G. Benzi

*Direttore Fiduciario del
C. S. & R. F.I.D.A.L.*

Introduzione

L'uridin-5'-difosfoglicosio (UDPG), come la maggior parte degli zuccheri difosfonucleosidici, può essere considerato la forma « attiva » del glucosio, poiché contiene nella sua struttura molecolare l'energia necessaria per la formazione di un legame glicosidico. Il nucleotide uridinico è disponibile per le diverse trasformazioni che vengono imposte dalle condizioni dell'organismo « in toto » o di particolari organi. L'UDPG tende a promuovere e/o stimolare funzioni diverse a seconda degli squilibri in atto nell'organismo. Così l'UDPG rappresenta un fattore di stimolo per la produzione di ATP in quanto promuove la sintesi ATP-dipendente del glicogeno e stimola il metabolismo glucidico « in toto » (Bianco e Mantovani, 1974a). In condizioni fisiologiche, l'UDPG raggiunge alti livelli di concentrazione negli organi capaci di attuare importanti meccanismi detossificativi (Sonnino, 1967; Klinger e Chimenti, 1967; Vagelli, 1974; Vagelli, 1976; Galatulas, 1976; Zonta et al., 1976; Chiesara et al., 1980). Ciò è correlato, da una parte, con l'intervento sulle riser-

ve energetiche necessarie per espletare le reazioni di detossicazione e, dall'altra, con il ruolo (Storey e Dutton, 1955) che il nucleotide esercita quale precursore obbligato dell'acido uridindifosfoglicuronico (UDPGA). Infatti, altri possibili precursori nucleotidici (come, ad esempio, l'UTP) non danno luogo a formazione di UDPGA, anche se posti a contatto con acido fosfoglicuronico in presenza dell'enzima uridil-transferasico.

L'UDPGA è, a sua volta, donatore di acido glicuronico attivo, la cui disponibilità rappresenta il fattore limitante la glicuro-coniugazione, che si realizza per intervento dei sistemi enzimatici glicuronil-transferasici (Scremin et al., 1973; Okolicsanyi e Scremin, 1972-73; Okolicsanyi et al., 1976). I processi di detossicazione si basano sulla reazione di coniugazione dell'UDPGA con un altro metabolita endogeno o con sostanze esogene la cui tossicità viene diminuita o neutralizzata. Infatti i glicurono-derivati sono di norma più solubili nei liquidi organici e di conseguenza più facilmente eliminabili delle sostanze originarie. Il sistema enzimatico glicuronil-transferasico, che porta al trasferimento della porzione glicuronica dell'UDPGA ad un accettore con gruppi ossidrilici, carbosilici, aminici, ecc., è localizzato nella frazione microsomiale di vari organi, ed in particolare, del fegato e del rene. Il ruolo dell'UDPG nella detossicazione e nei processi di coniugazione in genere è duplice: in primo luogo l'UDPG rappresenta il substrato naturale della deidrogenasi che catalizza la sua trasformazione in UDPGA; in secondo luogo, il nucleotide svolge un'intensa attivazione delle transferasi agenti sui processi di coniugazione. Quest'ultima azione non è di tipo induttivo e pertanto è correlata non tanto ad una aumentata sintesi di molecole enzimatiche, quanto ad una migliorata capacità funzionale.

La somministrazione del nucleotide induce modificazioni del ricambio glucidico in varie condizioni fisiopatologiche sperimentali: infatti l'UDPG incrementa l'incorporazione di glucosio nel glicogeno epatico (Leloir e Cardini, 1957; Nigam, 1967; Villar-Palasi et al.,

1966; Bianco e Mantovani, 1974; Cova, 1974) e stimola l'attività della glicogeno-sintetasi (Mantia et al., 1968), particolarmente in presenza di glucosio ed indipendentemente da fenomeni di tipo induttivo. Ora è noto che la glicogeno-sintetasi è presente, oltre che nel fegato (organo in cui la sua attività è massima), anche a livello di altri organi e tessuti, ad es.: in leucociti e piastrine umane (Luganova e Sejc, 1963), in alcune cellule del midollo osseo umano, i mielocariociti (Luganova et al., 1964), nella milza, nel rene e nel polmone (Leloir et al., 1969); particolarmente ricchi di glicogeno-sintetasi risultano il muscolo cardiaco e quello scheletrico. Il ruolo dell'UDPG è stato chiarito a livello epatico (per quanto riguarda il metabolismo glucidico e i meccanismi di detossicazione) ed a livello renale e duodenale (per quanto riguarda l'azione sull'attività glicuronil-transferasica). Tuttavia il nucleotide non è stato oggetto di studi particolari inerenti possibili interventi sul metabolismo del muscolo scheletrico, pur essendo stata ipotizzata una sua azione più o meno diretta, in relazione con i processi di interrelazione tra i vari metabolismi fondamentali (glucidico, protidico e lipidico). Al fine di chiarire l'azione dell'UDPG sul metabolismo muscolare nel presente lavoro ne è stato valutato l'effetto sulla concentrazione di alcuni substrati, intermedi e prodotti finali dalla via glicolitica anaerobica, del ciclo di Krebs, di alcuni aminoacidi ad esso correlati ed, infine, del pool dei fosfati labili. La valutazione è stata condotta sul muscolo gastrocnemio di ratto in seguito a trattamento con UDPG somministrato a varie dosi ed a tempi definiti: 1, 2 o 4 settimane.

Materiali e metodi

Animali e trattamento

Furono utilizzati ratti maschi del peso di 300 ± 20 g (Charles River, ceppo Sprague Dawley), mantenuti in condizioni ambientali costanti per temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), umidità relativa ($60 \pm 5\%$) e ciclo circadiano (12 ore di luce e 12 ore di buio), nutriti con normali diete da la-

boratorio ed acqua ad libitum. Gli animali furono trattati con uridin-5'-difosfoglicucosio (UDPG) alle seguenti dosi: 0,8-2,0-5,0 mg/kg i.p. pro die, con somministrazioni di 1, 2 e 4 settimane (6 giorni di trattamento alla settimana per ciascuna dose). Gli animali di controllo furono trattati con il solo veicolo acquoso.

Tecnica analitica

48 ore dopo l'ultimo trattamento, gli animali furono anestetizzati con uretano etilico (1,5 g/kg, i.p.). Il muscolo gastrocnemio venne quindi isolato e, senza interruzione della circolazione sanguigna, venne rapidamente prelevato per mezzo delle «Wollenberger clamps» (Wollenberger et al., 1960) preventivamente raffreddate in azoto liquido. Il muscolo prelevato venne mantenuto per 2 minuti immerso in azoto liquido.

Il muscolo così congelato venne polverizzato in Microdismembrator (Braun) mediante due passaggi di 45 secondi l'uno. Il muscolo polverizzato e congelato venne poi rapidamente pesato e diluito 1:10 con HC10₄ 0,6N al fine di ottenere una deproteinizzazione acida. Due passaggi di 1 minuto ciascuno in Ultra-Turrax (Ika-Werk) permisero una completa omogenizzazione. Dall'omogenato furono prelevati 0,2 ml, sottoposti poi a idrolisi enzimatica del glicogeno (Keppler e Decker, 1974).

L'omogenato non sottoposto ad idrolisi enzimatica fu centrifugato a 1500 g per 15 minuti; il surnatante venne neutralizzato a pH 6 con KHCO₃ 2M e ricentrifugato a 1500 g per altri 15 minuti. L'estratto così ottenuto, mantenuto alla temperatura di 0-4°C, fu immediatamente utilizzato per la determinazione di: glucosio 6-fosfato, glucosio, glicogeno (Bermeyer et al., 1974); piruvato (Passonneau e Lowry, 1974); lattato (Lowry e Passonneau, 1972b); citrato (Lowry e Passonneau, 1972a); alfa-chetoglutarato (Narins e Passonneau, 1974); malato (Lowry e Passonneau, 1972c); glutamato (Witt, 1974); L-alanina (Williamson, 1974); ioni ammonio (Kunt e Kearney, 1974); ATP e creatin-fosfato (Lamprecht et al., 1974); ADP e AMP (Jaworeck et al., 1974). La carica energetica potenziale (Atkinson, 1968) fu

espressa come: $([ATP] + 0.5 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$.

Le determinazioni di piruvato, alfa-chetoglutarato, lattato, citrato e malato furono effettuate mediante tecniche spettrofotofluorimetriche (Spettrofotofluorimetro Perkin Elmer 204-A), mentre i restanti metaboliti furono determinati mediante tecniche spettrofotometriche (Spettrofotometro Beckman 35).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta sui valori ottenuti dai lotti di ratti maschi trattati per 1, 2 e 4 settimane con UDPG, a tre diversi livelli di dose: 0,8; 2,0; 5,0 mg/kg i.p. pro die. Mediante l'analisi della varianza (ANOVA), è stato valutato l'effetto del fattore «dose», confrontando ogni lotto dei trattati con il lotto dei controlli per ciascuno dei 17 metaboliti ai diversi tempi. È stato inoltre valutato l'effetto del fattore «tempo», sia utilizzando l'ANOVA sia i tests di linearità per evidenziare eventuali correlazioni dose/tempo. Mediante l'analisi di classificazione multipla (MCA) si sono valutati gli effetti netti sui singoli metaboliti dovuti al fattore «tempo di osservazione» od al fattore «dose» (veicolo verso UDPG) utilizzando l'ETA²: ciò ha indicato la proporzione di variazione di ogni singolo metabolita attribuibile al fattore in causa.

Risultati

Le Tabelle 1, 2 e 3 riassumono i valori delle concentrazioni di alcuni metaboliti del muscolo gastrocnemio di ratti maschi, trattati con tre diverse dosi giornaliere (0,8; 2,0; 5,0 mg/kg i.p.) di UDPG per un periodo di 1, 2 o 4 settimane di trattamento.

L'analisi della varianza (ANOVA) condotta tra gruppi mette in risalto, come in generale, l'effetto farmacologico maggiore lo si registri alla seconda settimana di trattamento, mentre dopo 4 settimane non vi sono più differenze tra trattati e controlli, probabilmente per fenomeni farmaco-induttivi. Dopo una settimana di trattamento con UDPG alcuni effetti farmacologici sono presenti alla dose più alta; tuttavia, la signifi-

TABELLA 1 - Valutazioni sul muscolo gastrocnemio di ratti maschi delle concentrazioni di alcuni metaboliti glicolitici, intermedi del ciclo di Krebs, aminoacidi e mediatori di energia in condizioni di controllo e dopo 1 settimana di trattamento alle dosi 0,8 - 2,0 e 5,0 mg/kg i.p. pro die con u ridin-5'-difosfoglucoio. Le concentrazioni sono espresse per il glicogeno in $\mu\text{moli/g}$ di unità glicosidiche/g tessuto fresco, mentre per gli altri parametri sono espresse in $\mu\text{moli/g}$ tessuto fresco.

Metaboliti	Controlli	0,8 mg/kg	2,0 mg/kg	5,0 mg/kg
Glicogeno	37,498 \pm 3,528	39,578 \pm 4,180	35,532 \pm 2,480	38,036 \pm 3,938
Glucosio	1,276 \pm 0,104	1,363 \pm 0,084	1,317 \pm 0,075	1,284 \pm 0,054
Glucosio-6-fosfato	1,102 \pm 0,101	0,892 \pm 0,083	0,868 \pm 0,057	1,193 \pm 0,123
Piruvato	0,074 \pm 0,008	0,079 \pm 0,015	0,086 \pm 0,006	0,101 \pm 0,004**
Lattato	2,722 \pm 0,270	2,887 \pm 0,257	2,722 \pm 0,274	2,945 \pm 0,249
Lattato/Piruvato	44,299 \pm 10,923	50,301 \pm 13,796	34,091 \pm 5,104	29,824 \pm 2,878
Citrato	0,149 \pm 0,006	0,154 \pm 0,010	0,149 \pm 0,005	0,160 \pm 0,006
α -chetoglutarato	0,045 \pm 0,001	0,045 \pm 0,002	0,042 \pm 0,002	0,053 \pm 0,003*
Malato	0,122 \pm 0,006	0,113 \pm 0,006	0,124 \pm 0,011	0,133 \pm 0,006
Glutamato	1,471 \pm 0,078	1,646 \pm 0,089	1,706 \pm 0,127	1,744 \pm 0,073*
Alanina	1,268 \pm 0,056	1,297 \pm 0,065	1,381 \pm 0,053	1,375 \pm 0,049
Ione Ammonio	0,872 \pm 0,047	0,846 \pm 0,067	0,819 \pm 0,058	0,804 \pm 0,029
ATP	6,553 \pm 0,210	6,481 \pm 0,136	6,742 \pm 0,242	6,524 \pm 0,171
ADP	0,731 \pm 0,015	0,728 \pm 0,009	0,705 \pm 0,018	0,740 \pm 0,008
AMP	0,035 \pm 0,005	0,035 \pm 0,005	0,039 \pm 0,006	0,045 \pm 0,005
CP	19,244 \pm 0,731	19,072 \pm 0,820	19,215 \pm 0,641	19,620 \pm 0,590
E.C.P.	0,945 \pm 0,001	0,945 \pm 0,001	0,948 \pm 0,002	0,943 \pm 0,001

I risultati sono espressi come media \pm errore standard.

Le differenze tra gli animali di controllo e quelli trattati sono state effettuate con l'analisi della varianza (ANOVA): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

TABELLA 2 - Valutazioni sul muscolo gastrocnemio di ratti maschi delle concentrazioni di alcuni metaboliti glicolitici, intermedi del ciclo di Krebs, aminoacidi e mediatori di energia in condizioni di controllo e dopo 2 settimane di trattamento alle dosi 0,8 - 2,0 e 5,0 mg/kg i.p. pro die con u ridin-5'-difosfoglucosio.
Le concentrazioni sono espresse per il glicogeno in $\mu\text{moli di unit\`a glicosidiche/g}$ tessuto fresco, mentre per gli altri parametri sono espresse in $\mu\text{moli/g}$ tessuto fresco.

Metaboliti*	Controlli	0,8 mg/kg	2,0 mg/kg	5,0 mg/kg
Glicogeno	35,070 \pm 3,111	35,043 \pm 3,655	35,368 \pm 3,939	37,638 \pm 2,913
Glucosio	1,189 \pm 0,107	1,317 \pm 0,140	1,350 \pm 0,130	1,313 \pm 0,116
Glucosio-6-fosfato	0,925 \pm 0,148	1,234 \pm 0,092	1,337 \pm 0,091*	1,160 \pm 0,101
Piruvato	0,112 \pm 0,017	0,101 \pm 0,013	0,129 \pm 0,017	0,101 \pm 0,012
Lattato	3,135 \pm 0,273	3,444 \pm 0,291	3,457 \pm 0,381	2,791 \pm 0,199
Lattato/Piruvato	35,655 \pm 9,255	36,856 \pm 4,480	28,550 \pm 3,370	29,288 \pm 3,031
Citrato	0,116 \pm 0,011	0,150 \pm 0,005**	0,145 \pm 0,009*	0,148 \pm 0,007*
α -chetoglutarato	0,035 \pm 0,003	0,041 \pm 0,004	0,041 \pm 0,003	0,039 \pm 0,003
Malato	0,114 \pm 0,006	0,151 \pm 0,010**	0,146 \pm 0,009**	0,137 \pm 0,010*
Glutamato	1,330 \pm 0,121	1,313 \pm 0,078	1,211 \pm 0,100	1,398 \pm 0,130
Alanina	1,636 \pm 0,171	1,728 \pm 0,159	1,757 \pm 0,186	1,632 \pm 0,146
Ione Ammonio	0,850 \pm 0,063	0,755 \pm 0,071	0,750 \pm 0,059	0,731 \pm 0,057
ATP	6,936 \pm 0,276	6,580 \pm 0,426	6,454 \pm 0,524	6,484 \pm 0,439
ADP	0,758 \pm 0,027	0,749 \pm 0,012	0,724 \pm 0,012	0,704 \pm 0,023
AMP	0,037 \pm 0,010	0,031 \pm 0,006	0,035 \pm 0,005	0,041 \pm 0,007
CP	19,897 \pm 0,736	19,833 \pm 0,674	19,878 \pm 0,740	19,848 \pm 1,054
E.C.P.	0,944 \pm 0,004	0,942 \pm 0,005	0,940 \pm 0,009	0,949 \pm 0,002

I risultati sono espressi come media \pm errore standard.
Le differenze tra gli animali di controllo e quelli trattati sono state effettuate con l'analisi della varianza (ANOVA): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

TABELLA 3- Valutazioni sul muscolo gastrocnemio di ratti maschi delle concentrazioni di alcuni metaboliti glicolitici, intermedi del ciclo di Krebs, aminoacidi e mediatori di energia in condizioni di controllo e dopo 4 settimane di trattamento alle dosi 0,8 - 2,0 e 5,0 mg/kg i.p. pro die con uri din-5'-difosfoglicucosio.

Le concentrazioni sono espresse per il glicogeno in μ moli di unità glicosidiche/g tessuto fresco, mentre per gli altri parametri sono espresse in μ moli/g tessuto fresco.

Metaboliti	Controlli	0,8 mg/kg	2,0 mg/kg	5,0 mg/kg
Glicogeno	35,026 \pm 1,192	38,134 \pm 2,600	37,120 \pm 1,479	32,906 \pm 1,856
Glucosio	1,218 \pm 0,052	1,255 \pm 0,054	1,264 \pm 0,084	1,177 \pm 0,038
Glucosio-6-fosfato	1,048 \pm 0,129	1,184 \pm 0,103	1,003 \pm 0,091	1,125 \pm 0,061
Piruvato	0,092 \pm 0,006	0,108 \pm 0,012	0,100 \pm 0,008	0,101 \pm 0,013
Lattato	2,968 \pm 0,184	2,953 \pm 0,279	2,937 \pm 0,159	2,628 \pm 0,161
Lattato/Piruvato	33,275 \pm 2,958	27,954 \pm 1,552	30,269 \pm 2,613	27,852 \pm 2,639
Citrato	0,139 \pm 0,008	0,135 \pm 0,006	0,139 \pm 0,008	0,137 \pm 0,006
α -chetoglutarato	0,042 \pm 0,004	0,045 \pm 0,003	0,046 \pm 0,003	0,046 \pm 0,005
Malato	0,132 \pm 0,009	0,139 \pm 0,012	0,135 \pm 0,007	0,129 \pm 0,005
Glutamato	1,482 \pm 0,075	1,417 \pm 0,079	1,527 \pm 0,113	1,573 \pm 0,090
Alanina	1,363 \pm 0,071	1,392 \pm 0,113	1,330 \pm 0,118	1,412 \pm 0,115
Ione Ammonio	0,500 \pm 0,032	0,574 \pm 0,060	0,480 \pm 0,049	0,478 \pm 0,044
ATP	7,054 \pm 0,235	6,475 \pm 0,323	6,465 \pm 0,288	6,582 \pm 0,337
ADP	0,760 \pm 0,022	0,773 \pm 0,023	0,745 \pm 0,015	0,728 \pm 0,015
AMP	0,040 \pm 0,005	0,043 \pm 0,004	0,042 \pm 0,006	0,045 \pm 0,007
CP	18,886 \pm 0,885	19,299 \pm 0,379	19,139 \pm 0,595	19,392 \pm 0,758
E.C.P.	0,945 \pm 0,003	0,940 \pm 0,002	0,941 \pm 0,002	0,944 \pm 0,003

I risultati sono espressi come media + errore standard.

Le differenze tra gli animali di controllo e quelli trattati sono state effettuate con l'analisi della varianza (ANOVA): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

cattività dei tests di linearità fa supporre come probabili alcune azioni additive dose-dipendenti. Complementando l'ANOVA con il calcolo dell'MCA e dell'ETA², si è valutato di quanto l'effetto dell'UDPG sui metaboliti muscolari si sovrapponga alle loro eventuali variazioni temporali di tipo cronobiologico: ciò si è attuato sia analizzando l'interazione tra i fattori « dose » e « tempo », sia valutando separatamente gli effetti. Si è così rilevato che l'incidenza del fattore « dose » di UDPG non è molto marcata (l'ETA² per la dose non supera mai il 10%) mentre il fattore « tempo di osservazione » ha un notevole peso (l'ETA² può raggiungere anche il 50%!).

Tra i metaboliti della glicolisi anaerobica, due in particolare sono degni di attenzione: il piruvato e il glucosio 6-fosfato. Il primo, dopo una settimana di trattamento con UDPG, mostra un aumento correlato linearmente alla dose ($P < 0.05$), sebbene la concentrazione muscolare del metabolita nei trattati risulti significativamente diversa dai controlli ($P < 0.01$) solo alla dose più alta, rispetto ai valori della prima settimana di somministrazione di UDPG, con scomparsa degli effetti dopo 4 settimane. L'importanza delle variazioni temporali è dimostrata dal valore dell'ETA² che è alto per il fattore « tempo » (17%) e basso per il fattore « dose » (2%). È quindi ipotizzabile l'intervento di eventi di tipo cronobiologico. Il glucosio 6-fosfato presenta anch'esso il medesimo andamento temporale con valori di concentrazione muscolare più alti alla seconda settimana di trattamento rispetto a quelli riscontrati alla prima ($P < 0.01$), con scomparsa del fenomeno dopo quattro settimane di trattamento. Questo comportamento è limitato solo alle dosi di 0,8 (dove anche il test di linearità è significativo: $P < 0.05$) e 2,0 mg/kg i.p. In quest'ultimo caso l'aumento dei valori di concentrazione muscolare del glucosio 6-fosfato indotto dall'UDPG alla seconda settimana è significativamente diverso anche dai controlli ($P < 0.05$).

L'alfa-chetoglutarato, il citrato ed il malato sono i tre metaboliti del ciclo di Krebs presi in esame. Per l'alfa-che-

toglutarato, dopo una settimana di trattamento con UDPG, si evidenzia una relazione lineare dose-dipendente ($P < 0.05$) sebbene (come per il piruvato) la differenza dei valori di concentrazione muscolare nei ratti di controllo rispetto a quelli dei trattati si abbia solo per la dose più alta ($P < 0.05$). Le variazioni in funzione del « tempo » (ETA² = 11%) si hanno sia per i ratti di controllo che per quelli trattati con 5,0 mg/kg i.p., con una diminuzione alla seconda settimana in entrambi i casi ($P < 0.01$). Dopo due settimane di trattamento con UDPG, citrato e malato mostrano, anche se a livelli diversi di significatività (vedi Tabella 2), differenze significative dai controlli a tutte e tre le dosi saggiate: inoltre, il test di linearità ha evidenziato ($P < 0.05$) per il solo citrato una relazione lineare dose-dipendente (ETA² = 5%). Più complesse sono risultate per il citrato le influenze delle variazioni temporali (ETA² = 11%): solo i controlli mostrano una diminuzione alla seconda settimana ($P < 0.01$), con il ritorno ai valori basali dopo 4 settimane. Nel complesso, la concentrazione muscolare del metabolita tende a diminuire col passare del tempo di osservazione, mostrando una relazione lineare col « tempo » sia per i ratti trattati con 0,8 mg/kg i.p. ($P < 0.05$) sia per quelli trattati con 5,0 mg/kg i.p. ($P < 0.01$). Per il malato, l'MCA non ha evidenziato differenze notevoli tra il fattore « tempo » (ETA² = 6%) ed il fattore « dose » (ETA² = 4%).

Per quanto riguarda il metabolismo degli amminoacidi, una settimana di trattamento con UDPG ha indotto un aumento delle concentrazioni muscolari di glutamato ($P < 0.05$) alla dose più alta, con una significativa relazione lineare dose-dipendente ($P < 0.05$). Lo ione ammonio diminuisce sia nei controlli sia nei trattati in maniera lineare ($P < 0.01$) in funzione del tempo di osservazione, segno di un pesante effetto da parte del fattore « tempo » (ETA² = 49%) probabilmente legato a modificazioni cronobiologiche: assai minore è l'effetto del fattore « dose » (ETA² = 2%). Anche la concentrazione muscolare di alanina mostra, come per altri metaboliti, delle mo-

dificazioni di tipo cronobiologico con un aumento alla seconda settimana di osservazione ($P < 0.05$) sia nei controlli sia nei trattati con 0,8 e 2,0 mg/kg i.p., con un effetto del fattore « dose » ($ETA^2 = 24\%$).

Sul metabolismo energetico, infine, non si sono riscontrate variazioni degne di nota, anche se alla seconda settimana il test di linearità è risultato significativo ($P < 0.05$) per l'ADP.

Discussione

Il ruolo biologico dell'UDPG è sostanzialmente legato all'incremento dell'incorporazione di glucosio nel glicogeno (Leloir e Cardini, 1957; Nigam, 1967; Villar-Pelosi et al., 1966; Bianco e Mantovani, 1974b; Cova, 1974). Altre osservazioni riguardano la caratterizzazione dell'UDPG sia quale fattore di stimolo per l'attività dell'enzima glicogenosintasi (Mantia et al., 1968) sia quale fattore correlato con il metabolismo dell'ATP (Bianco e Mantovani, 1974a). Per quanto concerne il ricambio glucidico, il ruolo è stato definito soprattutto a livello epatico, mentre il nucleotide non è stato oggetto di studi particolari intesi ad indagare possibili interventi diretti sul metabolismo del muscolo scheletrico.

Gli effetti del trattamento con UDPG sul metabolismo energetico del muscolo scheletrico di ratti maschi sono stati da noi studiati in relazione sia al fattore « dose » (0,8; 2,0; 5,0 mg/kg i.p.) sia al fattore « tempo di osservazione » (trattamenti di 1, 2 e 4 settimane alle tre dosi).

Per quanto riguarda il fattore « dose », la somministrazione di UDPG, alle diverse dosi saggiate, determina alcune variazioni nel muscolo gastrocnemio di ratto principalmente a livello del ciclo di Krebs. Tale evenienza si attua soprat-

tutto dopo due settimane di trattamento e riguarda fundamentalmente il citrato ed il malato, le cui concentrazioni sono significativamente aumentate da tutte e tre le dosi saggiate. Dopo una settimana di trattamento, invece, le modeste variazioni osservate sono state determinate solo dalla dose maggiore saggiata (5,0 mg/kg i.p.). Dopo 4 settimane di trattamento, alle tre diverse dosi saggiate, si osserva una totale mancanza di risposta farmacologica. Ciò fa supporre l'insorgenza di meccanismi farmaco-induttivi tempo-dipendenti, atti ad interferire con il metabolismo dell'UDPG e con la risposta farmacologica.

Per quanto riguarda il fattore « tempo di osservazione » le variazioni riscontrate interessano, anche in questo caso, soprattutto il ciclo di Krebs ed, in misura largamente minore, il metabolismo aminoacidico. Indipendentemente dal trattamento farmacologico (ma anche durante lo stesso) si notano delle significative oscillazioni globali e parallele del contenuto muscolare di molti metaboliti: piruvato, alfa-chetoglutarato, citrato, glutamato, ione ammonio, ecc. Questa osservazione è di notevole interesse pratico perché evidenzia la presenza di ampie variazioni cronobiologiche nella disponibilità di metaboliti muscolari e quindi nella funzionalità dei sistemi biochimici che sono ad essi correlati e che svolgono un ruolo fondamentale nei processi di liberazione di energia, come la via glicolitica anaerobica, il ciclo di Krebs e gli interrelati rapporti con il metabolismo degli aminoacidi. Se confermate anche nell'uomo e negli atleti in particolare, queste variazioni cronobiologiche possono rappresentare la base biologica delle variazioni « spontanee » del rendimento degli atleti in assenza di altre componenti identificabili soggettivamente od obiettivamente.

Indirizzo degli Autori:

*Prof. GianMartino Benzi
Istituto di Farmacologia
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Università di Pavia
Piazza Botta, 11
27100 Pavia*

BIBLIOGRAFIA

- Atkinson D.E.: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7 (11), 4030-4034 (1968).
- Bergmeyer H.U., Bernst E., Schmidt F. and Stork H.: D-glucose. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Bergmeyer H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 3, pp. 1196-1201. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Bianco A. and Mantovani E.: Effetti del pretrattamento con UDPG sul fegato isolato perfuso di ratto. *Atti Accad. Med. Lomb.*, XXIX, 161-163 (1974a).
- Bianco A. and Mantovani E.: Effetti del pretrattamento con UDPG sul contenuto in glicogeno epatico nel ratto. *Atti Accad. Med. Lomb.*, XXIX, 179-181 (1974b).
- Chiesara E., Bilone F., Cova D., Marabini L. and Morini M.: Influsso dell'uridindifosfoglucosio (UDPG) sull'attività farmacometabolica di enzimi microsomiali epatici. *Riv. Farmacol. Ter.*, XI, 103-111 (1980).
- Cova D.: Effetto dell'uridin-dofosfato-glucosio sulla glicogeno-sintesi negli omogenati di fegato di piccione. *Atti Accad. Med. Lomb.*, XXIX, 183-184 (1974).
- Galatulas I. and Montanari P.: Effect of pretreatment with UDPG on acute toxicity of paracetamol in mice. *IRCS*, 4, 92 (1976).
- Jaworek D., Gruber W. and Bergmeyer H.U.: Adenosine-5'-diphosphate and Adenosine-5'-monophosphate. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 4, pp. 2127-2131. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Kepler D. and Decker K.: Glycogen. Determination with amyloglucosidase. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 3, pp. 1127-1131. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Klinger R. and Chimenti A.: Azione protettiva dell'UDPG nel ratto in condizioni di steatosi epatica da alcool e di necrosi epatica da bromo-benzene. *Medna int.*, 8 bis, 13-14 (1967).
- Kun E. and Kearney E.B.: Ammonia. In Bergmeyer H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 4, pp. 1801-1806. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Lamprecht W., Stein P., Henz F. and Weisser H.: Creatine phosphate. Determination with creatine kinase, hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Bergmeyer H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 4, pp. 1777-1785. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Leloir L.F. and Cardini C.E.: Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 6340-6341 (1957).
- Leloir L.F., Olavarria J.M., Goldenberg S.H. and Carminatti H.: Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Bioch. Biophys.*, 81, 508-520 (1969).
- Lowry O.H., Passonneau J.V.: A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press Inc., New York, San Francisco and London, 157-158 (1972a).
- Lowry O.H. and Passonneau J.V.: A Flexible system of enzymatic analysis. Academic Press Inc., New York, San Francisco and London, 194-199 (1972b).
- Lowry O.H. and Passonneau J.V.: A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press Inc., New York, San Francisco and London, 201-203 (1972c).
- Luganova I.S., Rozanova L.M. and Sejc I.F.: Respirazione, glicolisi e sintesi del glicogeno nel midollo osseo umano. *Biokhimiya (URSS)*, 29 (1), 22-29 (1964).
- Luganova I.S. and Sejc I.F.: Sintesi del glicogeno nei trombociti umani con la partecipazione dell'uridin-difosfoglucosio. *Vopr. Med. Khim.*, 9, 398-403 (1963).
- Mantia G., Hopps V., Leone F. and Consiglio D.: Influenza dell'uridin-5'-difosfoglucosio (UDPG) sulla rigenerazione epatica. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, XLIV (4), 260-262 (1968).
- Narins R.G. and Passonneau J.V.: 2-Oxoglutarate: fluorimetric determination. In Bergmeyer H.U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, vol. 3, pp. 1580-1584. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Nigam U.N.: Studies on glycogen synthesis in pigeon liver homogenates. Glycogen synthesis from glucose monophosphates and uridine diphosphate glucose. *Biochem. J.*, 105, 515-519 (1967).
- Okolicsányi L. and Scremin S.: Effect of uridine-diphosphate-glucose on liver glucuronyl transferase activity in normal and in fasting rats. *Enzyme*, 14, 366-371 (1972/73).
- Okolicsányi L., Vassanelli P., Asquini A. and Merigliano S.: Effetto dell'arterializzazione del fegato e del trattamento con uridin-difosfoglucosio sull'attività enzimatica glicuroniltrasferasica in ratti sottoposti a shunt porta-cava. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, LII, 475-479 (1976).
- Passonneau J.V. and Lowry O.H.: Pyruvate: Fluorimetric Assay. In Bergmeyer H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 3, pp. 1452-1456. Academic Press Ins., New York and London (1974).
- Scremin S., Asquini A. and Okolicsányi L.: Comportamento dell'enzima glicuroniltransferasi (GLT) epatico ed extraepatico sotto l'effetto del digiuno e di induttori enzimatici. 5th Intern. Symposium on Clinical Enzymology, Venezia, 659-668 (1973).
- Sonnino F.: Azione protettiva dell'uridin-difosfoglucosio nel corso dell'intossicazione sperimentale da tetracloruro di carbonio. *Medna int.*, 8 bis, 3-9 (1967).
- Storey I.D.E. and Dutton G.J.: Uridine compounds in glucuronic acid metabolism. *Biochem. J.*, 59, 279-288 (1955).
- Vagelli A.: Iperbilirubinemia da flutano nella cavia. Effetto protettivo dell'uridindifosfoglucosio. *Minerva Anestesiol.*, 40 (10), 494-497 (1974).
- Vagelli A.: Attività dell'UDPG nella steatosi epatica da flutano. *Minerva Anestesiol.*, 42, 185-189 (1975).
- Villar-Palasi C., Rosell-Perez M., Hizukuri S., Hujing F. and Larner J.: Muscle and liver UDP-glucose: α -1,4-glucan α -4-glucosyltransferase (glycogen synthetase) In Neufeld E.F. and

- Ginsburg V. (Eds.) *Methods in Enzymology*, 8 (64), pp. 374-384. Academic Press, New York (1966).
- Williamson D.H.: L-Alanine: Determination with alanine dehydrogenase. In Bergmeyer H.U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, vol. 4, pp. 1679-1682. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Witt I.: L-Glutamate: Determination with glutamate dehydrogenase and the 3-acetylpyridine analogue of NAD (APAD). In Bergmeyer H.U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*, vol. 4, pp. 1713-1715. Academic Press Inc. New York and London (1974).
- Wollenberger A., Ristau V. and Schoff G.: Eine einfache technik der extrem schnellen abkühlung größerer gerbestücke. *Pflügers Archiv.*, 270, 399-412 (1960).
- Zonta N., Mantovani E. and Bescapè F.: Effetti dell'uridina e dell'UDPG sull'epatite da galattosamine nel ratto. *Atti Accad. Med. Lomb.*, XXXI, 133-135 (1976).