

Clinica Chirurgica Generale e Terapia Chirurgica dell'Università di Messina
Direttore: Prof. *L. Carmona*
Cattedra di Tecnica e Diagnostica Istopatologica dell'Università di Messina
Direttore: Prof. *Ant. Ferrara*

VALUTAZIONE ISTOCHEMICA DELLA ATTIVITÀ'
GLUCOSO-6-FOSFATO DEIDROGENASICA
IN MUSCOLI SCHELETRICI UMANI DI CONIGLIO E DI RATTO

di

P. CALAPSO

F. SCALABRINO

Recenti ricerche istochimiche effettuate su muscoli scheletrici umani e di varie specie animali (mammiferi, uccelli, pesci), compiute da WACHSTEIN e MEISEL; NACHMIAS e PADYKULA; OGATA; DUBOWITZ e PEARSE; OGATA e MORI; hanno permesso di mettere in evidenza alcune particolarità di indubbio interesse, soprattutto per quanto si riferisce alla localizzazione di attività enzimatiche legate alla glicolisi anaerobia ed ai sistemi di ossido-riduzione delle fibre muscolari.

Un'osservazione di rilievo è rappresentata dalla constatazione che dette attività enzimatiche non si presentano uniformemente distribuite a livello delle fibre muscolari, in quanto alcune di esse reagiscono positivamente altre si presentano del tutto prive degli enzimi studiati.

Nella presente ricerca abbiamo voluto studiare il comportamento della glucoso-6-fosfatodeidrogenasi, nei muscoli scheletrici umani, di coniglio e di ratto, allo scopo di stabilire se anche le attività enzimatiche del ciclo dei pentoso fosfati (shunt ossidativo) fossero evidenziabili istochimicamente nelle strutture suddette e se presentassero le stesse particolarità di dislocazione, già osservata al riguardo di altri enzimi.

Metodiche.

Il materiale umano è stato prelevato nel corso di interventi chirurgici.

Quello sperimentale proveniva da prelievi biotici praticati in conigli e ratti allevati nel nostro Istituto.

Come per il materiale umano si ritagliavano cubetti di tessuto muscolare di circa $\frac{1}{2}$ cm di lato, da cui venivano ottenute fettine di 10-12 micron a mezzo di microtono congelatore, senza fissazione preliminare.

Sulle fettine, montate su coprioggetto, veniva eseguita la metodica di HESS, SCARPELLI e PEARSE, per la G-6-Fosfatodeidrogenasi, riportata nel trattato del PEARSE « Histochemistry » 1961. La metodica rivela l'attività enzimatica sotto forma di minuti granuli di formazano, la presenza di un tenue alone grigiastro non è segno di positività. Risultati.

1°) Muscoli scheletrici umani.

La positività alla reazione è uniformemente debole. Un attento esame permette tuttavia di notare che esistono fibre del tutto negative alla reazione, altre che presentano una debole positività ed altre ancora in cui la positività è, anche se di poco, più marcata. Si tratta di una diffusa sfumatura bluastra che interessa la totalità della massa sarcoplasmatica, con un'appena sensibile accentuazione a livello dell'endomisio. L'interstizio non partecipa alla reazione (Fig. 1).

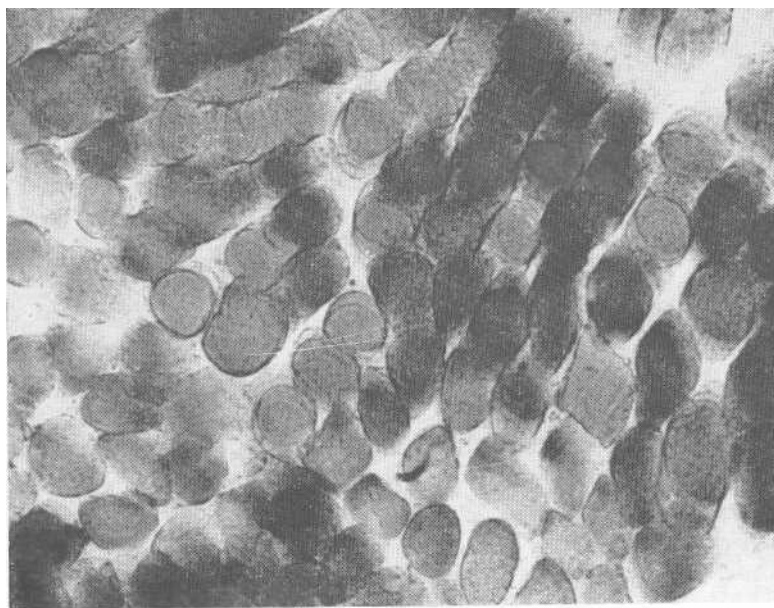


Fig. 1 - Muscolo scheletrico umano normale. G-6-fosfatodeidrogenasi. Positività uniformemente debole, ma sia pure con lievi differenze; di intensità diversa a livello delle varie fibre.

2°) Muscoli scheletrici di coniglio.

La positività è netta: si osservano come dimostrato dalle figure 2, 3 e 4 fibre del tutto negative, fibre a scarsa positività e fibre a positività intensa. La differenza nell'intensità di reazione è notevolissima, quale non è dato notare a proposito dei muscoli umani. Laddove l'intensità di reazione è massima si osserva una distribuzione

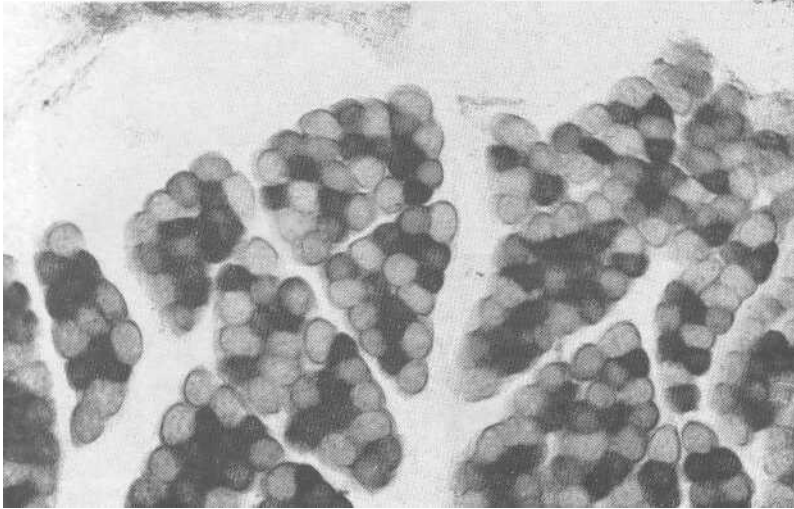


Fig. 2.

uniforme del colorante nella massa sarcoplasmatica dovuta probabilmente al sommarsi di numerosissimi granuli di formazano.

L'intensità si attenua alquanto nelle zone più centrali delle fibrocellule appartenenti a quelle fibre che hanno reazione intermedia, mentre solo un tenue anello di reazione marginale contorna le fibrocellule a reazione negativa.

Da segnalare ancora che la reazione di intensità massima coincide di solito con il più ridotto diametro trasverso della fibra e che sono proprio le fibre di maggior ampiezza a presentare reazione uniformemente negativa.

3°) Muscoli scheletrici di ratto.

La reazione è intensamente positiva a carico di alcune fibre, mentre altre si presentano del tutto negative.

E' stato possibile mettere in evidenza nel materiale in nostro pos-

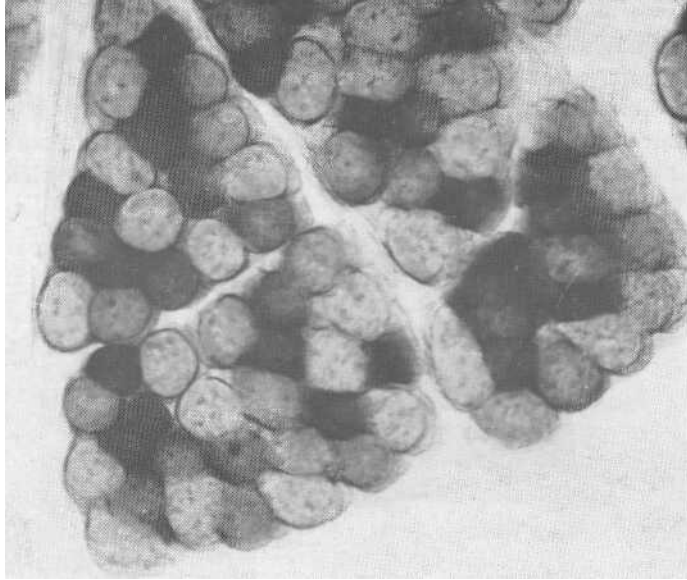


Fig. 3.



Fig. 4.

Figg. 2-3-4 - Muscolo scheletrico di coniglio normale. G-6-fosfatodeidrogenasi. Si noti la notevolissima differenza di intensità di reazione fra le varie fibre, di cui le più piccole sembrano più dotate di attività enzimatica.

nesso fibre ad intensità di reazione intermedia, come rilevato nelle fibre umane e di coniglio.

Anche in questo animale le fibre che risentono intensità di reazione massima sono quelle che hanno minore ampiezza di diametro trasverso.



Fig. 5 - Muscolo scheletrico di ratto normale. G-6-Fosfatodeidrogenasi. Si noti che alcune fibre sono intensamente positive, mentre altre sono sprovviste di attività enzimatica.

Discussione.

Come in precedenza accennato i dati esistenti in letteratura nel campo dell'istochimica enzimologica dei muscoli striati, si riferiscono al comportamento delle fosforilasi, degli enzimi legati ai processi di ossido-riduzione e di alcuni enzimi idrolitici. Studi accurati e del tutto recenti sono stati condotti da OGATA; da DUBOWITZ e PEARSE e da OGATA e MORI.

Questi AA. sono arrivati unanimemente alla conclusione che le fibre più piccole (corrispondenti alle fibre rosse dei vecchi ricercatori) sono ricche di attività enzimatiche legate ai processi di ossido-riduzione e di idrolisi, ma prive di attività fosforilasica, mentre l'inverso accade in quelle di maggior diametro (fibre bianche).

L'interpretazione di questi dati, senza dubbio non priva di dif-

ficoltà, presenta, secondo i citati AA., due fondamentali ipotesi esplicative.

La prima si fonda sulla considerazione che tanto la glicolisi anaerobia, quanto il ciclo di Krebs, rappresentano due fasi fra di loro strettamente connesse, del metabolismo degli idrati di carbonio a partire dal glicogene o dal glucosio; pertanto si potrebbe ammettere che le variazioni di dislocazione delle attività enzimatiche osservate, corrispondano a due differenti stadi di attività delle medesime fibre, che, a seconda delle esigenze, si servirebbero prevalentemente dell'uno o dell'altro ciclo glicolitico.

La seconda ipotesi, condivisa dagli AA. su citati, ammette l'esistenza di due differenti tipi di fibre; quelle di maggior diametro, deputate alle contrazioni più rapide ma meno prolungate, utilizzerebbero l'immediato apporto di energia derivante da una accentuata glicolisi anerobia, (risultando così ricche di fosforilasi), quelle più piccole, che si contrarrebbero meno rapidamente, ma per periodi di tempo più lunghi, utilizzerebbero l'energia liberatasi dal ciclo di Krebs, risultando così dotate in particolar misura degli enzimi legati a tale ciclo.

Secondo OGATA, inoltre, esisterebbero in realtà tre tipi di fibre, in rapporto alle attività succinodidrogenasica, citocromossidasi e DPN e TPN diaforasi.

Le grandi fibre bianche, quasi prive delle suddette attività enzimatiche, le piccole, rosse, intensamente positive e fibre intermedie tanto per diametro che per attività enzimatiche.

Per quanto si riferisce in particolare alla G-6-fosfatodeidrogenasi, l'unico dato istochimico che ci è stato possibile rintracciare in letteratura è quello offerto da DUBOWITZ e PEARSE (1961), che si riferisce solo a materiale umano.

Gli AA. che peraltro trattano questo argomento solo di sfuggita, sostengono che una attività G-6-fosfatodeidrogenasica è rilevabile istochimicamente nei muscoli umani, che la sua dislocazione ripete quella degli enzimi ossido-riduttivi di cui si è detto e non osservano variazioni degne di nota in casi patologici.

I nostri risultati ci permettono di affermare che altri mammiferi, oltre che l'uomo, posseggono normalmente una attività glucoso-6-fosfato-deidrogenasica a livello dei muscoli scheletrici e che nel ratto e, soprattutto nel coniglio, tale attività si rivela di gran lunga più intensa che nell'uomo, ma tale attività, anche nei nostri preparati è sempre istochimicamente riferibile ad alcune fibre muscolari, mentre altre risultano solo debolmente, ovvero del tutto negative.

Nell'uomo tale differenziazione appare meno netta.

Non riteniamo poterci accostare all'una od all'altra delle ipotesi precedentemente esposte circa il significato della diversa dislocazione

delle varie attività enzimatiche nelle fibre dei muscoli scheletrici (fibre bianche e fibre rosse), anche se, dai dati esposti, risulta che le fibre di minor diametro presentano il maggior grado di intensità. E questo perché in primo luogo abbiamo studiato un solo enzima, venendoci così a mancare i termini di paragone in possesso di DUBOWITZ e PEARSE, in secondo luogo perché, alcuni risultati da noi stessi ottenuti in campo patologico e che saranno oggetto di una successiva nota, ci hanno fatto sorgere non poche perplessità circa una rigida e netta distinzione, anche in campo metabolico, dei due tipi di fibre, bianche e rosse.

Non riteniamo pertanto potere escludere che le differenze di comportamento evidenziate da noi e da altri AA., fra le diverse fibre di uno stesso muscolo, di fronte alle reazioni istochimiche adoperate, possano rappresentare solo differenti stati funzionali, alternantisi in fibre — diverse per molti aspetti —, ma non altrettanto nettamente dissimili sul piano metabolico.

Ci sembra comunque interessante osservare come anche a livello del metabolismo muscolare lo shunt ossidativo (di cui la G-6-fosfatodeidrogenasi catalizza la prima tappa), si inserisca attivamente quale via alternativa della glicolisi anaerobia.

Lo shunt, come è noto, permette l'ossidazione diretta del glucosio-6-fosfato, indipendentemente dalla formazione di piruvato e del consecutivo inserimento di tale composto nel ciclo di Krebs.

I vantaggi che derivano dalla utilizzazione dello shunt ossidativo sono molteplici: vogliamo in questa sede sottolineare solo che è ormai unanimemente accettato il principio secondo cui questa via metabolica degli idrati di carbonio è in grado di mettere a disposizione della cellula un potenziale energetico, sotto forma di ATP, eguale a quello che si libera attraverso il ciclo di Krebs, e nel corso delle reazioni metaboliche legate alla glicolisi anaerobia, ma in maniera molto più rapida (SCOTT e COHEN; MORUZZI).

Di interesse notevole ci sembra inoltre l'ipotesi avanzata da CARLSON e PERNOU (1959), secondo cui le fibre muscolari potrebbero trarre fonte di energia, anche dal metabolismo lipidico.

Ora è noto (ROSSI e ZATTI; BONSIGNORE e Coll.) che il ciclo dei pentoso-fosfati può rappresentare un punto di convergenza nel metabolismo protidico e lipidico.

Pertanto, anche quando la fosforilazione ossidativa, che rappresenta la fonte di energia legata al ciclo degli acidi tricarbossilici (ciclo di Krebs), fosse, in condizioni fisiologiche o patologiche, ridotta, la cellula può essere in grado di garantirsi il necessario potenziale energetico servendosi in via alternativa dello shunt ossidativo oltre che accelerando la glicolisi anaerobia.

Ora una condizione del genere si verifica normalmente a livello

del tessuto muscolare, ed in particolare di quello scheletrico, stante che le sue esigenze di energia ad alto livello sono sempre elevate mentre il ciclo di Krebs non appare tanto attivo da potergliele garantire in pieno (ZAPPI e coll.).

Alla luce di quanto esposto i dati in nostro possesso ci permettono di avanzare l'ipotesi che le fibre muscolari scheletriche, ed in particolare quelle del coniglio e del ratto, possano, sia in condizioni normali, sia in determinate condizioni, di emergenza, servirsi, oltre che delle note fonti di energia, anche di quelle derivanti dalla ossidazione diretta del glucoso-6-fosfato, attraverso lo shunt ossidativo.

Di indubbio interesse sarebbe valutare il comportamento della glucoso-6-fosfatodeidrogenasi in determinate condizioni patologiche, tanto nell'animale da esperimento che nell'uomo.

Tale argomento è attualmente oggetto di studio da parte nostra e verrà trattato in successive note.

Riassunto

Gli AA. hanno studiato il comportamento della Glucoso-6-fosfatodeidrogenasi nei muscoli scheletrici umani, di coniglio e di ratto.

Vengono messe in evidenza le differenze di comportamento di tale attività enzimatica a livello delle strutture esaminate e si avanza una ipotesi interpretativa sul significato dell'enzima studiato in riferimento al metabolismo dei carboidrati nei muscoli scheletrici.

Résumé

Les AA. ont étudié le comportement de la glucose-6-phosphatodéhydrogénase dans les muscles squelettales humains, du lapin et du rat.

On a mis en évidence les différences de comportement de cette activité enzymatique au niveau des structures examinées et on donne une interprétation sur l'action de l'enzyme étudié par rapport au métabolisme des carbohydrates dans ces muscles.

Summary

The AA. have investigated the behaviour of the glucoso-6-phosphatodehydrogenase in the skeletal muscles of man, rabbit and rat.

Attention is called to the differences of behaviour of this enzymatic activity in the structures examined and a theory is given on the value of the enzyme for the carbohydrate metabolism in these muscles.

Zusammenfassung

Der Verff. haben das Benehmen der Glukose-6-Phosphatodehydrogenase in den Skelettmuskeln beim Menschen, beim Kaninchen und der Ratte untersucht.

Man weist auf die Unterschiede des Benehmens dieser Enzymaktivität in den beobachteten Strukturen hin und bringt eine Interpretierung über die Tätigkeit dieses Enzyms im Kohlenhydratmetabolismus der obgenannten Skelettmuskeln.

Bibliografia

- BONSIGNORE A. e Coll.: *ior. Biochim.*, 24, 207, 1955.
CARLSON L. A. e PERNOW B.: *J. Lab. clin. Med.*, 53, 833, 1959.
DUBOWITZ V. e PEARSE A. G.: *Histochemie*, 2, 105, 1960.
DUBOWITZ V. e PEARSE A. G.: *J. Path. & Bacteriol.*, 81, 363, 1961.
MORUZZI G. e Coll.: *Principi di Chimica Biologica*, Tintarelli, Bologna, 1963.
NACHMIAS V. T. e PADYKULAH. A.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 47, 1958.
OGATA T.: Citato da Dubowitz e Parse (1961).
OGATA T. e MORI M.: *J. Histochem. & Cytochem.*, 11, 645, 1963.
PEARSE A. G.: *Histochemistry-Churchill LDT*, London, 1961.
ROSSI P. e ZATTI M.: *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, 36, 1113, 1960.
SCOTT D. B. e COHENS S.: *J. Cell. Compt Physiol.*, 38, Suppl. 1, 173, 1951.
WACHSTEIN M. e MEISEL E.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1, 483, 1955.
WACHSTEIN M. e MEISEL E.: *Amer. J. Path.*, 31, 353, 1955.