
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

PIETRO MELCHIORRI

**Sintesi di acidi grassi radioattivi a partire da
acetil-1-Cu-CoA in sezioni di fegato di ratto rese
carenti in vitro del loro contenuto in CoA**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.2, p. 271–275.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_2_271_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Farmacologia. — *Sintesi di acidi grassi radioattivi a partire da acetil-1-C¹⁴-CoA in sezioni di fegato di ratto rese carenti in vitro del loro contenuto in CoA.* Nota di PIETRO MELCHIORRI, presentata (*) dal Corrisp. P. DI MATTEI.

SUMMARY. — Liver slices incubated in Ringer-Krebs-bicarbonate solution and repeatedly washed in the same fluid released about 60% of their content of CoA.

CoA free liver slices were unable to take up acetate 1-C¹⁴ into fatty acids at the same rate as normal slices did.

When these slices were incubated in presence of acetyl-1-C¹⁴ CoA, C¹⁴ labelled fatty acids were again synthesized. The uptake of radioactivity from the incubation fluid run parallel to the disappearing of CoA from the same fluid.

Thus CoA seems to permeate *in vitro* cell membrane of liver slices although this condition is obviously strictly dependent on the particular pretreatment of the slices.

La dimostrazione sperimentale della penetrazione del CoA esogeno attraverso la membrana cellulare e la sua partecipazione alle attività enzimatiche endocellulari offre diverse difficoltà sperimentali.

La difficoltà principale sorge dal fatto che a tutt'oggi non esiste in commercio un CoA uniformemente marcato con isotopi radioattivi (C¹⁴ o H³) tale da essere impiegato in esperimenti di diluizione isotopica al fine di comprovare o meno la sua penetrazione endocellulare, nè esistono tessuti nei quali si possa creare *in vivo* una carenza di CoA con una concomitante diminuzione di alcune attività enzimatiche collegato a questo coenzima.

Infatti, le esperienze con ratti alimentati con diete carenti in acido pantotenico non hanno fornito risultati concordanti in quanto la diminuzione del CoA endocellulare, anche in entità rimarchevoli, non si accompagna sempre con una diminuzione proporzionale della incorporazione dell'acetato nel colesterolo e negli acidi grassi, attività, com'è noto, catalizzata da questo coenzima. (Lipman e Klein [1]).

Inoltre, Lata e coll. [2] hanno addirittura osservato che in ratti alimentati da lungo tempo con diete carenti in ac. pantotenico l'attività sintetica del colesterolo e degli ac. grassi a partire dall'acetato era aumentata.

Nelle presenti ricerche si è messo a punto un metodo per privare *in vitro* sezioni di fegato di ratto del loro contenuto di CoA senza alterare l'attività respiratoria del tessuto, assunta quest'ultima funzione come misura della sopravvivenza cellulare durante tutta la durata dell'esperimento. In queste condizioni si è cercato di reintegrare il contenuto in CoA endocellulare aggiungendo al mezzo di incubazione del CoA esogeno e misurando la ripresa della attività sintetica delle frazioni di acidi grassi attraverso la incorporazione in esse di acetato-1-C¹⁴. In particolare si è paragonata l'incorporazione nei

(*) Nella seduta del 12 febbraio 1966.

lipidi dell'acetato radioattivo a partire dal solo acetato- $1-C^{14}$ con quella ottenuta a partire dall'acetil- $1-C^{14}$ -CoA in fette di tessuto epatico private *in vitro* del loro contenuto di CoA.

METODICA.

Fette di tessuto epatico di ratto dello spessore di 0,5 mm vennero incubate in Krebs-Ringer bicarbonato a pH 7,4 per 2^h, 30 a 37°C con 3 ricambi del liquido di incubazione seguiti da 3 lavaggi nello stesso liquido, ogni 45'. L'incubazione venne fatta in ambiente di CO₂ al 5% in O₂ e il consumo di ossigeno venne misurato con la tecnica di Warburg ogni 15'. Alla fine del periodo di incubazione ai soli campioni che mostrarono di non aver variato la loro attività respiratoria più di $\pm 20\%$ del valore registrato nei primi 45' di incubazione venne aggiunto acetato di sodio $1-C^{14}$ (100 μ C/campione) e, alternativamente acetil- $1-C^{14}$ -CoA (New England Co.) (100 μ C/campione).

Le attività specifiche molari dei due traccianti radioattivi vennero aggiustate mediante opportune aggiunte di carrier non radioattivi ai medesimi valori (0,1 μ C/ μ mole).

L'incorporazione dell'acetato- $1-C^{14}$ nei lipidi venne misurata con il metodo precedentemente descritto [3]. Le misure di radioattività vennero eseguite mediante scintillatore liquido a due canali della Soc. Italelettronica di Roma e il *quenching* venne calcolato mediante la tecnica dello standard interno (sol. benzenica di gliceril-tristearato C^{14} ottenuto dal Radiochemical Centre di Amersham).

Il CoA tissutale venne dosato con il metodo di Stadtman e coll. [4] basato sulla reazione fosfotransacetilasica tra acetilfosfato e CoA. Nel liquido di incubazione il CoA libero venne dosato con il metodo colorimetrico al nitroprussiato sec. Reisberg (1957) e l'acetilCoA venne calcolato per differenza dal coenzima A totale, meno il CoA libero, determinato con il metodo di Stadtman.

In tutte le esperienze con l'acetato radioattivo e con il Acetil- $1-C^{14}$ -CoA vennero aggiunti al mezzo di incubazione come carrier non radioattivi acetato di Na (Merck) e acetil-CoA (Sigma) alle concentrazioni specificate.

RISULTATI.

La Tabella I mostra i risultati ottenuti dal dosaggio del CoA tissutale nelle sezioni di fegato sottoposto all'incubazione e in quelle che vennero successivamente incubate in presenza di CoA non radioattivo. In queste ultime il contenuto di CoA venne calcolato sia direttamente che per differenza da quello che era stato aggiunto nel mezzo di incubazione all'inizio dell'esperimento mediante dosaggio del CoA totale nel liquido di incubazione alla fine della incubazione stessa. È curioso notare che l'arricchimento in CoA delle sezioni

TABELLA I.

Influenza della incubazione in Krebs-Ringer bicarbonato e dei lavaggi nello stesso liquido sul contenuto di CoA di sezioni di fegato di ratto e reintegrazione di questo contenuto per opera di aggiunte di CoA esogeno nel mezzo di incubazione.

Camp. No	CoA tessutale prima della incubazione γ/g	CoA tessutale dopo incubazione γ/g	Differenza %	CoA aggiunto al liquido γ/g	CoA tessutale dopo reintegrazione γ/g
1	69,6	17,6	— 74,7	—	—
2	89,4	43,0	— 51,9	—	—
3	91,2	40,6	— 55,4	—	—
4	67,4	13,8	— 79,5	—	—
5	79,2	32,4	— 59,1	—	—
6	66,6	24,4	— 63,4	36,0	60,4
7	70,0	23,0	— 67,1	37,3	60,3
8	63,3	23,4	— 63,0	37,2	60,6
9	75,0	23,0	— 72,0	48,5	71,5
<i>Medie</i>	74,6	26,8	— 65,1		63,2

TABELLA II.

Biosintesi degli acidi grassi totali radioattivi a partire da acetato C^{14} e da acetil- $I-C^{14}$ -CoA in sezioni di fegato normali e carenti in CoA.

(Percentuale di radioattività introdotta sotto forma di acetato C^{14} e ritrovata in ac. grassi).

Camp. No	Fegato normale da acetato- $I-C^{14}$	Fegato carente in CoA da acetato- $I-C^{14}$	Differenza %	Fegato carente in CoA da acetil- $I-C^{14}$ -coenzima A	Differenza %
1	0,586	0,400	— 31,7	0,480	— 18
2	2,152	0,268	— 87,5	1,715	— 20
3	0,365	0,293	— 19,7	0,310	— 2
4	0,412	0,432	+ 4,8	0,464	+ 12
5	0,455	0,214	— 53,0	0,508	+ 13
6	3,200	0,720	— 77,5	2,200	— 32
7	5,050	0,270	— 94,1	3,950	— 21
8	3,730	2,380	— 36,1	3,300	— 12
9	1,000	1,070	+ 7,0	1,100	+ 10
10	1,800	0,945	— 47,5	1,763	— 2
<i>Medie</i>	1,875	0,699	— 62	1,580	— 7

di tessuto è, nei limiti di errore del metodo, proporzionale alla quantità in precedenza perduta sicché nelle sezioni si trova alla fine la stessa quantità di CoA che si trovava all'inizio dell'esperimento.

La Tabella II mostra i risultati ottenuti nelle esperienze di incorporazione delle fette di tessuto epatico private di CoA con acetato- $1-C^{14}$ e con acetil- $1-C^{14}$ -CoA. Si può notare che l'attività biosintetica è minima a partire dall'acetato, se le fette sono state private del loro contenuto in CoA, ma riprende rapidamente se si incubano in presenza di acetil- $1-C^{14}$ -CoA.

TABELLA III.

Variatione del contenuto di CoA e in radioattività totale nei liquidi biologici di incubazione di sezioni di fegato carenti in CoA dopo incubazione con acetil- $1-C^{14}$ -CoA.

Campioni N°	CoA nel liquido dopo incubazione Diminuzione%	Radioattività nel liquido dopo incubazione Diminuzione%
1	— 45	— 43
2	— 31	— 29
3	— 22	— 21
4	— 64	— 65
5	— 55	— 51
6	— 76	— 77
7	— 38	— 31
8	— 42	— 40
9	— 61	— 62
10	— 22	— 15
<i>Medie</i>	— 46	— 43

Nella Tabella III si può vedere che il calo del contenuto di CoA nei liquidi di incubazione alla fine del periodo di esperimento è proporzionale al calo della radioattività. Ciò evidentemente significa che l'acetil CoA penetra endocellularmente e cede l'acetato $1-C^{14}$ nei processi di acetilazione endocellulari in quantità proporzionale alla sua captazione.

CONCLUSIONE.

Dai risultati ottenuti si può concludere che il CoA e l'acetilCoA penetrano nelle cellule di sezioni di fegato di ratto quando queste siano private di una parte del loro contenuto in CoA mediante preincubazione e lavaggio in Krebs-Ringer bicarbonato.

Mediante la tecnica impiegata, l'esperimento dimostra la penetrazione del CoA nell'interno delle cellule che ne sono carenti purché mantenute in condizioni di normale attività respiratoria.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] F. LIPMANN e H. P. KLEIN, « J. Biol. Chem. », 203, 101 (1954).
- [2] G. F. LATA e E. ANDERSON, « Arch. Biochem. Biophys. », 53, 519 (1954).
- [3] I. L. CHAIKOFF e S. HOTTA, « J. Biol. Chem. », 198, 895 (1952).
- [4] E. R. STADTMAN, G. D. NOVELLI e F. LIPMANN, « J. Biol. Chem. », 191, 365 (1951).