

## Informations - Informationen - Informazioni - Notes

### STUDIORUM PROGRESSUS

#### **Attività enolasica del plasma e del fegato nell'epatite sperimentale da virus MHV-3 Craig**

Di F. DE RITIS, M. COLTORTI e G. GIUSTI\*

Nostre precedenti ricerche hanno dimostrato che nell'epatite sperimentale da virus MHV-3 Craig si verifica il passaggio in circolo dai focolai di necrosi epatica, di numerosi enzimi, normalmente presenti in scarsa misura od assenti nel plasma: transaminasi aspartico-chetoglutarico ed alanina-chetoglutarico, fosfoglicomutasi, fumarasi, alcool-deidrogenasi, glutammico-deidrogenasi, fosforilasi<sup>1-4</sup>.

L'estensione delle ricerche sulla «sindrome enzimoplasmatica» dell'infezione sperimentale da virus MHV-3 era giustificata dall'interesse di stabilire una comparazione con le variazioni enzimatiche plasmatiche osservate nell'epatite virale umana, alla cui conoscenza sono stati apportati molteplici contributi da noi e da altri ricercatori<sup>5-17</sup>, in considerazione delle notevoli analogie patogenetiche ed anatomico-patologiche fra queste due malattie epatonecrotiche.

Le precedenti osservazioni dell'aumento nel plasma di diverse attività della glicolisi in condizioni di necrosi epatica virale o tossica (aldolasi, fosfoesosoisomerasi,

fosfoglicomutasi<sup>8, 9, 13-16, 18-20</sup>), ci ha fatto ritenere opportuno prendere in considerazione il comportamento dell'attività enolasica.

Alcuni dei fattori capaci di interferire nel determinismo del passaggio in circolo di enzimi dalla cellule lese, consistono presumibilmente nelle caratteristiche di solubilità, nelle dimensioni molecolari, nella localizzazione nelle varie strutture cellulari. Gli enzimi del ciclo di Embden-Meyerhof sono solubili: essi sono stati tutti studiati originariamente in estratti acquosi di tessuti e sono stati riscontrati pressoché interamente nella frazione solubile del citoplasma (SCHNEIDER<sup>21</sup>).

L'enolasi, com'è noto, catalizza la reazione che conduce alla conversione reversibile dell'acido 2-fosfoglicerico in acido fosfoenolpiruvico: D-2-PGA  $\rightleftharpoons$  PEP + H<sub>2</sub>O.

Contemporaneamente allo studio dell'attività enolasica nel plasma, abbiamo ritenuto opportuno indagare circa il comportamento della stessa attività enzimatica a livello del tessuto epatico, dal quale era logico ammettere che derivasse la quota di enzima responsabile dell'aumento dell'attività enzimatica plasmatica.

Inoltre, allo scopo di accertarci sè le variazioni di tale attività a livello del plasma nel corso della infezione dipendessero effettivamente dalla cessione e dal passaggio in circolo di molecole enzimatiche, e non di effettori o fattori coenzimatici capaci di attivare una eventuale quota di enzima presente nel plasma in forma inattiva, abbiamo condotto esperienze in cui l'attività enolasica del plasma di animali normali veniva saggiazzata anche in presenza di estratto bollito di fegato, di per sé enzimaticamente inattivo.

**Materiali e metodi.** Topi bianchi del peso medio di 20 g, tenuti a dieta di VOGT e MÖLLER adeguatamente supplementata, sono stati infettati per via intraperitoneale con 100 LD<sub>50</sub> di virus MHV-3 Craig<sup>22</sup>.

Con tale modalità si determina una infezione sicuramente letale a rapida evoluzione, con morte degli animali tra la 72° e la 120° h. Gruppi di 3-4 animali sono stati sacrificati dopo 24, 48, 72, 96 h dall'infezione. Sui campioni di plasma ottenuti dai rispettivi pools di sangue raccolti in provette eparinizzate e sul sopranatante di omogenati di tessuto epatico al 2% in H<sub>2</sub>O, eseguiti in apparecchi di Potter-Elvehjem di vetro a temperatura di ghiaccio fondente e quindi centrifugati per 5 min a 2000 r.p.m., l'attività enolasica è stata saggiazzata secondo la seguente metodica.

Puffer di glicocolla-NaOH 0,1 mol a pH 7,4 . . . ml 1,00  
Acido D-2-fosfoglicerico 0,01 mol<sup>23</sup> . . . . . ml 1,00

<sup>18</sup> F. M. BRUNS e J. NEUHAUS, Arch. Biochem. Biophys. 55, 588 (1955).

<sup>19</sup> M. COLTORTI e G. GIUSTI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 32, 384 (1956).

<sup>20</sup> G. GIUSTI, M. COLTORTI e A. DI SIMONE, Rass. Fisiop. Clin. Ter. 30, 49 (1958).

<sup>21</sup> W. C. SCHNEIDER, 3° Congr. Internaz. di Biochimica, Bruxelles 1955, Atti, p. 143.

<sup>22</sup> Gentilmente fornito dal Dr. A. W. GLEDHILL, del National Institute for Medical Research, London.

<sup>23</sup> Acido d (+)-2-fosfoglicerico, sale di bario (Boehringer), trasformato in sale di sodio, neutralizzato e conservato a -15° fino al momento dell'uso.

\* Istituto di patologia speciale medica e metodologia clinica dell'università di Napoli.

<sup>1</sup> F. DE RITIS, M. COLTORTI e G. GIUSTI, Science 124, 32 (1956).

<sup>2</sup> F. DE RITIS, M. COLTORTI e G. GIUSTI, J. Infect. Dis. 101, 219 (1957).

<sup>3</sup> F. DE RITIS, M. COLTORTI e G. GIUSTI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 32, 1557 (1956).

<sup>4</sup> F. DE RITIS, M. COLTORTI, G. GIUSTI e L. MALLUCCI, Boll. Ist. Sier. Mil. 36, 548 (1957).

<sup>5</sup> F. DE RITIS, M. COLTORTI e G. GIUSTI, Minerva Med. 46-I, 1207 (1955); 47-I, 167 (1956); Clin. Chim. Acta 2, 70 (1957).

<sup>6</sup> F. DE RITIS, G. GIUSTI e M. COLTORTI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 32, 386 (1956); Exper. 13, 81 (1957); Minerva Med. 48, 1598 (1957).

<sup>7</sup> F. DE RITIS, G. GIUSTI e M. COLTORTI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 32, 642 (1956).

<sup>8</sup> F. M. BRUNS e W. PULS, Klin. Wschr. 32, 656 (1954).

<sup>9</sup> F. M. BRUNS e W. JAKOB, Klin. Wschr. 32, 1041 (1954).

<sup>10</sup> F. WRÓBLEWSKI e J. S. LADUE, Ann. Int. Med. 43, 345 (1955); Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 569 (1956); Ann. Int. Med. 45, 782, 801 (1956).

<sup>11</sup> F. WRÓBLEWSKI e J. S. LADUE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90, 210 (1955).

<sup>12</sup> E. SCHMIDT, F. W. SCHMIDT e E. WILDHIRT, Klin. Wochenschr. 36, 280 (1958).

<sup>13</sup> K. M. HSIEH e H. T. BLUMENTHAL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 626 (1956).

<sup>14</sup> R. J. BING, A. CASTELLANOS e A. SIEGEL, J. Amer. med. Assoc. 164, 647 (1957).

<sup>15</sup> J. A. SIBLEY e G. A. FLEISHER, Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 29, 591 (1954).

<sup>16</sup> B. HESSE e E. GEHM, Klin. Wschr. 33, 91 (1955).

<sup>17</sup> V. GERLACH, Klin. Wschr. 35, 1144 (1957).

MgSO <sub>4</sub> 0,016 mol . . . . .	ml 0,50
Plasma . . . . .	ml 0,20
oppure omogenato di fegato . . . . .	ml 0,10
H <sub>2</sub> O a volume finale di . . . . .	ml 3,00

In alcuni saggi dell'attività enolasica plasmatica, alla miscela di incubazione veniva aggiunto 0,1 ml del sopranatante di un omogenato di fegato di topo al 15%, bollito per 45 sec e centrifugato per 10 min a 2000 r.p.m.

Tabella I

Attività enolasica nel plasma: µmoli di acido 2-fosfoglicerico convertito in acido fosfoenolpiruvico da 1 ml di plasma in 15 min a 20°C.

Ore dalla inoculazione del virus	N° di determinazioni eseguite	Attività enzimatica (media dei valori)	P
0	7	2,83	—
24	4	2,66	> 0,05
48	4	4,99	< 0,05
72	4	11,39	< 0,001
96	4	11,59	< 0,001

Incubazione a 20°C, 15 min per l'attività plasmatica, 20 min per quella epatica. Per le prove eseguite sul plasma si è proceduto alla deproteinizzazione con 2,00 ml di acido metafosforico al 15% e, dopo 10 min di attesa a temperatura ambiente, alla filtrazione attraverso filtri SCHLEICHER-SCHÜLL n. 602. Quindi a 2,00 ml del filtrato limpido si aggiungevano 1,00 ml di NaOH approssimativamente 1,1 N, il cui titolo era aggiustato in modo da portare il pH finale a 7,4. Si eseguivano quindi le letture allo spettrofotometro Beckman mod. DÜ, λ 240 mµ, con vaschette di quarzo dello spessore di 1 cm. Ai valori di estinzione delle prove enzimatiche erano sottratti i valori di prove iden-tiche deproteinizzate al tempo 0. In sostanza s'è adottato il test ottico di WARBURG e CHRISTIAN seguendo complessivamente la descrizione di BÜCHER<sup>24</sup>, cui è stato necessario aggiungere la deproteinizzazione a causa dell'elevato assorbimento di luce da parte del plasma. Per i saggi di attività enolasica epatica, si è invece proceduto alla lettura spettrofotometrica senza deproteinizzazione né ulteriore diluizione della miscela di reazione.

Tabella II

Attività enolasica del tessuto epatico: µmoli di acido 2-fosfoglicerico trasformato in acido fosfoenolpiruvico da 10 mg di tessuto in 20 min a 20°C.

Ore dalla inoculazione del virus	N° di determinazioni eseguite	Attività enzimatica (media dei valori)	P
0	10	2,17	—
24	10	2,03	> 0,05
48	10	2,09	> 0,05
72	10	1,92	> 0,05
96	10	1,22	< 0,01

Risultati. I risultati delle nostre esperienze sono riportati nelle Tabelle. È stata saggiate la validità statistica delle differenze tra le medie dei valori degli animali con-

trollo e di quelli nelle varie fasi dell'infezione, mediante l'indice P di FISHER<sup>25</sup>.

Aggiungiamo inoltre che l'estratto di fegato bollito non ha provocato incremento dell'attività enolasica plasmatica dei topi normali e di quelli infettati.

*Commento e conclusioni.* L'attività enolasica nel fegato non subisce variazioni significative fino alla 72° ora dell'infezione e solo nella fase più tardiva (96 h) presenta una diminuzione notevole e statisticamente significativa. L'attività enolasica del plasma comincia invece ad aumentare in fasi della malattia nettamente precedenti quella in cui si verifica la sua caduta nel parenchima epatico. Quest'ultima, in effetti, compare solo in coincidenza del periodo terminale della malattia, caratterizzato da lesioni necrotico-degenerative praticamente estese a tutto il parenchima, ed è quindi da considerare un'espressione aspecifica del danno epatocellulare grave e diffuso.

Per l'interpretazione del comportamento dell'attività enolasica epatica nel corso dell'epatite da virus MHV-3, riteniamo opportuno tener presente quanto è stato da noi osservato e discusso a proposito dell'attività fosfoglicomutasi<sup>2,4</sup>, la quale subisce nel fegato un incremento contemporaneo all'aumento dei livelli plasmatici, da noi interpretato come probabile espressione di resintesi dell'enzima, tanto intensa da superare la perdita derivante da passaggio di una notevole quantità di esso in circolo. La mancata diminuzione dell'attività enolasica epatica nelle fasi in cui questa è già nettamente aumentata nel plasma per cessione dell'enzima dagli epatociti lesi dal processo moltiplicativo virale, si può presumere dipenda da una sintesi *ex novo* di molecole enzimatiche, di entità tale da impedire la deflessione dell'attività enzimatica epatica, ma non tale da condurre, come nel caso della fosfoglicomutasi, ad un aumento del suo contenuto. Se questa ipotesi corrisponde ad una giusta interpretazione dei fatti osservati, non vi sarebbero differenze, sul piano concettuale, nel comportamento a livello del fegato delle due attività enzimatiche, poiché, a parte le differenze d'ordine quantitativo, esso in entrambi i casi sarebbe la conseguenza di analoghi processi di neosintesi enzimatica, correlata ai fenomeni di precoce rigenerazione epatica, qual'è nota avvenire nel corso dell'epatite virale e delle epatopatie necrotiche in genere.

La mancata attivazione dell'enolasi già presente normalmente nel plasma di topo, da parte di estratto di fegato reso enzimaticamente inattivo, dimostra che gli aumenti osservati nel corso della necrosi non sono dovuti ad attivazione di molecole di enzima già presenti nel plasma in forma inattiva, bensì a passaggio in circolo di una quota notevole di enzima completo.

### Summary

In experimental hepatitis from MHV-3 Craig strain, the enolase activity of plasma increases significantly from 48<sup>th</sup> h of the infection, reaching the highest values at 72–96<sup>th</sup> h.

The same activity in the liver decreases only after 72<sup>th</sup> h, while in the precocious stages of the infection it is unmodified.

The physiopathological significance of the enzymatic modification in the plasma is related to the liver necrosis (enzymo-plasmatic syndrome of virus hepatitis).

<sup>25</sup> R. A. FISHER, *Statistische Methoden für die Wissenschaft*, 12. Aufl. (Oliver Boyd, Edinburgh-London 1956).

<sup>24</sup> T. BÜCHER in S. P. COLOWICK e N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. 1 (Acad. Press Inc., New York 1955), p. 427.