



RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estratto dal vol. XXVIII, serie 6^a, 2^a sem., fasc. 1-2 ferie. - Roma, luglio 1938-XVI.

Fisiologia. — *Di una possibilità di sintesi della vitamina antiscorbutica nella cavia*⁽¹⁾. Nota⁽²⁾ di M. MITOLO, presentata dal Corrisp. S. BAGLIONI.

La questione di una sintesi delle vitamine nell'organismo animale è oggi una delle più controverse. Ho avuto, di recente, occasione di esporne lo stato attuale⁽³⁾; in questa Nota riferisco i risultati di alcune prove *in vitro*, che sono la conseguenza di un mio precedente studio sulle correlazioni intervitaminiche⁽⁴⁾; in esso ripetutamente osservai che, se a cavia tenute a dieta scorbutogena (*ad libitum*) si somministrava una larga dose quotidiana di complesso vitaminico B, sotto forma di lievito di birra secco (gr. 10, *pro die* e per animale), in modo da realizzare le condizioni di avitaminosi C e contemporanea ipervitaminosi B, la durata di sopravvivenza delle cavia era più lunga (36-39 giorni) di quella degli animali in stato di semplice avitaminosi C (23-29 giorni). La perdita di peso era scarsa, il pelame si manteneva sempre in buone condizioni, gli altri sintomi scorbutici (dolori articolari e nucali alla pressione), assai lievi, comparivano con ritardo. Gli animali giungevano a morte, dopo aver avvertito, negli ultimi tempi, soltanto lieve dolenzia alla pressione in corrispondenza delle giunture, non tumefatte. All'autopsia le emorragie, di scarsa entità, erano visibili solo negli organi interni e sotto la cute, non nelle articolazioni. Sicchè un ritardo ed una evidente attenuazione dei sintomi, un discreto prolungamento della sopravvivenza, la mancanza di dolori veri e propri alla pressione sulle giunture e di emorragie articolari sono le caratteristiche della cavia a vitto scorbutogeno, ma ricco di complesso B. Non sembra facile dare una spiegazione di questo fatto; la più semplice sarebbe che l'animale, posto nelle speciali condizioni di esperimento, sia in grado di elaborare per suo conto una certa quantità di vitamina C, utilizzando materiali più semplici ricavati dallo stesso vitto scorbutogeno e dall'eccesso di lievito di birra.

Intanto è certo che il lievito di birra secco non contiene il fattore vitaminico C, come risulta dalle prove biologiche di Hess⁽⁵⁾; lo stesso stato di secchezza del lievito di birra esclude il fatto che esso possa contenere la vitamina antiscorbutica. Per il lievito di

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia umana della R. Università di Roma.

(2) Pervenuta all'Accademia il 21 giugno 1938.

(3) M. MITOLO, *Vitamine. — Alcuni aspetti del problema*. Rosenberg e Sellier, Torino, 1937.

(4) Id., «Il Problema Alimentare», VI, 1936, 47.

(5) A. F. HESS, «Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.», XIII, 1916, p. 145.

h.c.
B
55
17



birra la prova biologica è di fondamentale importanza, perchè, con i metodi chimici di dosaggio del fattore C, basati sulla sua proprietà ossido-riducente, si ottengono valori di riduzione degli indicatori che non sono da attribuire alla presenza di vitamina antiscorbutica nel lievito stesso. Ricorderò che il lievito di birra è stato uno dei materiali più usati negli studi sul meccanismo dei processi di ossidazione: Thunberg, Ahlgren, Harden, Meyerhof, von Euler, Nilsson, Lipmann e specialmente Wieland e Collaboratori hanno stabilito che i lieviti posseggono reattasi (deidrogenasi) atte, fra l'altro, a ridurre (scolorare) il bleu di metilene. Anche la tionina, l'indigodisolfonato, il bleu Nilo, il bleu di cresile, il verde Janus sono totalmente o parzialmente ridotti dal lievito, a pH 7.2, in presenza di Ringer glucosato; mentre altri indicatori di ossido-riduzione, che hanno un rH al disotto di 6, restano immutati (Aubel e Genevois, (1)). Gli stessi effetti si hanno per la presenza, nei lieviti, del glutatione, ivi scoperto da Hopkins, e che oggi si prepara, con tecniche sempre più perfezionate, dai lieviti stessi (Pirie, (2); Rénier, (3); Kozłowski, (4)). Secondo Lebedew (5), l'autolisato di lievito fresco scolora, anche dopo ebollizione, il bleu di metilene, proprio per opera del glutatione. Fabre e Simonnet (6), in una serie di ricerche sul lievito di birra in rapporto ai fenomeni di ossido-riduzione, hanno visto che il lievito fresco, quand'è lavato, non cede all'acqua di lavaggio alcun legame sulfidrilico; ciò, invece, avviene o per estrazione del lievito fresco con ac. tricloroacetico, oppure dopo distruzione della sua struttura cellulare mediante disseccamento (o aggiunta di cloroformio); in tal caso il lievito di birra cede all'acqua di lavaggio legami sulfidrilici, e contemporaneamente sostanze capaci di ridurre la cistina a cisteina.

Abbiamo voluto controllare la giustezza, o meno, dell'ipotesi di una elaborazione endogena del fattore vitaminico C, indagando con esperienze *in vitro* quali siano eventualmente gli organi deputati alla sintesi. All'uopo si sono impiegati organi sia di cavie tenute (nello stabulario) a vitto normale (foglie fresche di cavolo), sia di cavie a regime scorbutogeno (tutte di sesso maschile); queste ultime ricevevano l'alimento di Lomba e Randoin (7), consistente (per 100 gr.) di 84 gr. di farina di fagioli, cotta per un'ora in poca acqua, raffreddata ed impastata con lievito di birra medicinale, secco polverato (Merck) gr. 3, burro gr. 4.5, lattato di calcio (Merck) gr. 5, cloruro di sodio (Merck) gr. 1.5, agar-agar polverato (Merck) gr. 2. Le cavie in avitaminosi sono state sacrificate rispettivamente dopo 3, 5, 7, 11, 15, 19, 23 giorni di dieta scorbutogena; la sintomatologia da esse presentata è stata sempre quella ben nota. Appena ucciso (per compressione alla nuca) l'animale sia normale, sia in avitaminosi C, si prelevavano rapidamente alcuni organi, dopo averli privati, per quanto era possibile, del sangue. Gli organi adoperati sono stati l'encefalo, i reni, il fegato, l'intestino tenue, i surreni, la milza; il lume del tenue è stato aperto, privato del contenuto e lavato abbondantemente con acqua distillata; dato il loro piccolo peso, surreni e milza sono stati spesso adoperati insieme. Per ogni organo la disposizione sperimentale (in grosse provette da centrifuga a fondo conico) è stata la seguente:

1^a provetta: organo parte aliquota, finemente tagliuzzata, + sabbia silicea purificata (lavata con acido e arroventata; Merck) gr. 0.5 + sol. Ringer-Locke (preparata con pro-

(1) E. AUBEL e L. GENEVOIS, «Compt. Rend. Ac. Sc.», CLXXXIV, 1927, p. 1676.

(2) N. W. PIRIE, «Biochem. Journ.», XXIV, 1930, p. 51.

(3) M. TH. RÉNIER, «Compt. Rend. Soc. Biol.», CMI, 1933, p. 526.

(4) A. KOZŁOWSKI, «Science», 1934-I, p. 388.

(5) A. LEBEDEV, «Fermentforsch.», IX, 1926, p. 74.

(6) R. FABRE e H. SIMONNET, «Compt. Rend. Ac. Sc.», CXCI, 1930, p. 1075; CXCH, 1931, p. 852; «Bull. Soc. Chim. Biol.», XIII, 1931, p. 923.

(7) J. L. LOMBA e L. RANDOIN, «Compt. Rend. Ac. Sc.», CLXXVI, 1923, p. 1003.

dotti chimici Merck) cc. 6 + sol. smorzatrice di fosfati (Fraenkel e Landau) secondo Sörensen a pH 7.38, cc. 4; con bacchettina di vetro, a estremità ottusa e smerigliata, si smiuzzava il tessuto; indi si aggiungevano lievito di birra medicinale, secco polverato (Merck) gr. 1 + alimento scorbutogeno di Lomba e Randoïn (preparato di fresco) gr. 3; si mescolava, e sopra si stratificavano 2 cc. di toluolo (Merck).

2^a provetta (I controllo): sabbia silicea purificata gr. 0.5 + sol. Ringer-Locke cc. 6 + sol. smorzatrice cc. 4 + lievito di birra secco polverato gr. 1 + alimento scorbutogeno di Lomba e Randoïn gr. 3; si mescolava, e sopra si stratificavano 2 cc. di toluolo (Merck). Questo I controllo si faceva in doppio.

3^a provetta (II controllo): organo parte aliquota (quantità uguale a quella della 1^a provetta) finemente tagliuzzata, + sabbia silicea purificata gr. 0.5 + sol. Ringer-Locke cc. 6 + sol. smorzatrice cc. 4; con bacchettina di vetro, a estremità ottusa e smerigliata, si smiuzzava il tessuto, mescolando e stratificando 2 cc. di toluolo (Merck).

Le tre provette venivano incubate in termostato a 37° C. per un numero d'ore variabile (da 3 a 23). Indi a ciascuna provetta si aggiungevano 5 cc. di sol. di ac. tricloraacetico (Merck) al 10% (raffreddata in ghiacciaia), e si centrifugava per 10'. Il liquido sopranatante (generalmente opalescente) era decantato in un bicchierino; dopo aver posto nel tubo da centrifuga altri 5 cc. di acqua bidistillata fredda, si ricentrifugava per altri 5'; il nuovo liquido sopranatante (anch'esso opalescente) era decantato e mescolato col precedente nel bicchierino; un terzo lavaggio non si dimostrò necessario. Si procedeva poi al dosaggio della capacità riducente dell'estratto, adoperando una sol. madre (1:500) dell'indicatore di ossido-riduzione 2:6-diclorofenoloindofenolo (della Ditta B. D. H. di Londra) diluita però 20 volte prima dell'uso. L'estratto in esame (in tutto 20 cc.) era aspirato frazionatamente in una microburetta (graduata in centesimi) e si faceva cadere, goccia a goccia, in un bicchierino contenente cc. 1 della sol. diluita di indicatore. Pur essendo gli estratti generalmente opalescenti, il viraggio del colore si distingueva abbastanza bene.

Nelle esperienze, il II controllo (cioè il contenuto della 3^a provetta) esprimeva il valore riducente dell'organo in esame; aggiungendo a questo il valore riducente del I controllo (cioè del contenuto della 2^a provetta: lievito di birra + alimento scorbutogeno) si sarebbe dovuto avere il valore riducente della 1^a provetta (organo + lievito di birra + alimento scorbutogeno). Nel caso che il valore riducente del contenuto della 1^a provetta fosse stato inferiore alla somma dei valori riducenti del contenuto delle altre due provette, si poteva dedurre che una certa quantità di sostanza riducente, dosabile col 2:6-diclorofenoloindofenolo, fosse andata distrutta o trasformata, oppure che i fenomeni di distruzione o trasformazione avessero la prevalenza sui processi di sintesi; mentre, nel caso che il valore riducente della 1^a provetta fosse stato superiore, si poteva pensare o alla formazione *ex novo* di una certa quantità di sostanza riducente, oppure al prevalere dei processi di sintesi su quelli di distruzione o trasformazione della sostanza stessa.

Pur negando ogni specificità all'indicatore per la vitamina antiscorbutica⁽¹⁾, anche se impiegato secondo Birch, Harris, e Ray⁽²⁾, nelle presenti esperienze abbiamo presupposto che l'eccesso di sostanza riducente, eventualmente sintetizzata, fosse acido ascorbico (vitamina C) in base ai risultati delle prove biologiche dianzi ricordate⁽³⁾. Pertanto i valori di riduzione, esprimenti la differenza ($\frac{1}{2}$) tra le cifre della 1^a provetta e quelle della 2^a + 3^a provetta, sono stati convertiti in γ di ac. ascorbico; abbiamo per-

(1) M. MIROLO, «Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.», IX, 1934, p. 518.

(2) T. W. BIRCH, L. J. HARRIS e S. N. RAY, «Biochem. Journ.», XXVII, 1933, p. 590.

(3) Loc. cit.

ciò standardizzato la sol. dell'indicatore contro una soluzione di acido l-ascorbico (Hoffmann-La Roche), sciogliendo gr. 0,05 di ac. l-ascorbico in 250 cc. di sol. di ac. tricloroacetico al 10 % e portando la soluzione a 1 litro con H_2O . In 1 cc. di questa soluzione sono contenuti γ 50 di acido l-ascorbico. Titolando contro soluzione diluita di indicatore, abbiamo trovato, come media di 5 prove, che 1 cc. di indicatore è scolorato (ridotto) da cc. 0,734 della soluzione, ossia da γ 36,7 di acido l-ascorbico. È stato quindi facile calcolare il valore in acido ascorbico dei 20 cc. dell'estratto ricavato da ciascun organo di cavia.

I risultati delle esperienze sono riassunti nelle due tabelle.

Dalle tabelle risulta che la possibilità di sintesi della vitamina C da parte di alcuni organi di cavia (a dieta normale o scorbutogena) è messa in evidenza soltanto prolungando fino a 20-23^h il contatto tra organo e dieta scorbutogena + eccesso di lievito di birra, in termostato a 37° C. Per tale durata, mentre una parte della sostanza riducente va distrutta (come risulta dalle cifre della 3^a provetta - II controllo), i processi di sintesi prevalgono su quelli di scissione; se invece il tempo di contatto si riduce a 3-4^h, i valori ottenuti sono generalmente negativi, cioè o non si è neoformata vitamina C, oppure per questa i fenomeni catabolici sono più attivi di quelli anabolici.

Concludendo:

1° In *cavie a dieta normale* il fegato, la milza e i surreni, l'intestino tenue, i reni, l'encefalo, nelle condizioni sperimentali anzidette, sono in grado di sintetizzare *in vitro* una certa quantità di sostanza riducente l'indicatore 2:6-diclorofenoloindofenolo, quando sono incubati (in termostato a 37° C.) per un tempo sufficiente, in presenza di alimento scorbutogeno (di Lomba e Randoïn) ed un eccesso di lievito di birra secco.

2° Nelle stesse condizioni di esperimento, il fegato e l'intestino tenue di *cavie carenate di fattore antiscorbutico* dimostrano (*in vitro*) ancora dopo 19 giorni di avitaminosi la capacità di sintetizzare una certa quantità di sostanza riducente. Invece, dopo il quinto giorno di dieta scorbutogena, l'encefalo, i surreni e la milza perdono il potere di sintesi (o comunque questa non appare dalle cifre di riduzione); per i reni tale proprietà cessa dopo il terzo giorno di avitaminosi.

3° In base ai risultati delle precedenti ricerche biologiche⁽¹⁾, secondo cui *cavie* in avitaminosi C e contemporanea ipervitaminosi B sopravvivono costantemente 10-13 giorni in più di quelle in semplice avitaminosi C, e sono colpite con ritardo da una sindrome scorbutica attenuata, è presumibile che la sostanza riducente, elaborata dai vari organi di cavia normale o in avitaminosi C (a partire da materiali più semplici contenuti nel vitto scorbutogeno e nell'eccesso di lievito di birra secco), sia il fattore antiscorbutico (ac. ascorbico).

(1) Loc. cit.

TABELLA I.
A) *Animali a dieta normale.*

N. cavia	Peso dell'animale gr.	Organo	Aliquota impiegata per dosaggio gr.	Permanenza in Termostato a 37° C. per ore	cc. di indicatore scolorati da 1 gr. di organo				Differenza (\pm) espressa in γ di ac. ascorbico
					1 ^a provetta	2 ^a provetta (I controllo) (1)	3 ^a provetta (II controllo)	3 ^a + 3 ^a provetta (I + II controllo)	
1	353	reni encefalo fegato	1 1 1	3 3 3	5.73		3.60	7.03	— 1.30
					5.84	3.43	3.22	6.05	— 0.81
					8.43		4.80	8.23	+ 0.20
2	320	encefalo reni fegato	1 1 2	3 3 3	6.35		4.04	7.16	— 0.91
					5.55	3.12	4.08	7.20	— 1.65
					9.89		6.49	9.61	+ 0.28
3	285	surreni reni fegato	0.125 1 2	3.30' 3.30' 3.30'	16.70		22.63	25.62	— 8.92
					5.17	2.99	3.26	6.25	— 1.08
					6.01		3.75	6.74	— 0.73
4	345	surreni + milza fegato intestino tenue	0.307 1 2	21 21 21	24.19		8.95	12.05	+ 12.14
					15.12	4.00	6.23	10.23	+ 4.89
					8.51		2.23	6.23	+ 2.28
5	275	encefalo reni fegato	1 1 1	21.30' 21.30' 21.30'	8.11		1.55	6.53	+ 1.58
					8.95	4.98	2.34	7.32	+ 1.63
					15.97		8.59	13.57	+ 2.40
6	343	encefalo reni intestino tenue	1 1 1	22 22 22	8.68		1.33	5.82	+ 2.86
					9.06	4.49	2.07	6.56	+ 2.50
					9.98		2.04	6.53	+ 3.45

(1) Le differenze tra cifra e cifra dipendono dal grado di secchezza maggiore o minore della dieta.

TABELLA II.

B) *Animali a dieta scorbutogena.*

N. cavia	Dieta scorbutogena per giorni	Peso dell'animale		Organo	Aliquota impiegata per dosaggio gr.	Permanenza in C. per ore	cc. di indicatore scolorati da 1 gr. di organo					Differenza in y di ac. ascorbico (+ espressa)
		iniziale gr.	finale gr.				1 ^a provetta	2 ^a provetta (I controllo)	3 ^a provetta (II controllo)	2 ^a + 3 ^a provetta (I + II controllo)	differenza (I) tra la 1 ^a e la 2 ^a + 3 ^a provetta	
1	3	236	228	surreni + milza reni fegato	0.19 1 1	5 5 5	12.46 5.65 7.45	3.32	9.71 2.12 3.07	13.03 5.44 6.36	0.57 + 0.21 + 1.06	- 20.02 + 7.70 + 38.90
2	3	250	225	encefalo reni intestino tenue	1 1.3 1	21.30' 21.30' 21.30'	4.98 6.43 7.14	4.24	1.58 1.18 2.12	5.82 5.42 6.36	- 0.84 (2) + 1.01 + 0.78	- 30.83 (2) + 37.07 + 28.63
3	5	230	173	surreni + milza reni fegato	0.16 1.45 1	21 21 21	13.02 4.19 8.08	4.00	6.47 0.77 2.67	10.47 4.77 6.67	+ 2.55 - 0.58 + 2.31	+ 93.58 - 21.28 + 84.78
4	5	280	252	encefalo fegato intestino tenue	1 1 1.3	22.30' 22.30' 22.30'	9.40 10.00 8.30	6.12	1.33 2.01 1.44	7.45 8.13 7.56	- 2.04 + 1.87 + 0.74	+ 74.87 + 68.63 + 27.15
5	7	312	232	encefalo reni fegato	1 1.25 2	3 3 3	3.81 2.62 3.95	2.18	2.18 0.96 1.88	4.36 3.14 4.06	- 0.55 - 0.52 + 1.01	- 30.18 - 19.08 + 37.07
6	7	285	263	fegato reni intestino tenue	1.5 1.5 2	21 21 21	8.66 3.36 5.66	4.08	0.96 0.71 1.14	5.04 4.79 5.22	+ 3.02 - 1.43 + 0.44	+ 110.83 - 52.48 + 16.15

(1) Le differenze tra cifra e cifra dipendono dal grado di secchezza maggiore o minore della dieta.

Segue TABELLA II.

N. cavia	Dieta scorbutogena per giorni	Peso dell'animale		Organo	Aliquota impiegata per dosaggio gr.	Permanenza in termostato a 37° C. per ore	cc. di indicatore scoloriti da 1 gr. di organo					Differenza in γ di ($\frac{1}{100}$) espressa in γ di provetta
		iniziale gr.	finale gr.				1 ^a provetta	2 ^a provetta (I con- trollo) (1)	3 ^a provetta (II con- trollo)	2 ^a + 3 ^a provetta (I + II controlli)	differenza ($\frac{1}{100}$) tra la 1 ^a e la 2 ^a + 3 ^a provetta	
7	11	323	222	encefalo reni	1 1,3	3,30' 3,30'	5,55 —	—	2,86 —	6,34 —	— 0,79 —	— 28,99
8	11	263	238	fegato encefalo surreni + milza	2 2,5 1 0,175	3,30' 22,15' 22,15' 22,15'	3,34 5,81 4,96	3,48 — 4,00	0,70 0,53 1,77	4,18 4,53 5,77	— 0,84 + 1,28 — 0,81	— 30,83 + 46,98 — 29,73
9	15	302	255	intestino tenue milza surreni	5 0,135 0,07	+ 4 +	4,22 — —	3,75	1,31 — —	5,06 — —	— 0,84 — —	— 30,83
10	15	315	263	fegato intestino tenue surreni + milza	3,2 3 0,19	23 23 23	8,81 8,32 —	6,80	0,38 1,11 —	7,18 7,91 —	+ 1,63 + 0,41 —	+ 50,82 + 15,05 —
11	19	555	247	encefalo reni fegato	1,8 1,25 2,5	3 3 5	3,41 — 3,62	3,67	0,60 — 0,77	4,27 — 4,44	— 0,86 — — 0,82	— 31,56 — — 30,09
12	19	363	228	fegato intestino tenue	3,5 3	23 23	9,15 8,02	7,53	0,39 1,06	7,92 8,59	+ 1,23 + 0,33	+ 45,14 + 12,11
13	23	320	253	reni fegato intestino tenue	1,445 3,5 5	20,30' 20,30' 20,30'	— 4,52 5,03	4,51	— 0,38 0,32	— 4,79 5,03	— — 0,27 0	— — 9,91 0

(1) Le differenze tra cifra e cifra dipendono dal grado di secchezza maggiore o minore della dieta.

La quantità di vitamina C neoformata andrebbe ad accrescere le riserve tissulari di acido ascorbico, che si trovano sempre negli animali posti a dieta scorbutogena, agli inizi della carenza; e permetterebbe lo speciale comportamento delle cavie in avitaminosi C e contemporanea ipervitaminosi B, di fronte a quello delle cavie in semplice avitaminosi C. Tuttavia, col venire gradualmente meno, nel corso della carenza alimentare, della proprietà vitaminosinterica degli organi, e col consumarsi della riserva di fattore antiscorbutico e della quantità neoformata di esso, la cavia risente il danno causato dal *deficit* di acido ascorbico e soccombe con una sindrome di scorbuto attenuato.

~~327222~~

55675

6

d