

Misc. B. 70/39

39

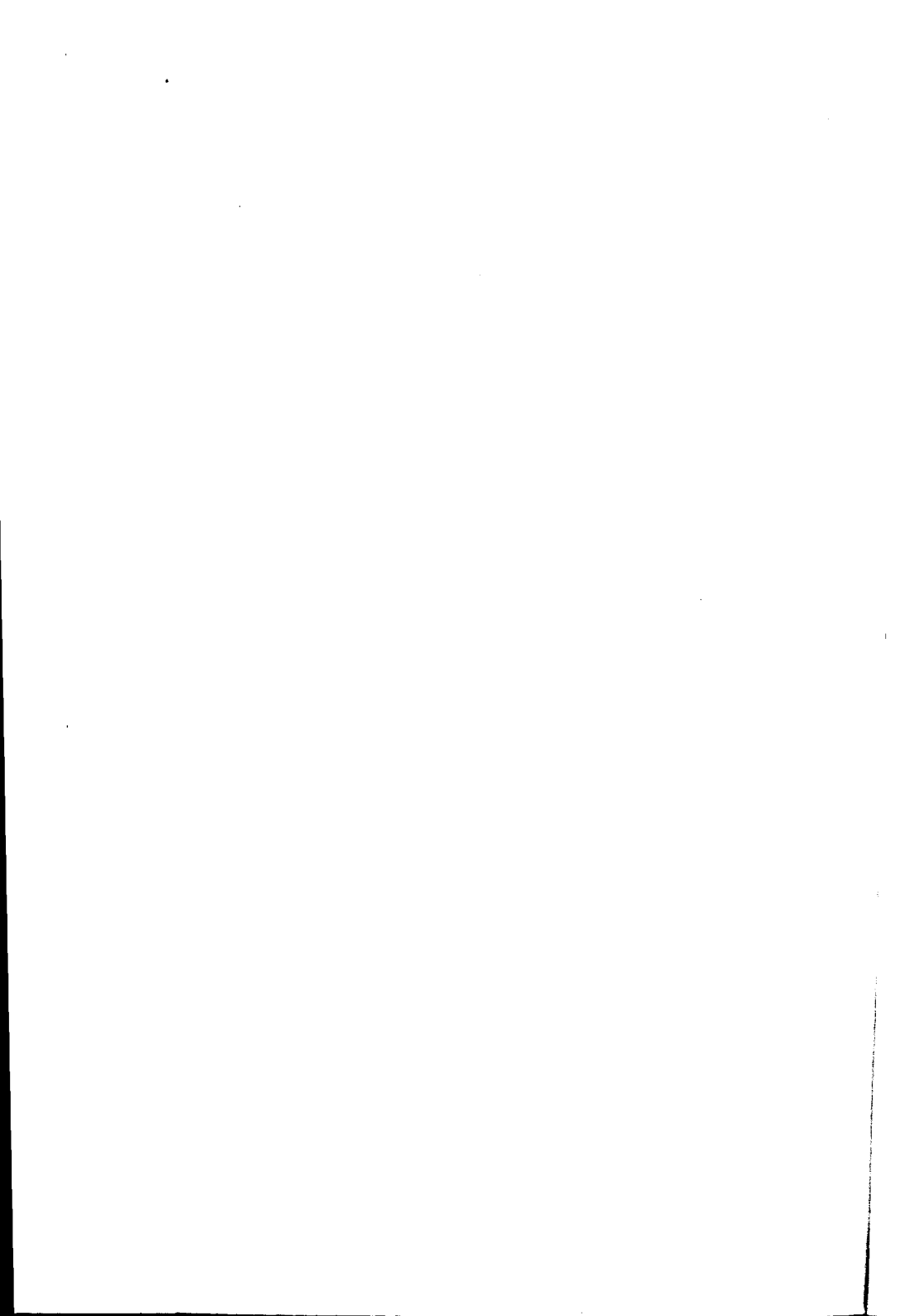


ALDO SPIRITO

L'anaerobiosi e i suoi rapporti con i fenomeni di fermentazione e di ossidazione

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", VOL. I

Esemplare fuori commercio per
la distribuzione agli effetti di
legge.



ALDO SPIRITO

L'anaerobiosi e i suoi rapporti con
i fenomeni di fermentazione e di
ossidazione

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", VOL. I

ALDO SPIRITO

L'ANAEROBIOSI E I SUOI RAPPORTI CON
I FENOMENI DI FERMENTAZIONE E DI
OSSIDAZIONE

UN argomento di grande ampiezza, profondamente studiato da moltissimo tempo – ne ritroviamo ricerche pregevolissime in Spallanzani – è quello dell'anaerobiosi. Gli studi continuano tuttora e anche io negli ultimi anni mi sono occupato della questione facendone l'oggetto di numerose indagini i cui sviluppi, sempre più ampi, lasciano intravedere nuove vie che saranno costantemente perseguite. Pertanto lo scopo del presente lavoro è quello di riassumere i risultati da me raggiunti con le esperienze precedenti [1] aggiungendo quelli ottenuti recentemente nella mia scuola, per considerarli, quindi, tutti in una visione sintetica al fine di prospettare le conclusioni che già se ne possono trarre e i nuovi quesiti che si impongono al nostro studio.

Nelle numerose ricerche comparative e sperimentali da me eseguite sui fenomeni di anaerobiosi, ho potuto mettere in evidenza, durante il periodo embrionale di alcuni Anfibi (essenzialmente si è considerato lo stadio di neurula), la continuazione di processi di vita e di sviluppo in assenza dell'ossigeno dell'ambiente.

Nella successiva ricerca dei meccanismi con i quali questa vita si potesse attuare e quindi, in ultima analisi, nell'indagine della fonte di energia necessaria per essa, ho posto in evidenza che tale fonte è da ricercarsi in due ordini di fenomeni nettamente distinti e cioè: processi fermentativi e processi di ossidazione a spese di una riserva ossidante contenuta nel materiale in esperimento. Qualche

parola innanzi tutto sul primo dei due meccanismi di cui ho già estesamente trattato.

Tra gli Anfibi sperimentati, l'unica specie, le cui neurule ricorrono alla fermentazione per trarne energia in assenza dell'ossigeno dell'ambiente, è rappresentata dal *Discoglossus pictus*. Gli esemplari di tale specie, posti in anaerobiosi allo stadio di neurula, si sviluppano fino allo stadio in cui ha inizio la formazione della pinna codale, sincronicamente agli esemplari normali di controllo, eliminando l'acido lattico prodottosi per la fermentazione dei glucidi. E questo sincronismo di sviluppo — a prima vista strano, data l'enorme differenza del rendimento energetico della fermentazione lattica dei glucidi rispetto alla loro ossidazione — si è trovato realizzato a mezzo di un consumo di carboidrati 35 volte superiore effettuato dagli esemplari posti in assenza di ossigeno in confronto a quelli mantenuti in ambiente normale.

Tale risultato, ottenuto su embrioni integri di Vertebrati, veniva a porsi a prima vista sullo stesso piano di quanto era stato trovato per le cellule dei tumori e per le cellule coltivate *in vitro*, ma già nei lavori precedenti ho rilevato che si tratta realmente di fatti ben differenti, non omologabili e tanto meno permettenti di stabilire una classificazione dei tessuti (embrionali, adulti e tumorali) in rapporto alle peculiari proprietà di ossidazione e di fermentazione. Di più oggi, ai miei risultati, posso aggiungere quelli del D'Agostino [2] che, nel mio Istituto, ha posto in evidenza negli adulti di *Planaria* la possibilità di vita, in ambiente privo di ossigeno, per un periodo protrattabile fino a 105 ore dopo la chiusura di essi nei tubi da vuoto. Anche in tal caso si è rilevata l'eliminazione di acido lattico nel liquido ambiente. Ancora una volta, quindi, su altro materiale, si sono verificate quelle condizioni che permettono il passaggio di quest'acido derivato dalla fermentazione dei glucidi dall'interno all'esterno; fatto questo che in altri casi non si verifica (*Rana esculenta*, *Rana agilis*, *Bufo vulgaris*): in queste specie, se non v'è l'altro meccanismo di produzione di energia per processi ossidativi a spese di una riserva ossidante, non si ha sviluppo in anaerobiosi, ma in breve morte e disfacimento.

Ed è per tutto ciò che, rifuggendo dallo schematismo di una classificazione di tessuti a seconda delle loro possibilità più o meno

rilevanti di attuare una glicolisi aerobica e anaerobica, asserivo che essa – sempre presente là dove vi è metabolismo di glucidi, per lo meno come fase precedente quella ossidativa – può avere un valore biologico come fonte di energia necessaria alla vita, soltanto se ad essa si accompagnino meccanismi per i quali si abbia l'allontanamento o comunque la sparizione dell'acido lattico, altamente dannoso per il protoplasma vivente.

L'ANAEROBIOSI
E I SUOI RAP-
PORTI ECC.

* * *

Ma in questo lavoro, se pur ho accennato ai fenomeni di glicolisi come fonte di energia per materiale posto in assenza di ossigeno libero, desidero soffermarmi più lungamente sulle possibilità di vita anaerobica che si attuano attraverso la continuazione di processi ossidativi a spese di una riserva ossidante: tipici casi del genere furono da me riscontrati in *Bufo vulgaris* e *Bufo viridis*.

E fin dal principio mi attrasse lo studio dei meccanismi e delle sostanze costituenti questa riserva ossidante: oggi, per l'esposizione che segue, si può rilevare come il campo di ricerca si sia grandemente esteso, permettendo di utilizzare alcuni risultati ottenuti nei riguardi della vita anaerobica per la comprensione di particolari aspetti relativi al metabolismo aerobico.

D'altra parte già in un lavoro del 1940 [3] avevo prospettato qualcosa del genere quando, a seguito della comparazione dei diversi fenomeni osservati negli Anfibi, concludevo che: « lo sviluppo anaerobico in *Bufo vulgaris* per ossidazione a mezzo di « una riserva ossidante (in confronto alle altre specie – *Rana esculenta*, *Rana agilis* – che non l'hanno che scarsamente) potrebbe « essere considerato in funzione di sostanze o di meccanismi normalmente contenuti o no nell'embrione, forse in relazione a « proprietà intrinseche del suo metabolismo aerobico: in condizioni anaerobiche questa riserva ossidante quindi renderebbe « semplicemente all'individuo un servizio al quale non sarebbe « specificamente destinata ».

È chiaro pertanto che, nell'intento di studiare la natura di questa riserva ossidante e il suo modo di funzionare, ci si rivolgesse in-

nanzi tutto a sostanze già riconosciute come facenti parte dei complessi fenomeni respiratori, capaci di presentarsi negli stati ossidato e ridotto e suscettibili quindi, nel primo caso, di cedere ossigeno o sottrarre idrogeno da un substrato risultante così ossidato. E in tal senso è ovvio l'interesse di uno studio tendente ad accertare se a maggiori o minori possibilità di vita anaerobica, e cioè a maggiore o minore entità dei processi ossidativi a spese della predetta riserva ossidante, corrispondesse o non corrispondesse maggiore o minore quantità di tali composti, rilevabili soprattutto nella forma ossidata rispetto alla forma ridotta.

Pertanto le sostanze a gruppi $-SH$ ed $-S-S-$ furono tra le prime ad essere considerate: il loro studio affidato al Giolitti ha dato già i primi risultati, mentre le ricerche tuttora continuano. Da un punto di vista generale è logico pensare, e quest'Autore ne ha fatto cenno nella sua Nota [4], che, comunque si considerino queste sostanze nei complessi fenomeni del metabolismo respiratorio, il trovarne in un determinato stadio quantità maggiori o minori allo stato ossidato ($-S-S-$) potrebbe ritenersi utile per spiegare maggiori o minori possibilità di vita in assenza di ossigeno libero in quanto, in tali condizioni, il loro passaggio allo stato ridotto ($-SH$) significherebbe una conseguente deidrogenazione del substrato e, quindi, in ultima analisi una sua ossidazione.

Perciò, come è detto più sopra, lo studio dei processi anaerobici veniva ad essere intimamente legato a quello dei fenomeni aerobici e in quest'intento affidai al Giolitti le indagini riguardanti le sostanze predette, da considerarsi, oltre che da un punto di vista comparativo, anche nei riguardi dell'introduzione di un nuovo fattore sperimentale. Tale fattore sperimentale doveva servire a modificare, nell'ambito di una stessa specie, il comportamento in anaerobiosi in modo da poter stabilire, nel caso di ripercussioni anche a carico delle predette sostanze, le eventuali relazioni esistenti tra i due ordini di fenomeni.

Il fattore sperimentale è consistito nell'allevamento del materiale a temperature differenti (9° – 13° ; 19° – 22°) prima della sua chiusura nei tubi da vuoto, e con esso si è ottenuto il risultato, in *Bufo vulgaris* e *Bufo viridis*, che le possibilità di vita in ambiente privo di ossigeno sono maggiori per le neurule allevate a temperature

più basse che non per quelle allevate a temperature più alte: è ovvio aggiungere che il materiale, dopo la chiusura nei tubi da vuoto, è stato mantenuto in tutti i casi ad una medesima temperatura.

Sulla base di questi risultati che mettevano in luce un comportamento differenziale nei riguardi della resistenza all'assenza di ossigeno libero, non più nell'ambito di specie diverse, ma in esemplari di una stessa specie, derivati per di più da uno stesso lotto di uova, il Giolitti è passato all'analisi del loro contenuto in sostanze -S-S- ed -SH ed ha trovato che, negli esemplari allevati alle temperature più basse, della quantità di esse contenuta globalmente, circa la metà è rilevabile allo stato ossidato (-S-S-), mentre nel secondo caso esse sono dimostrabili tutte allo stato ridotto (-SH). In tal maniera si è venuto a trovare una interessante corrispondenza di fatti, i quali, per lo meno nei materiali sperimentati, permettono di inquadrare queste sostanze, facenti parte del normale metabolismo respiratorio, tra quelle che, in condizioni di assenza di ossigeno libero, possono rappresentare la riserva ossidante utile ai fini dei fenomeni energetici necessari alla vita.

*
* *

Ma se per le sostanze studiate nel precedente paragrafo si erano ottenuti risultati permettenti di inserirle nel quadro di quei meccanismi responsabili della vita anaerobica rilevata in certi materiali e di considerarle in tal caso alla luce di ciò che si sa nei loro riguardi a proposito del normale metabolismo respiratorio, la questione si è presentata ben più complessa quando ho ritenuto utile passare allo studio di altre sostanze conosciute ancor oggi in una veste che ritengo debba essere profondamente modificata. Voglio alludere a questo proposito, tra l'altro, alla catalasi, indicando come è uso con questo termine quella sostanza o quelle sostanze che si mettono in evidenza a mezzo della proprietà che hanno di scindere l'acqua ossigenata con svolgimento di ossigeno molecolare. E tanto valore si è attribuito a questo metodo usato per metterle in evidenza e per dosarle che è generalmente accettato il concetto che esse funzionino scindendo i perossidi forman-

tisi nel metabolismo respiratorio della cellula vivente e quindi salvandola dall'azione altamente tossica di essi: le nuove idee del Regenbogen sull'argomento non spostano essenzialmente la questione, così come quelle di Keilin e collaboratori per quanto poste su un altro piano. Fin dal principio credetti che non si dovesse seguire integralmente questo modo di vedere (qualcosa del genere potrebbe dirsi anche per quel che riguarda le perossidasi che si pensa funzionino scindendo i perossidi con formazione di ossigeno atomico) e pertanto, nella conoscenza del comportamento differenziale di alcune specie di Anfibi nei riguardi dell'anaerobiosi, affidai al Friggeri uno studio della catalasi negli stessi materiali, anche in relazione al fattore sperimentale dell'allevamento di essi a diverse temperature, già usato dal Giolitti nelle ricerche sopra accennate.

Da un punto di vista comparativo il Friggeri poteva stabilire [5] che il contenuto in catalasi, così come è rilevabile a mezzo del metodo gasvolumetrico di Burge, da lui messo a punto a seguito di lunghe indagini, è molto maggiore in *Bufo vulgaris* e in *Bufo viridis*, le cui neurule hanno una notevole possibilità di vita anaerobica, che non in *Rana esculenta* e in *Rana agilis* che non possiedono questa possibilità: si tratta in tal caso di materiali perfettamente comparabili, soprattutto in quanto per compiere il processo ontogenetico della neurulazione assumono, a parità di grandezza, un egual volume di ossigeno, eliminano una eguale quantità di anidride carbonica, hanno quindi un egual quoziente respiratorio e conseguentemente (pensando ai materiali metabolizzati) un egual rendimento energetico utilizzabile ai fini dello sviluppo (Spirito [6]). Il parallelismo notato dal Friggeri, negli Anfibi predetti, tra maggiore o minore quantità di catalasi e maggiore o minore possibilità di vita anaerobica, è stato rilevato, del resto, anche da un altro autore (Hopkins [7]), il quale su dodici lamellibranchi delle Caroline e quattro delle Bermude ha posto in evidenza una maggiore ricchezza di catalasi nelle specie che per condizioni ecologiche vengono a trovarsi periodicamente in condizioni di anaerobiosi. Naturalmente Hopkins vede nella catalasi la solita funzione di liberare dai perossidi formati nel metabolismo intermedio l'ossigeno molecolare, il quale sarebbe utile in assenza di ossigeno

libero: (*) veramente, in tal senso, riterrei più interessante un maggior contenuto di perossidi capaci di fornire ossigeno utilizzabile in condizioni anaerobiche, che non di catalasi considerata come un fermento capace semplicemente di scinderli.

Ma le ricerche del Friggeri non si sono limitate alle predette indagini comparative e, così come il Giolitti per le sostanze a gruppi -S-S- ed -SH di cui ho accennato più sopra, anche egli ha compiuto delle indagini sulla catalasi in *Bufo vulgaris* e in *Bufo viridis* in relazione alle differenti possibilità di resistenza all'assenza dell'ossigeno dell'ambiente, conseguenti all'allevamento del materiale a diverse temperature (9° - 13° ; 19° - 22°) prima della sua chiusura nei tubi da vuoto. E le esperienze del Friggeri [8] hanno dimostrato che allo stadio di neurula (il solito usato in tutte queste indagini) il contenuto in catalasi è maggiore negli esemplari allevati a temperature più basse (e sono le più resistenti all'assenza di ossigeno), mentre è minore in quelli allevati alle temperature più alte.

Ma per giungere a valutare il significato di questo parallelismo tra contenuto in catalasi e resistenza all'anaerobiosi, occorre premettere alcune considerazioni da cui sono partito nell'impostare tutto il piano delle ricerche in questione. Nelle esperienze del Friggeri si accenna infatti ad una « maggiore o minore quantità » di catalasi a seguito dell'allevamento del materiale a diverse temperature ed è su questa espressione che conviene fermarsi in quanto potrebbe porsi il quesito se realmente si possa parlare di variazioni del contenuto di tali sostanze o piuttosto non si debba pensare a variazioni del loro stato, tali da permettere o meno la dimostrazione di una parte di esse con il metodo in uso per il dosaggio. Non che non si debba credere in molti casi a un reale aumento di queste sostanze (**) e rispettivamente a una diminuzione del loro contenuto, ma quando si parla di diminuzione di catalasi in ambiente privo di ossigeno (esperienze su vegetali del Freed-

(*) Anche il Tallarico (1908), considerando la catalasi come una ossidasi indiretta, le attribuisce una funzione analoga nei primi stadi di sviluppo del pollo.

(**) Questo processo dovrebbe anzi realmente verificarsi quando si tratti, per esempio, di periodi biologici in cui ad un accrescimento di tutto l'individuo può far seguito anche quello di tali composti.

ricksz [9]), o di diminuzione dell'attività catalasica nella metamorfosi di *Bufo vulgaris* (risultati inediti di ricerche da me affidate a L. Mistruzzi), o di variazioni di essa in un identico stadio a seguito di un allevamento a temperature diverse (Friggeri [8]), penso che il fenomeno debba essere considerato in un altro senso che desidero qui prospettare.

Infatti una diminuzione, un aumento o un diverso quantitativo di catalasi in un determinato stadio biologico, o a seguito di una determinata azione sperimentale, non debbono essere sempre necessariamente intesi rispettivamente come una scomparsa, una neoformazione o un diverso contenuto di queste sostanze. Esse sono da noi studiate e misurate attraverso una reazione (svolgimento di ossigeno dall'acqua ossigenata) la quale (e nulla ci autorizza a ritenerla corrispondente alla sua reale funzione *in vivo*) potrebbe essere adatta a porle in evidenza soltanto in un determinato stato.

Un simile modo di vedere ha riscontro in numerosissime analisi di altri composti e come esempio ricordo quanto succede per le sostanze a gruppi $-SH$ ed $-S-S-$. In tal caso la comune reazione al nitroprussiato mette in evidenza, nei materiali sottoposti all'indagine, soltanto le prime: per dosarle globalmente occorre trasformarle tutte allo stato ridotto.

Ed è proprio questo fatto che desidero porre in risalto nei riguardi della catalasi (bisogna ricordare anche la sua struttura chimica sul tipo dell'emina), per la quale Keilin e Hartree [10] hanno insistito sull'esistenza di uno stato ossidato e di uno stato ridotto; nel gioco d'azione sull'acqua ossigenata: di questi due stati parlano anche le antiche ricerche di Battelli e Stern. Pertanto desidero prospettare che una diminuzione di catalasi in uno stadio biologico o in una determinata condizione sperimentale potrebbe molte volte esser considerata semplicemente in funzione di un cambiamento di stato di una parte di essa (e cioè il passaggio da stato ossidato a stato ridotto), cambiamento sufficiente per non rendere più dimostrabile tale aliquota a mezzo della solita reazione usata per il suo dosaggio: il ragionamento inverso si potrebbe adottare per quel che riguarda l'aumento di queste sostanze. Pertanto tali termini di « diminuzione » o « aumento » non avreb-

bero altro valore che quello di indicare, per comparazione, lo spostamento dell'equilibrio, in un senso o nell'altro, tra i due stati considerati.

E i risultati riferiti, o della mia scuola o della letteratura, convalidano questa idea da me prospettata e ne precisano il significato biologico. A tal proposito ricordo perciò le esperienze sopra citate del Freedericksz riguardanti le variazioni della quantità di catalasi in relazione alla mancanza di ossigeno e ancora i dati suesposti di Mistruzzi: ma per questi ultimi occorre una maggiore delucidazione.

Nella letteratura, infatti, troviamo altri Autori i quali ammettono invece che la quantità di catalasi sia in rapporto diretto con l'intensità metabolica, talchè si dovrebbe pensare, anche nel caso predetto, a un aumento di queste sostanze in relazione al brusco aumento dei fenomeni respiratori dimostrabili nella metamorfosi di *Bufo vulgaris*. Ma a questo proposito desidero porre in risalto che l'idea di un aumento di catalasi, intesa dagli autori precedenti come una neoformazione di queste sostanze, se può essere accettata in molti casi in cui si ha un elevamento del metabolismo (vedi nota a pag. 45), essa non è invocabile nelle esperienze di Mistruzzi. In esse infatti (e le feci svolgere appunto per poterle unire insieme alle altre qui riferite ai fini delle mie considerazioni che espongo in questo lavoro e che feci già accennare nella sua tesi di laurea inedita, luglio 1941) si viene ad avere negli esemplari di *Bufo vulgaris* un forte aumento del metabolismo per il passaggio dalla vita acquatica alla vita terrestre proprio a seguito di un momento in cui ha termine l'assunzione degli alimenti, sì che è da ritenere poco probabile, se non addirittura impossibile, una sintesi di nuova catalasi. Ciò premesso il risultato dimostrante la sua « diminuzione » porta nuovi elementi in appoggio alle vedute sopradette in quanto dobbiamo pensare che della catalasi esistente al termine della vita larvale, una maggior parte di essa — a seguito della metamorfosi e quindi dell'aumentato metabolismo respiratorio — sia impegnata in uno stato non più rilevabile, all'atto dell'analisi, con il solito metodo usato per il dosaggio.

E su questo stesso piano si vengono a porre le esperienze del Frig-geri sul diverso contenuto in catalasi in un determinato stadio di svi-

luppo (*) in *Bufo vulgaris*, a seguito dell'allevamento degli esemplari a differenti temperature e la maggior vita anaerobica di essi per opera della continuazione di processi ossidativi a spese di una riserva ossidante là dove la quantità rilevabile di catalasi è maggiore.

Naturalmente gli studi continuano per poter disporre di un maggior numero di dati convalidanti l'idea che ho esposto in questo lavoro o per rendere comparabili e considerabili ai fini di essa risultati di altri Autori ottenuti in non ben definite condizioni sperimentali. Per il momento desidero porre in risalto come l'insieme delle indagini sull'anaerobiosi, opportunamente comparate con lo studio di fenomeni aerobici, hanno portato a considerare la catalasi, nell'ambito di questi ultimi, con un valore ben diverso da quello prospettato finora; valore biologico nuovo che si può indicare come quello di veicolo di ossigeno fin nell'intimo delle strutture cellulari.

- [1] « Rend. R. Acc. Lincei », 1936, 23; « Arch. Scienz. Biol. », 1937, 23. « Rend. R. Acc. Lincei », 1937, 26; « Arch. Scienz. Biol. », 1937, 23; « Ric. Morf. », 1938; « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », 1938, 13; « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », 1939, 14; « Mem. R. Acc. d'Italia », 1940, 11; « Boll. Zool. », 1940, 11.
- [2] « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », 1941, 16.
- [3] « Mem. R. Acc. d'Italia », 1940, 11.
- [4] « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », 1941, 16.
- [5] « Riv. di Biol. », 1940, 30.
- [6] « Rend. R. Acc. Lincei », 1937, 26; « Arch. Scienz. Biol. », 1937, 23; « Ric. Morf. », 1938; « Mem. R. Acc. Italia », 1940, 11.
- [7] « Biol. Bull. », 1934, 67.
- [8] « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », 1941, 16.
- [9] « Bull. Soc. Bot. Genève », 1911, 3.
- [10] « Proc. Roy. Soc., London » B, 1935, 124.

(*) Insisto su questa espressione in quanto trattandosi in tutti i casi di esemplari di uno stesso lotto e ad uno stesso stadio, ci veniamo a trovar di fronte sempre a condizioni perfettamente comparabili: le differenti temperature di allevamento non hanno altro valore che di far compiere in un tempo più o meno lungo un insieme di processi anabolici e catabolici il cui totale, per un dato periodo biologico, è sempre eguale (SPIRITO, loc. cit.). Perciò anche in tal caso, per una temperatura di allevamento più alta e quindi per un aumentato metabolismo, non c'è da attendersi un aumento di catalasi, così come per le temperature più basse non v'è da aspettarsi una diminuzione di essa: piuttosto i risultati ottenuti, che dimostrano invece rispettivamente una diminuzione ed un aumento del contenuto rilevabile all'analisi, portano un'altra conferma al mio modo di vedere.

RIASSUNTO

*L'ANAEROBIOSI
E I SUOI RAP-
PORTI ECC.*

L'Autore espone numerosi risultati suoi e di suoi allievi nei riguardi dei fenomeni di anaerobiosi. Dopo aver precisato le relazioni esistenti tra alcuni di essi e i fenomeni di fermentazione, l'Autore coordina vari esempi di vita in assenza di ossigeno libero nel quadro più ampio dei fenomeni aerobici. Vengono così considerati i rapporti tra anaerobiosi e sostanze a gruppi $-SH$ ed $-S-S-$; particolarmente studiata è stata inoltre la catalasi.

E dalle coordinazioni dei risultati ottenuti nei riguardi di quest'ultima è scaturita l'idea prospettata dall'Autore che la considera in funzione di un valore biologico diverso da quello finora attribuito; valore nuovo che si può indicare come quello di veicolo di ossigeno fin nell'intimo delle strutture cellulari.

97859



