

28. DORIANO CAVALLINI, LEONARDO TENTORI, BRUNO MONDOVI. — I chetoacidi nel sangue e nelle urine nell'avitaminosi B₁ del ratto.

Riassunto. — Gli AA. determinano mediante cromatografia di ripartizione su carta da filtro il contenuto in chetoacidi del sangue e delle urine di ratti maschi nel corso dell'avitaminosi B₁ sperimentale.

Nel sangue si verifica un aumento dell'acido piruvico in accordo con i dati comuni della bibliografia. Oltre a questo chetoacido aumentano notevolmente anche l'acido α -chetoglutarico ed un terzo chetoacido finora non identificato. Il livello ematico di questi composti si normalizza dopo somministrazione di vitamina B₁.

Nelle urine, contrariamente ai dati riportati nella letteratura, si ha un notevole aumento dell'acido α -chetoglutarico. L'acido piruvico con il metodo usato non compare in quantità determinabili, ed è quindi probabile che l'aumento constatato da altri AA. di questo composto nelle orine nel beri-beri sia in realtà dovuto all'aumento dell'acido α -chetoglutarico. Compare inoltre ed aumenta nel corso della carenza un chetoacido non identificato, la cui posizione nel cromatogramma differisce da quella del composto trovato nel sangue. Anche il contenuto in chetoacidi delle urine si normalizza dopo somministrazione di vitamina B₁.

Résumé. — Les Auteurs ont déterminé, par la chromatographie de répartition sur papier à filtre, le contenu en kétoacides dans le sang et dans les urines de rats mâles au cours de l'avitaminose B₁ expérimentale.

On constate dans le sang une augmentation de l'acide pyruvique, d'accord avec les données usuelles de la bibliographie. Outre cet acide, il y a augmentation aussi de l'acide-kétoglutarique et d'un troisième kétoacide, qui n'a pas été identifié jusqu'à présent. Le niveau hématique de ces composés se normalise après administration de vitamine B₁.

Dans les urines, à l'opposé des données rapportées dans la littérature, on a une augmentation considérable de l'acide α -kétoglutarique. L'acide pyruvique n'apparaît pas, par la méthode employée, en quantités dosables, et il est donc probable que l'augmentation constatée, par d'autres auteurs, dans les urines pendant le bériberi, est due en réalité à l'augmentation de l'acide α -kétoglutarique. On a constaté en outre l'apparition et l'augmentation, au cours de la carence, d'un kétoacide non identifié, dont la position dans le chromatogramme diffère de celle du composé trouvé dans le sang. Le contenu en kétoacides dans les urines se normalise aussi après administration de vitamine B₁.

S u m m a r. — The authors have determined the content of ketoacids in the blood of male rats during the course of an experimental B₁-avitaminosis.

In accordance with the literature an increase of pyruvic acid was formed. At the same time an increase of α -ketoglutaric acid and of a third yet unidentified ketoacid was found. After administration of Vitamin B₁ the concentration of these acids fell to the normal level.

Contrary to the reports in the literature, a considerable increase of α -ketoglutaric acid was found in the urine. Pyruvic acid, with the methods used, does not appear in measurable quantities and it is therefore probable that the apparent increase of pyruvic acid found by other authors was in reality due to an increase in α -ketoglutaric acid.

During the B₁ deficiency another unidentified ketoacid appears the position of which on the chromatogram differs from that of the compound found in the blood. After administration of B₁ the ketoacids in the urine, as do those of the blood, decrease to a normal level.

Zusammenfassung. — Haben mittels eines Chromatogramms auf Filterpapier den Ketonsäuregehalt im Blut und Harn einer männlichen Ratte im Verlauf eines Avitaminose B₁-Versuchs bestimmt. Entsprechend den Literaturangaben wies das Blut eine Zunahme an Piruvinsäure auf; ausser dieser Ketonsäure nimmt auch die Menge der α -Ketonglutarsäure und die einer dritten noch nicht identifizierten Ketonsäure zu. Nach Verabreichung von Vitamin B₁ erreichen diese Verbindungen im Blute wieder die normalen Werte.

Im Harn hingegen, im Gegensatz zu den Literaturangaben, nimmt die α -Ketonglutarsäure erheblich zu. Mit der angewandten Methode ist die Piruvinsäure nicht in nachweisbaren Mengen vorhanden; es ist daher wahrscheinlich dass die von anderen Forschern festgestellte Zunahme dieser Verbindung im Beri Beri auf die Zunahme der α -Ketonglutarsäure zurückzuführen ist. Im Verlauf der Avitaminose-Versuche erscheint eine andere noch nicht identifizierte Ketonsäure, deren Stellung im Chromatogramm von der im Blute gefundenen Verbindung verschieden ist. Auch der Ketonsäuregehalt im Harn wird nach Verabreichung von Vitamin B₁ normal.

Dopo le classiche ricerche di PETERS e coll., che portarono alla scoperta della funzione coenzimatica della vitamina B₁ e dei suoi derivati fosforilati nel metabolismo dell'acido piruvico, molti ricercatori si sono occupati di rintracciare questo composto nei liquidi biologici nel corso del beri-beri speri-

mentale e clinico, e di correlare le sue variazioni quantitative con lo stato di carenza o con la gravità della sintomatologia.

I metodi usati a questo scopo sono stati a preferenza il metodo al bisolfito di CLIFT e COOK (1) ed il metodo alla dinitrofenilidrazina di LU (2) con le sue numerose modificazioni. Il primo è un metodo generale con il quale si titolano la maggioranza dei composti aventi un radicale carbonilico o aldeidico, mentre il secondo limita il suo campo di azione a tutti quei composti che oltre ad avere un radicale carbonilico o aldeidico siano anche forniti di una o più funzioni acide. Certamente la specificità dei due metodi per l'acido piruvico è assai limitata, e considerando inoltre l'eventualità che la vitamina B₁ possa avere una funzione biologica assai più ampia nel campo dei chetoacidi che non quella di incidere unicamente sul metabolismo dell'acido piruvico (3), è del tutto ammissibile che l'aumento di questo composto come determinato coi metodi suddetti, e concordemente constatato in piena sintomatologia beriberica (4-6), non sia unicamente dovuto allo acido piruvico ma che vi concorrano altri composti dotati di proprietà analoghe e non differenziabili con i metodi finora impiegati.

Recentemente, facendo uso della cromatografia di ripartizione su carta da filtro, si è riusciti a separare e determinare individualmente un certo numero di chetoacidi di importanza biologica che con i metodi precedenti erano determinati in blocco come acido piruvico (7-9). Approfittando di questa nuova tecnica ci siamo proposti di riprendere in esame il problema dell'aumento dell'acido piruvico nell'avitaminosi B₁ in modo da stabilire in questo incremento quanto spetti realmente all'acido piruvico e quanto invece sia dovuto ad altri chetoacidi già presenti negli umori o che eventualmente vi possano apparire nel corso della carenza.

PARTE SPERIMENTALE.

Abbiamo condotto le nostre esperienze su un gruppo di ratti maschi, per evitare variazioni individuali legate al sesso (10), del peso di 50-70 g. La dieta aveva la seguente composizione:

Caseina (a)	20	Olio fegato di merluzzo	1	Ac. folico	mg.	2
Amido	45	Miscela vitaminica (c)		Colina	g	1
Strutto	19	in saccarosio		Miscela vitaminica (c)		
Saccarosio	10	Saccarosio	g 10	in olio di oliva		
Miscela salina (b)	4	Riboflavina	mg 20	Inositolo	»	0,4
Misc. vitaminica in saccarosio	1	Ac. nicotinico	» 100	Olio di oliva cc.		10
Misc. vitaminica in olio		Piridoxina	» 10	2, metil-1,4-naftochi.		
olio d'oliva	1	Ca pantotenato	» 50	none	mg.	10
		Ac. p-aminobenz	» 50	α-Tocoferolo	mg.	40

(a) Caseina purificata della ditta Piccioni, Brescia.

(b) Osborne Mendel.

(c) Vitamine cristallizzate: Merck, Roche, Erba.

Ogni sette giorni si prelevavano 4 ratti, si sacrificavano per decapitazione raccogliendo il sangue in un vaso contenente 10 cc. di una soluzione di NaPO_3 5% + 1,25 cc. HCl 2 N. Il recipiente e la soluzione erano pesati prima e dopo aggiunta di sangue e la differenza ci dava la quantità di sangue ottenuto (3-8 cc.). Agitata la soluzione per qualche tempo, si filtrava ed una aliquota del liquido limpido era trattata per la successiva determinazione cromatografica. Quattro coppie di animali erano tenute in gabbie metaboliche, ed ogni sette giorni si raccoglievano le urine delle 24 h. su 5 cc. HCl 2 N lavando, alla fine della raccolta, imbuto e fondo delle gabbiette con 50 cc. di acqua distillata, si diluiva quindi la soluzione a 100 o 200 cc. In palloncini tarati da 15 cc. contenenti 0,45 g NaPO_3 in polvere si ponevano 10 cc. della soluzione di urina, dopo dissoluzione ed aggiunta di 3 cc. HCl 2 N si portava al segno con acqua. 2 cc. del liquido filtrato erano trattati per l'esame cromatografico. Al 21° giorno di dieta dopo un notevole abbassamento del peso corporeo quando la maggior parte degli animali si trovava in piena sintomatologia polineuritica si iniettava intraperitonealmente un milligrammo di tiamina e si sostituiva la dieta con una della stessa composizione in cui nella miscela vitaminica in saccarosio erano aggiunti 10 mg. di tiamina. Indipendentemente da questi animali le determinazioni erano eseguite anche su altri che mostravano la sintomatologia beri-berica dopo i 21 giorni di dieta. Per i dati tecnici riguardanti l'applicazione del metodo cromatografico alla determinazione dei chetoacidi rimandiamo agli articoli già apparsi (7-9). Come solvente era usata la miscela butanolo-etanolo 20%.

RISULTATI.

Il cromatogramma dei chetoacidi del sangue di ratto normale rivela la presenza di tre chetoacidi; il primo con $R_f = 0,26$ è stato identificato come acido α -chetoglutarico; il secondo con $R_f = 0,36$ come acido piruvico ed il terzo con $R_f = 0,55$ non è stato ancora identificato. Quest'ultimo composto è stato rivelato nelle tre specie animali finora saggiate, uomo, ratto, cavallo; talora è presente in quantità meno abbondanti, e ricerche sono in corso per definirne la composizione. Come si può osservare dal diagramma, in accordo con i dati di precedenti AA., l'acido piruvico aumenta notevolmente nel corso della avitaminosi fino a giungere dai 0,44 mg % di partenza a dei valori di 6,42-7,16 mg% all'apparire dei sintomi di carenza. I valori si abbassano notevolmente dopo cura con tiamina. Oltre a questo chetoacido aumenta notevolmente anche l'acido α -chetoglutarico, sebbene l'incremento non raggiunga quello dell'acido piruvico, e precisamente in questo caso da 0,84 mg% si giunge a 2,34 — 3,15 mg%, ed è anche qui evidente l'effetto della vitamina B_1 nel riportare a valori vicini alla norma il tasso ematico

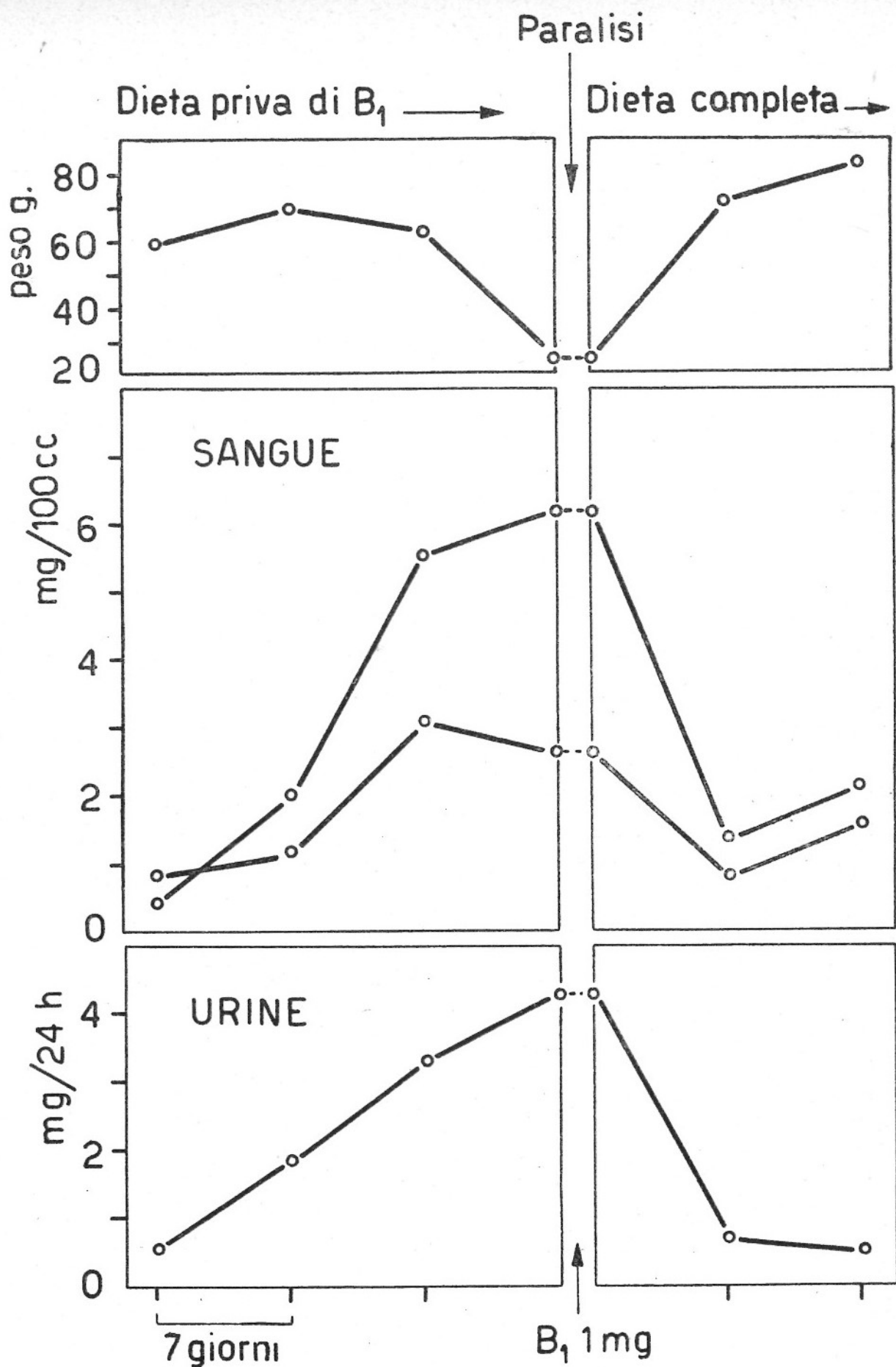


FIG. 1. — Chetoacidi nel sangue e nelle urine di ratto in avitaminosi B₁.

Nel sangue aumentano 3 chetoacidi: acido piruvico, linea superiore; acido α -chetoglutarico, linea inferiore; un composto sconosciuto che non compare nella grafica (vedi testo). Nelle urine aumenta solo l'acido α -chetoglutarico; un chetoacido sconosciuto compare dopo la prima settimana (vedi testo); l'acido piruvico non è apprezzabile in quantità sufficienti all'analisi. In testa alla grafica è riportato il comportamento del peso degli animali nelle stesse condizioni.

di questo composto. Il terzo chetoacido ha un comportamento assai simile ai precedenti, potremmo dire intermedio fra i due, cioè aumenta nel corso della carenza più del chetoglutarico e meno del piruvico, ma ha la peculiarità di essere talora assente nel sangue di quegli animali con quadro polineuritico inoltrato. Questo fatto potrebbe essere messo in rapporto con lo stato di nutrizione degli animali in quanto è noto che dopo un periodo di avitaminosi B₁ interviene una forte anoressia e lo stato di paralisi aggrava ancor più questa condizione impedendo completamente all'animale di nutrirsi.

Numerosi lavori riportano le variazioni della concentrazione dell'acido piruvico nelle urine di ratto in avitaminosi B₁ (10-13) e gli A.A. sono tutti d'accordo nell'ammettere un aumento di questa sostanza in rapporto allo stato di carenza della vitamina. I dati da noi ottenuti e controllati più volte ci autorizzano a dichiarare inesatto questo concetto che ormai è riportato anche in numerosi trattati. Nelle urine di ratto normale esistono soltanto tracce di acido piruvico ed il nostro metodo, che finora è il più idoneo a tale tipo di ricerca, ne rivela delle quantità assai scarse.

L'acido α -chetoglutarico è eliminato in maggior copia, ed è questo composto che aumenta nella avitaminosi. Evidentemente quello che i precedenti A.A. riportano come acido piruvico con metodi non specifici è in massima parte acido α -chetoglutarico. Anche negli stati più avanzati di carenza e quando la sintomatologia beri-berica è in pieno sviluppo, quando cioè l'acido piruvico, presente normalmente nelle urine, dovrebbe aumentare in rapporto alla aumentata piruvicoemia, non si rileva alcuna variazione di questo composto. Al contrario dopo la prima settimana di dieta compare un'altra sostanza avente tutti i caratteri di un chetoacido che nel cromatogramma occupa una posizione subito al disotto del chetoglutarico ed avente una $R_f = 0,32$. Questo composto aumenta con il progredire della carenza ma può essere assente alla fine di essa, quando cioè gli animali si trovano in contrattura polineuritica. L'acido α -chetoglutarico torna a valori pressochè normali dopo cura con tiamina e passaggio alla dieta sintetica completa; anche il secondo composto non identificato non è più reperibile negli animali curati.

Il comportamento peculiare dei due chetoacidi non identificati trovati nel sangue e nelle urine, il rapporto di dipendenza che essi mostrano con lo stato carenziale, l'impossibilità che abbiamo incontrato finora di poterli identificare con qualcuno dei composti più noti di questo gruppo, sono tutti dati che concorrono a rendere attraente il problema della loro identificazione per via analitica. Potendo superare le difficoltà tecniche inerenti a tale lavoro ci proponiamo di tornare sull'argomento in un prossimo futuro.

Come conclusione possiamo affermare che la carenza di vitamina B₁ determina nel ratto maschio un aumento nel sangue di acido piruvico e di acido α -chetoglutarico, che nelle urine aumenta, in rapporto allo stato carenziale, solo l'acido α -chetoglutarico, ed inoltre che due composti non identificati, aventi tutti i caratteri dei chetoacidi, aumentano in queste stesse condizioni nel sangue e nelle urine, e che il loro comportamento differisce dagli altri in quanto possono anche mancare negli ultimi stadi della avitaminosi, quando cioè gli animali si trovano in avanzata sintomatologia polineuritica.

Roma, Centro di studio per la Fisiopatologia. Istituto di Patologia Generale della Università, - Laboratorio di Biologia. Istituto Superiore di Sanità, 19 dicembre 1949.

BIBLIOGRAFIA

- 1) CLIFT, F. P. COOK, R. P.: *Biochem. J.* 26, 1788 (1932).
 - 2) LU, G. D.: *Biochem. J.* 33, 249 (1939).
 - 3) GREEN, D. E., WESTERFELD, W. W., VENNESLAND, B., KNOX, W. E.: *J. Biol. Chem.* 145, 69 (1942).
 - 4) THOMPSON, R. H. S., JOHNSON, R. E.: *Biochem. J.* 29, 694 (1935).
 - 5) LU, G. D., *Biochem. J.* 33, 774 (1939).
 - 6) STOZZ, E., BESSEY, O. A.: *J. Biol. Chem.* 143, 625 (1942).
 - 7) CAVALLINI, D., FRONTALI, N., TOSCHI, G.: *Nature*, 163, 568 (1949).
 - 8) CAVALLINI, D., FRONTALI, N., TOSCHI, G.: *Nature*, 165, 568 (1949).
 - 8) CAVALLINI, D., FRONTALI, N., TOSCHI, G.: *Ric. Scient.* 19, 208 (1949).
 - 9) CAVALLINI, D., FRONTALI, N., TOSCHI, G.: *Nature*, 164, 792 (1949).
 - 10) HARPER, H. A., DEUEL, H. J.: *J. Biol. Chem.* 317, (1941).
 - 11) BANERJI, G. C., HARRIS, L. J., *Biochem. J.* 33, 1346 (1939).
 - 12) SHILS, M., DAY, H. G., MC COLLUM, E. V.: *Science*, 91, 341 (1940).
 - 13) SHILS, M., DAY, H. G., MC COLLUM, E. V.: *J. Biol. Chem.* 139, 145 (1941).
-