14. L. TENTORI e G. VIVALDI. — **La vitamina B_{12} ed il fattore intrinseco antipernicioso nella anemia macrocitica sperimentale del ratto carente di acido folico (*).**

Riassunto. — Un lotto di 56 ratti albini che presentavano una anemia macrocitica da carenza di acido folico è stato suddiviso in 7 gruppi a ciascuno dei quali è stato assegnato uno dei seguenti trattamenti: 1) 0,5 μg di vitamina B_{12} ogni tre giorni per via intramuscolare; 2) μg 0,05 di vitamina B_{12} per via intramuscolare ogni tre giorni; 3) μg 15 di vitamina B_{12} per via orale ogni tre giorni; 4) μg 0,75 di vitamina B_{12} per via orale ogni tre giorni; 5) cc 2 di succo gastrico umano normale per via orale ogni tre giorni; 6) μg 0,75 di vitamina B_{12} + cc 2 di succo gastrico umano normale per via orale ogni tre giorni; 7) μg 250 di acido folico per via intramuscolare ogni settimana. Soltanto con la dose di 0,5 μg di vitamina B_{12} per via intramuscolare e con quella di 15 μg per via orale è stato osservato un miglioramento del quadro ematologico carenziale paragonabile a quello che si osserva in seguito alla somministrazione di 250 μg di acido folico alla settimana; tutte le altre dosi di vitamina B_{12} somministrate sia per via parenterale che per via orale da sola o unita a succo gastrico umano normale, non hanno dimostrato alcuna attività.

Résumé. — 56 rats albinos qui avaient d'une anémie macrocytique due à une carence d'acide folique ont été divisés en 7 groupes qu'on a soumis respectivement aux traitements suivants:
1) 0,5 μg de vitamine B_{12} tous les trois jours par voie intramusculaire; 2) 0,05 μg de vitamine B_{12} par voie intramusculaire tous les trois jours; 3) 15 μg de vitamine B_{12} par voie orale tous les trois jours; 4) 0,75 μg de vitamine B_{12} par voie orale tous les trois jours; 5) 2 cc. de suc gastrique humain normal par voie orale tous les trois jours; 6) 0,75 μg de vitamine B_{12} + 2 cc. de suc gastrique humain normal par voie orale tous les trois jours; 7) 250 μg d'acide folique par voie intramusculaire toutes les semaines. Ce n'est qu'avec la dose de 0,5 μg de vitamine B_{12} par voie intramusculaire et avec celle de 15 μg par voie orale qu'on a pu constater une amélioration dans le tableau hématologique de carence comparable à celle observée après l'administration de 250 μg d'acide folique par semaine; toutes les autres doses de vitamine B_{12} administrées, soit par

---

(*) Comunicazione presentata all'XI Congresso della Società Italiana di Ematologia - Roma, 10-11 maggio 1953.

voie intramusculaire, soit par voie orale, seule ou mêlée avec du suc gastrique humain normal, n'ont manifesté aucune activité.

Summary. — The Authors have obtained a folic acid deficiency in rats fed with a purified synthetic diet to which 2% of succinilsulfathiazole was added. Fifty six animals were selected and divided into seven groups on which the therapeutic activity of the following substances was tested: Group 1: Vitamin B_{12} 0,05 μg intramuscurarly every three days; Grup 2: Vitamin B_{12} 0,5 μg intramuscularly every three days; Group 3: Vitamin B_{12} 0,75 μg orally every three days; Group 4: Vitamin B_{12} 15 μg orally every three days; Group 5: human normal gastric juice 2 ml orally every three days; Group 6: Vitamin B_{12} 0,75 μg + human normal gastric juice 2 ml orally every three days; Group 7: Folic acid 250 μg intramuscularly every seven days. Vitamin B_{12} administered intramuscularly at the dose of 0,5 μg and orally at the dose of 15 μg, has shown a good therapeutic activity. On the other hand the administration of 0,05 μg of the vitamin intramuscularly resulted in a very slight improvement of the hematological symptoms of the deficiency. No action was observed with the oral administration of 0,75 μg of vitamin B_{12} by itself or mixed with human normal gastric juice.

Zusammenfassung. — Eine Gruppe von 56 weissen Ratten mit Makrozyten-anaemie infolge Folsäuremangels wurde in 7 Unterabteilungen im einzelnen wie folgt behandelt:
1.) 0,5 μg Vitamin B_{12}, intramuskulär, alle 2 Tage. 2.) 0,05 μg Vitamin B_{12} intramuskulär, alle 3 Tage. 3.) 15 μg Vitamin B_{12} per os, alle 3 Tage. 4.) 0,75 μg Vitamin B_{12} per os, alle 3 Tage. 5.) 2 cc normalen menschlichen Magensafts per os, alle 3 Tage. 6.) 0,75 μg Vitamin B_{12} + 2 cc normalen menschlichen Magensafts per os, alle 3 Tage. 7.) 250 μg Folsäure intramuskulär jede Woche. Lediglich bei den mit der Dosis von 0,5 μg Vitamin B_{12} intramuskulär und von 15 μg per os behandelten Tieren konnte eine Besserung, des Mangelblutbildes gestgestellt werden, ähnlich wie man es nach Verabfolgung von 250 μg Folsäure pro Woche beobachtet. Alle anderen Dosen von Vitamin B_{12} sowohl die parenteralen wie die per os verabfolgten, allein oder zusammen mit normalem menschlichem Magensaft, haben keinerlei Wirkung gezeitigt.

Nel corso di una serie di ricerche precedenti ([1, 2, 3, 4, 5]) abbiamo studiato l'anemia sperimentale provocata nel ratto con una dieta altamente purificata carente di acido folico contenente volta a volta streptomicina, solfonamidoguanidina, e succinilsulfatiazolo quali inibitori della flora intestinale responsabile della sintesi di questo fattore. Dai risultati di queste ricerche abbiamo potuto concludere che questo tipo di anemia sperimentale presenta delle strette analogie con le anemie sperimentali provocate, con una tecnica analoga, nel pulcino ([6, 7]), nel maiale ([8, 9]), nell'ermellino e nella volpe ([10]), e con le anemie nutrizionali macrocitiche e megaloblastiche dell'uomo sia per il quadro ematologico, sia per il comportamento in risposta alla somministrazione terapeutica di alcune sostanze.

Nel presente lavoro abbiamo studiato l'attività, su questa anemia, della vitamina B_{12} somministrata a varie dosi per via parenterale e per via orale da sola o contemporaneamente a succo gastrico umano normale.

Un gruppo di 56 ratti albini sono stati alimentati con la dieta carente di acido folico di Black, Mc Kibbin ed Elvehjem ([11]) addizionata del 2% di succinilsulfatiazolo, e, quando hanno raggiunto un chiaro grado di carenza, sono stati suddivisi in 7 gruppi a ciascuno dei quali è stato assegnato uno dei seguenti trattamenti:

1) Vitamina B_{12} 0,05 μg ogni tre giorni per via intramuscolare;
2) Vitamina B_{12} 0,5 μg ogni tre giorni per via intramuscolare;
3) Vitamina B_{12} 0,75 μg ogni tre giorni per via orale;
4) Vitamina B_{12} 15 μg ogni tre giorni per via orale;
5) Succo gastrico umano normale cc 2 ogni tre giorni;
6) Vitamina B_{12} 0,75 μg + succo gastrico umano normale 2 cc ogni tre giorni;
7) Quest'ultimo gruppo riceveva per controllo 250 μg di acido folico alla settimana per via intramuscolare.

---

(1) Tentori L., Vivaldi G.: Proc. Int. Soc. Hem., 1950, pg. 49.
(2) Tentori L., Vivaldi G.: Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., *78*, 375, 1951.
(3) Tentori L., Vivaldi G.: Compt. Rend., III Cong. Soc. Int. Eur. Hem., Rome, Oct., 1951, pg. 515.
(4) Tentori L., Vivaldi G.: Rend. Ist. Sup. Sanità, in corso di stampa.
(5) Tentori L., Vivaldi G.: Rend. Ist. Sup. Sanità, in corso di stampa.
(6) O'Dell B. L., Hogan A. G.: J. Biol. Chem., *149*, 323, 1943.
(7) Stokstad E. L. R., Jukes T. H.: Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., *62*, 112, 1946.
(8) Cartwright G. E., Fay J., Tatting B., Wintrobe M. M.: J. Lab. Clin. Med., *22*, 397, 1948.
(9) Cuhna T. J., Colby R. W., Bustad L. K., Bone J. F.: J. Nutrition, *36*, 215, 1948.
(10) Tove S. B., Schefer A. E., Elvehjem C. A.: J. Nutrition, *38*, 215, 1948.
(11) Black S., Mc Kibbin J. M., Elvehjem C. A.: Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., *47*, 308, 1941.

I dati ematologici presi in considerazione sono stati: emoglobina espressa in grammi per cento cc; globuli rossi e globuli bianchi per mm^3 ed ematocrito; partendo da questi dati sono stati calcolati il volume globulare medio espresso in μ^3 e l'emoglobina media per eritrocita espressa in mμg..

Come appare dai dati che sono riportati nei grafici e nella tabella, con la somministrazione della vitamina B_{12} si è ottenuta una risposta quasi altrettanto pronta ed intensa come quella ottenuta con l'acido folico soltanto nel gruppo che ha ricevuto per via intramuscolare 0,5 μg ogni tre giorni. La dose più bassa, di μg 0,05 ogni tre giorni per via intramuscolare ha dimostrato una attività modesta e di assai scarsa significatività statistica. Per via orale la dose estremamente alta di 15 μg ogni tre giorni ha dimostrato di possedere una efficacia relativamente buona sui sintomi ematologici della carenza, mentre la dose più bassa somministrata sia da sola sia contemporaneamente a succo gastrico umano normale non ha dimostrato alcuna attività. Ovviamente anche il fattore intrinseco contenuto nel succo gastrico umano somministrato da solo non ha esplicato alcuna attività.

Allo scopo di valutare comparativamente i dati ottenuti nel nostro esperimento è opportuno tenere presente che, in rapporto al peso corporeo, le dosi di vitamina B_{12} somministrate avrebbero, per un uomo di taglia normale, la seguente corrispondenza:

μg 0,05 ogni tre giorni per via intramuscolare equivalgono a μg 7,7 al giorno;
μg 0,5 ogni tre giorni per via intramuscolare equivalgono a μg 77 pro die;
μg 15 ogni tre giorni per via orale equivalgono a μg 2333 pro die;
μg 0,75 ogni tre giorni per via orale equivalgono a μg 115,5 pro die;
cc 2 di succo gastrico ogni tre giorni per via orale equivalgono a cc 323 pro die.

L'esperienza clinica di questi ultimi anni ha dimostrato che tutte queste dosi di vitamina B_{12} sono efficaci nell'anemico pernicioso; perfino quella di 115 μg somministrata da sola per via orale: sono riportati infatti in letteratura buoni risultati anche con dosi inferiore ([12, 13, 14]).

Da questi risultati è possibile trarre le seguenti conclusioni:

1) La vitamina B_{12} ha efficacia terapeutica sulla anemia sperimentale da carenza di acido folico nel ratto in dosi superiori a quelle

---

([12]) Meyer L. M., Sawitsky A., Fink H., Ritz N. D., Krim M.: Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 75, 366, 1950.
([13]) Ungley C. C.: Brit. Med. J., ii, 905, 1950.
([14]) Hall B. E.: Brit. Med. J., ii, 585, 1950.

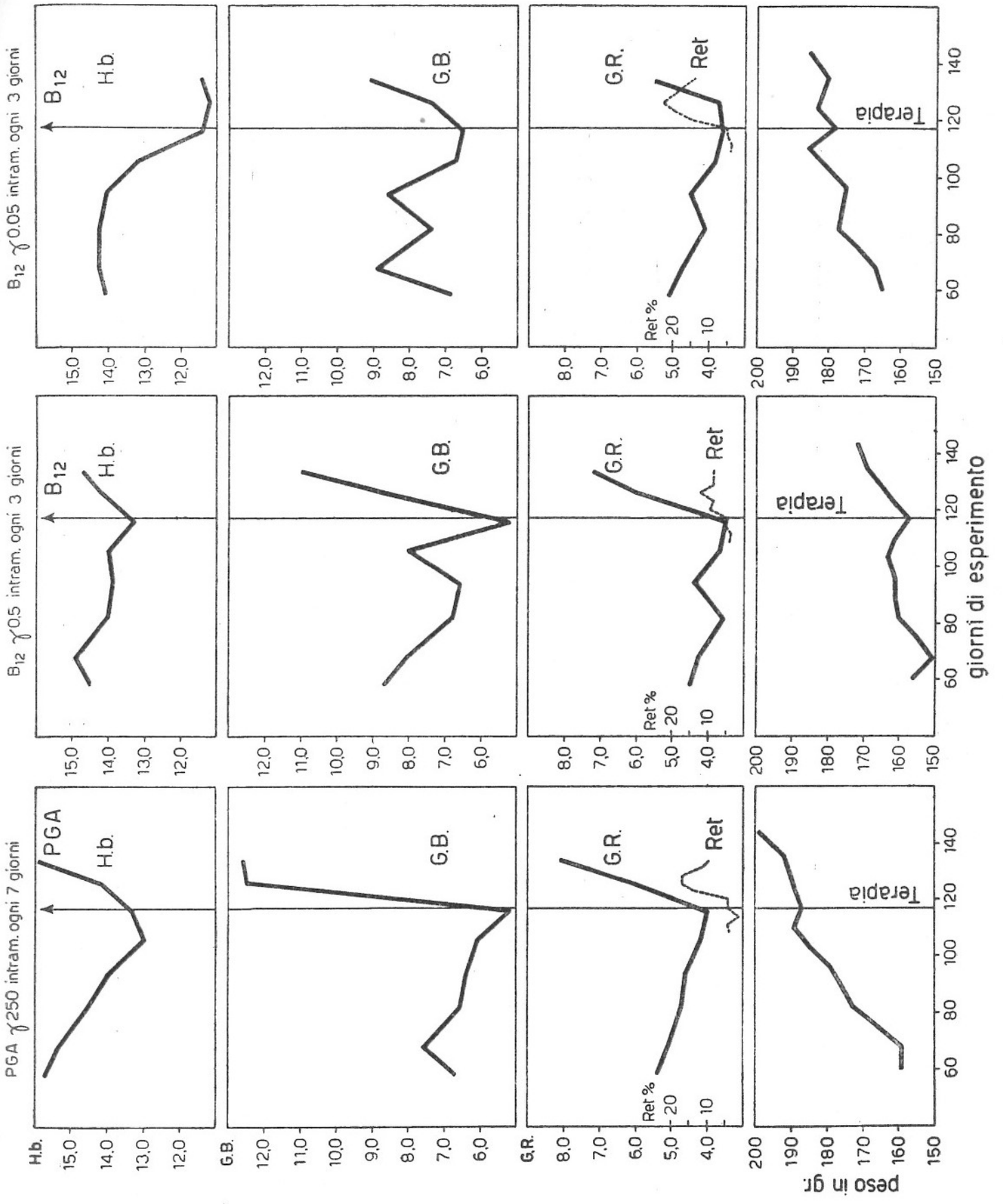

GRAFICO I

Variazioni di alcuni dati ematologici di ratti carenti di acido folico in seguito a somministrazione di vitamina B_{12} per via intramuscolare (Le curve sono costruite su valori medi).

Hb = Emoglobina espressa in g./100 cc.
GR — Globuli rossi × 10^6/mmc.
GB = Globuli bianchi × 10^3/mmc.
Ret = Reticolociti per 100 cellule.

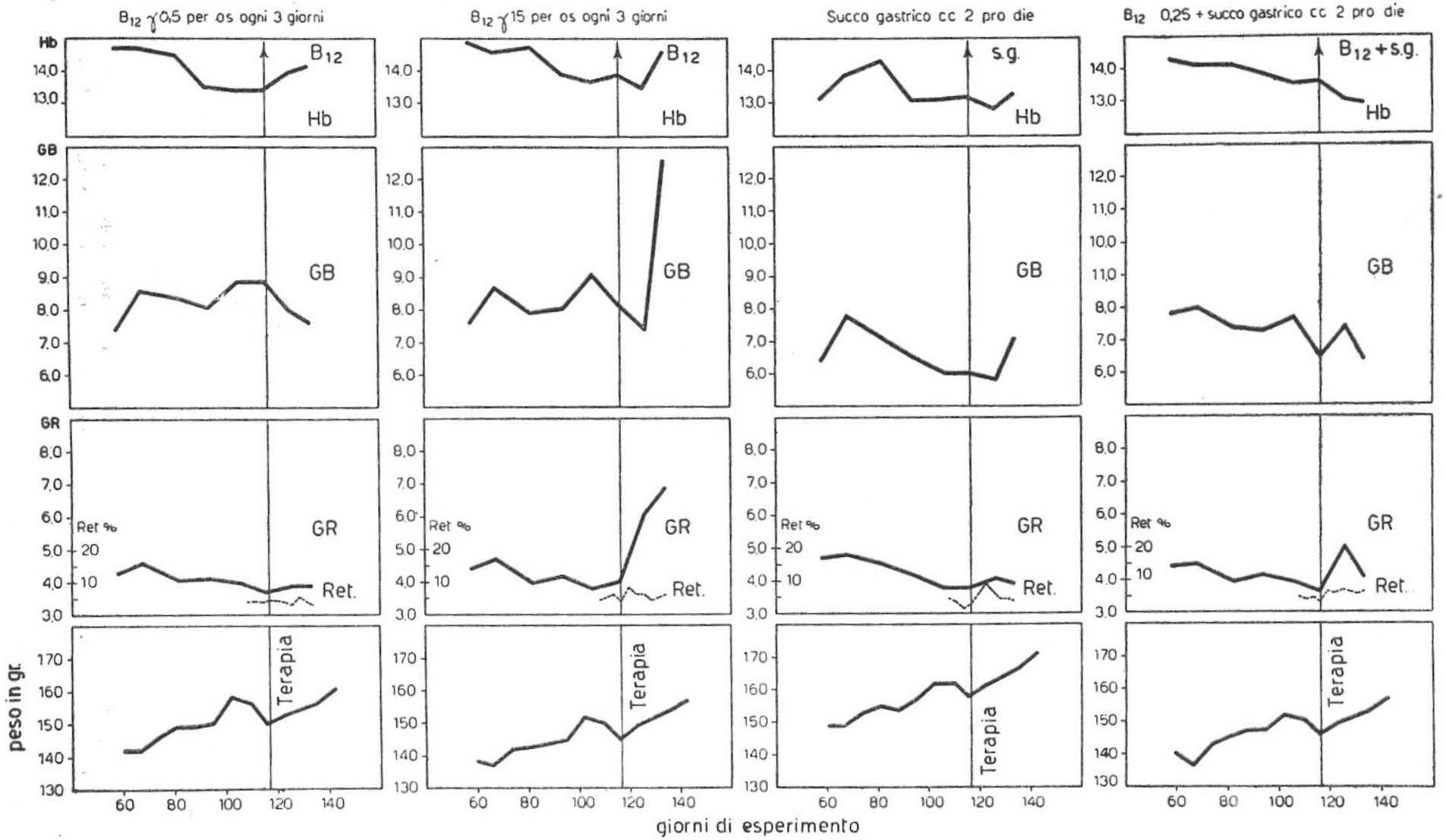

GRAFICO II

Variazioni di alcuni dati ematologici di ratti carenti di acido folico in seguito a somministrazione di vitamina B_{12} e di succo gastrico umano normale separatamente o insieme per via orale. (Le curve sono costruite su valori medi).

Hb = Emoglobina espressa in g./100 cc.
GR — Globuli rossi × 10^6/mmc.
Ret = Reticolociti per 100 cellule.
GB = Globuli bianchi × 10^3/mmc.

GRUPPI	MASSIMA CARENZA						DOPO TRATTAMENTO					
	Hb	GR	GB	Hm	MCV	MCHb	Hb	GR	GB	Hm	MCV	MCHb
C	10.4 ± 1.35	3.6 ± 0.43	6.5 ± 0.13	37 ± 2.10	96.5 ± 5.63	28.9 ± 2.25	11.4 ± 1.09	5.5 ± 0.63	9.1 ± 3.08	35 ± 3.78	72.4 ± 6.24	21.1 ± 1.68
D	13.3 ± 0.95	3.5 ± 0.36	5.2 ± 2.86	42 ± 3.56	117.1 ± 7.78	37.5 ± 2.07	13.7 ± 0.53	7.2 ± 0.29	11.0 ± 0.45	42 ± 2.97	59.2 ± 1.25	19.2 ± 1.07
E	13.4 ± 0,82	3.7 ± 0.25	8.9 ± 1.39	42.7 ± 1.39	115 ± 1.95	36.2 ± 2.08	14.1 ± 0.69	3.9 ± 0.29	7.6 ± 1.28	42 ± 1.41	106.8 ± 5.12	36 ± 2.01
F	13.9 ± 0.41	4.0 ± 0.35	8.2 ± 0.97	41 ± 0.25	102.4 ± 2.20	34.3 ± 117	13.0 ± 0.89	6.9 ± 0.50	12.6 ± 1.57	40 ± 2.61	58 ± 1.31	18.7 ± 0.85
G	14.5 ± 4.51	3.8 ± 0.35	6.0 ± 0.90	43 ± 1.47	113 ± 10.9	38.1 ± 2.65	13.3 ± 0.51	3.9 ± 0.37	7.1 ± 0.25	41 ± 1.97	106 ± 7.24	34.1 ± 2.21
H	13.6 ± 1.84	3.6 ± 0.85	6.5 ± 0.72	43 ± 1.01	116.2 ± 7.38	37.7 ± 1.26	12.9 ± 4.57	4.1 ± 0.33	6.4 ± 0.54	41 ± 2.61	105.6 ± 6.23	31.7 ± 4.53
I	13.3 ± 2.84	4.0 ± 0.25	5.2 ± 1.28	49 ± 1.53	119 ± 5.33	36.3 1.82	15.9 ± 0.72	8.1 ± 0.14	12.6 ± 1.39	50.5 ± 5.84	62.2 ± 1.34	19.2 ± 0.92

GRUPPO C - TERAPIA : *vitamina B_{12} γ 0.05 intramuscolare ogni tre giorni.*

GRUPPO D - TERAPIA : *vitamina B_{12} γ 0.5 intramuscolare ogni tre giorni.*

GRUPPO E - TERAPIA : *vitamina B_{12} γ 0.75 per os ogni tre giorni.*

GRUPPO F - TERAPIA : *vitamina B_{12} γ 15 per os ogni tre giorni.*

GRUPPO G - TERAPIA : *succo gastrico umano normale cc 2 per os ogni tre giorni.*

GRUPPO H - TERAPIA : *vitamina B_{12} γ 0.75 + succo gastrico umano normale cc 2 per os ogni tre giorni.*

GRUPPO I - TERAPIA : *acido pteroilglutamico 250 γ alla settimana intramuscolare.*

TABELLA I — *Variazioni di alcuni dati ematologici di ratti carenti di acido folico in seguito a somministrazione di vitamina B_{12} per via orale o intramuscolare da sola o unita a succo gastrico umano normale.*

Hb = Emoglobina espressa in grammi/100 cc.
GR = Globuli rossi × 10^6/mmc.
GB = Globuli bianchi × 10^3/mmc.
Hm = Ematocrito %.
MCV = Volume globulare medio espresso in μ^3
MCHb = Emoglobina media per eritrocito espressa in mμg

Errore standard = $\sqrt{\frac{Sy^2}{n(n-1)}}$

che, sempre in rapporto al peso corporeo, sono efficaci nell'anemia perniciosa umana. Infatti la dose di 0,05 μg ogni tre giorni equivalente a μg 7,7 al giorno, non ha dimostrato che scarsa efficacia, e per ottenere una risposta ottimale è stato necessario somministrare una dose 10 volte superiore.

2) Anche nell'anemia così provocata esiste una chiara differenza tra le dosi attive di vitamina B_{12} a seconda che queste vengano somministrate per via parenterale o per via orale. Infatti la dose di μg 0,75 ogni tre giorni somministrata per via orale, non ha modificato il quadro anemico carenziale, mentre 0,5 μg ogni tre giorni hanno dimostrato, una attività ottimale somministrati parenteralmente.

3) Per ottenere un risultato positivo con la somministrazione per via orale della vitamina è necessario forzare di molto il dosaggio.

4) Il fattore intrinseco presente nel succo gastrico umano normale non è capace di potenziare l'efficacia della vitamina B_{12} somministrata contemporaneamente per via orale in questa anemia sperimentale.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia.