

12. R. ANGELICO e M. QUINTILIANI. — **Cortisone e acido pantotenico nella gluconeogenesi del ratto surrenectomizzato.**

**Riassunto.** — Gli AA. studiano l'influenza dell'acido pantotenico sulla azione gluconeogenetica del cortisone nei ratti surrenectomizzati. Ricontrano negli animali carenti un diminuito grado di sensibilità alla azione del cortisone e una inibizione di questa pur diminuita risposta quando insieme al cortisone viene somministrato il pantotenato di calcio. Prospettano delle possibili interpretazioni dei fatti osservati.

**Résumé.** — Les auteurs étudient l'influence de l'acide pantothénique sur l'action gluconeogénétique du cortisone chez les rats surrenectomisés. Ils relèvent chez les animaux en carence une diminution du degré de sensibilité à l'action du cortisone et une inhibition même de cette réponse réduite quand avec le cortisone on administre en même temps du pantothénate de calcium. Ils exposent les possibles interprétations des faits observés.

**Summary.** — The influence of pantothenic acid on the gluconeogenic action of cortisone in adrenalectomized rats has been studied. It was found that in deficient animals there is a decreased sensibility to the cortisone action and an inhibition of this decreased response when Ca-pantothenate with cortisone is administered. Possible interpretations are discussed.

**Zusammenfassung.** — Verff. untersuchen den Einfluss der Pantotensäure auf die glukoneogenetische Wirkung des Kortisons auf nebenierenlose Ratten. Sie finden in den Mangeltieren einen verminderten Grad von Empfindlichkeit gegenüber der Kortisonwirkung und eine Hemmung seiner ebenfalls herabgesetzten Reaktion, wenn zusammen mit dem Kortison, Ca-Pantotenat verabfolgt wird. Einige mögliche Erklärungsversuche der beobachteten Tatsachen werden besprochen.

---

In una nota precedente <sup>(1)</sup> abbiamo comunicato i risultati di ricerche intorno alla influenza dell'acido pantotenico sul contenuto in glicogeno del fegato di ratti carenti surrenectomizzati, intraprese traendo

---

(<sup>1</sup>) Boll. Soc. It. Biol. Sper., 28, 1713, 1952.

lo spunto dagli studi di DUMM e RALLI (2), recentemente confermati da GRANADOS e VERZAR (3) sulla capacità del pantotenato di calcio di prolungare la sopravvivenza dei ratti dopo la surrenectomia. Tale azione è stata interpretata dagli AA. come effetto di una possibile influenza correttiva dell'acido pantotenico sul metabolismo idrosalino e su quello degli idrati di carbonio, entrambi profondamente alterati dalla surrenectomia.

Ci sembrò allora interessante approfondire il secondo punto di questa interpretazione dato il ruolo fondamentale che l'acido pantotenico riveste nel metabolismo intermedio dei carboidrati, come costituente del coenzima A, identificato da LIPMANN nel 1945 (4) e ormai ampiamente studiato nella sua costituzione e attività.

Le prove da noi rese note erano state eseguite somministrando il pantotenato di calcio con le stesse modalità impiegate per il dosaggio biologico dei corticosteroidi glicoattivi (5, 6). Dai risultati allora ottenuti constatammo che nei ratti surrenectomizzati dopo 32 giorni di carenza il digiuno provocava una caduta del tasso glicemico e del glicogeno epatico dello stesso ordine di grandezza di quella che comunemente si riscontra in animali normali surrenectomizzati, e che la somministrazione di 8 mg di pantotenato di calcio non mostrava influenza nè sul tasso glicemico, nè sul contenuto del fegato in glicogeno.

Tale reperto era in qualche modo in contraddizione con altre osservazioni di DUMM e RALLI (7), secondo le quali sottoponendo al test del nuoto ratti surrenectomizzati e trattati con acido pantotenico non si riscontrava l'ipoglicemia che comunemente si ottiene in questa prova. L'acido pantotenico in questa condizione di emergenza sembrava normalizzare la risposta dell'organismo alla urgente richiesta di carboidrati, alla quale nell'animale intatto gli ormoni della corteccia surrenale rispondono inducendo una gluconeogenesi dalle proteine endogene.

L'azione protettiva dell'acido pantotenico riscontrata da DUMM e RALLI non può essere interpretata come di natura analoga a quella degli 11-ossicorticoidi; ma probabilmente attraverso meccanismi finora non sufficientemente chiariti: secondo recentissime idee di GRANADOS e VERZAR (3), ad esempio, l'acido pantotenico sarebbe capace di riattivare nel ratto surrenoprivo alcune reazioni enzimatiche depresse in seguito alla surrenectomia.

---

(2) *Endocrinology*, 39, 225, 1946.

(3) *Int. Zeitschr. f. Vitforsch.*, 24, 403, 1952.

(4) *J. Biol. Chem.*, 160, 173, 1945.

(5) REINICKE R. M., KENDALL E. C.: *Endocrinology*, 31, 573, 1942.

(6) OLSON R. E., JACOBS F. A., RICHERT D., THAYER S. A., KOPP L. J., WADE N. J.: *Endocrinology*, 35, 430, 1944.

(7) *Endocrinology*, 43, 283, 1948.

Le strette relazioni intercorrenti fra acido pantotenico e funzione surrenale sono ormai dimostrate da una vasta mole di ricerche morfologiche (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14.) e funzionali (15, 16, 17, 18, 19). Gravi alterazioni strutturali e citochimiche facilmente si riscontrano nei surreni degli animali carenti. Secondo una ipotesi sostenuta da DEANE e MCKIBBIN (13) e da HURLEY e MORGAN (20) lo stato di carenza agirebbe come un « alarming agent » per il ratto, causando una scarica di ACTH che stimolerebbe i surreni a secernere ormoni corticali fino all'esaurimento; secondo WINTERS e coll. (19, 21), invece, l'acido pantotenico potrebbe ricoprire nell'animale intatto un ruolo importante nella biosintesi del colesterolo e degli steroidi surrenalici.

Accertato dunque che nello stato di carenza di acido pantotenico si stabilisce un deficit della funzione surrenale, ci è sembrato utile indagare se il ratto carente privato del surrene fosse in grado, come il ratto non carente surrenectomizzato, di rispondere adeguatamente ad una determinata categoria di ormoni corticali. In altre parole si trattava di stabilire se oltre alla compromissione della funzione surrenale esistesse nell'organismo dell'animale carente una alterata sensibilità di fronte agli steroidi surrenalici.

Abbiamo pertanto somministrato ad animali surrenectomizzati un ammontare fisso di 17-idrossi, 11-corticosterone saggiandone la risposta in assenza e in presenza di acido pantotenico.

Le prove sono state eseguite surrenectomizzando un gruppo di ratti tenuti per 32 giorni a dieta carente di acido pantotenico ed un secondo gruppo di animali, ugualmente alimentati, ma con una adeguata integrazione giornaliera di pantotenato di calcio. I risultati ottenuti sugli animali carenti sono già stati resi schematicamente noti nella precedente comunicazione, ma preferiamo, per comodità di confronto, inquadrarli nel complesso delle esperienze.

(8) GYÖRGY P., GOLDBLATT H., MILLER F. R., FULTON R. P.: J. Exper. Med., 66, 579, 1937.

(9) MORGAN A. F., SIMMS H. D.: Science, 89, 363, 1939.

(10) DAFT F. S., SEBRELL W. H.: Pub. Health Rep. U.S.P.H.S., 54, 2247, 1939.

(11) NELSON A. A.: Pub. Health Rep. U.S.P.H.S., 54, 2230, 1939.

(12) ASHBURN L. L.: Pub. Health Rep. U.S.P.H.S., 55, 4337, 1940.

(13) DEANE H. W., MCKIBBIN J. M.: Endocrinology, 38, 385, 1946.

(14) DEMPSEY E. W., WISLOCKI G. B.: Physiol. Rev., 26, 1, 1946.

(15) OLSON R. E., KAPLAN N. O.: J. Biol. Chem., 175, 545, 1948.

(16) DUMM M. E., OVANDO P. R., RALLI E. P.: Proc. Soc. Exp. Biol. a Med., 71, 368, 1949.

(17) GAUNT R., LILING M., MUSHETT C. W.: Endocrinology, 38, 427, 1949.

(18) MELAMPY R. M., CHENG D. W., NORTROP L. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. a Med., 76, 24, 1951.

(19) WINTERS R. W., SCHULTZ R. B., KREHL W. A.: Endocrinology, 50, 377 e 388, 1952.

(20) HURLEY L. S., MORGAN A. F.: J. Biol. Chem., 195, 583, 1952.

(21) Zeitschr. f. Vitforsch., 23, 275, 1952.

MATERIALE E TECNICA

Ratti albini di sesso maschile e del peso medio di 65-70 grammi sono stati suddivisi in due lotti. Un primo lotto è stato alimentato con una dieta sintetica purificata priva di acido pantotenico della seguente composizione:

Saccarosio . . . . .	67 %
Caseina priva di fattori idrosolubili	18 %
Miscela salina O.M. . . . .	4 %
Burro . . . . .	9 %
Olio di fegato di merluzzo . . . . .	2 %

con l'integrazione vitaminica per Kg di dieta di

tiamina cloridrato . . . . .	mg	10
riboflavina . . . . .	»	20
piridossina . . . . .	»	10
acido nicotinico . . . . .	»	100
acido paraaminobenzoico . . . . .	»	100
acido ascorbico . . . . .	»	100
colina cloruro . . . . .	»	200
inositolo . . . . .	»	200
menadione sodio bisolfito . . . . .	»	50
$\alpha$ -tocoferolo . . . . .	»	100
linoleato di etile . . . . .	g	10

Un secondo lotto ha invece ricevuto una aggiunta giornaliera di 100 mg di pantotenato di calcio.

Dopo circa 32 giorni di tale trattamento per i carenti, e 35-50 giorni per i non carenti, su un peso medio rispettivamente di 113-117 grammi per i primi e di 156-161 per i secondi, gli animali sono stati sottoposti a surrenectomia bilaterale secondo la tecnica di INGLE e GRIFFITH<sup>(22)</sup>, e mantenuti per 4 giorni alla stessa dieta con l'aggiunta di una soluzione all'1 % di cloruro di sodio come acqua da bere.

Al mattino del 4<sup>o</sup> giorno dopo l'intervento, agli animali superstiti è stato tolto il cibo; al mattino successivo l'acqua. Due gruppi di ratti, carenti e non carenti, sono stati lasciati come controlli senza trattamento. Ad altri due gruppi, carenti e non carenti, è stato somministrato il cortisone sotto forma di acetato, in soluzione oleosa, alla dose totale di 1 mg per animale suddivisa in 4 dosi parziali di mg 0,25, iniet-

<sup>(22)</sup> The Rat in Laboratory Investigation, Lippincott, Philadelphia, 1942.

tate ogni 2 ore per via sottocutanea, nel volume di  $\text{cm}^3$  0,25. Altri due gruppi, carenti e non carenti, infine, hanno ricevuto, contemporaneamente al cortisone, 8 mg di pantotenato di calcio, in 4 dosi di 2 mg per via sottocutanea, in  $\text{cm}^3$  0,25 di soluzione acquosa (\*). Due ore dopo l'ultima iniezione gli animali sono stati sacrificati per decapitazione, previa leggera narcosi cloroformica. Si è proceduto al prelevamento del sangue per la determinazione del tasso glicemico, col metodo di MILLER e VAN SLYKE<sup>(23)</sup>; e di circa 1 grammo del lobo sinistro del fegato per il dosaggio del glicogeno col metodo di GODD, KRAMER e SOMOGYI<sup>(24)</sup>, modificato da STADIE e HAUGARD<sup>(25)</sup>.

## RISULTATI

I risultati relativi ai vari gruppi di animali sono riportati in valori medi  $\pm$  E.S. nella unita tabella:

Dieta	N. Ratti	Peso medio g	Trattamento	Glicogeno mg % g fegato	Tasso glicemico mg %
Carente . . . . .	6	113 $\pm$ 3,2	—	23,8 $\pm$ 2,6	60 $\pm$ 4,1
Non carente . . . . .	7	156 $\pm$ 9,6	—	36,8 $\pm$ 6,3	70 $\pm$ 5,8
Carente . . . . .	9	117 $\pm$ 7,6	Cortisone	168,6 $\pm$ 28,8	99 $\pm$ 4,0
Non carente . . . . .	24	161 $\pm$ 13,2	Cortisone	385,3 $\pm$ 79,5	92 $\pm$ 7,0
Carente . . . . .	14	114 $\pm$ 4,2	Cortisone + Pantotenato Calcio	45,9 $\pm$ 10,1	98 $\pm$ 1,8
Non carente . . . . .	21	159 $\pm$ 11,3	Cortisone + Pantotenato Calcio	263,1 $\pm$ 37,3	89 $\pm$ 5,2

Dall'esame dei dati surriportati ci sembra risultino i seguenti fatti:

1) in tutti i ratti, carenti e non carenti di acido pantotenico, il digiuno provoca una caduta del tasso glicemico e del glicogeno epatico dello stesso ordine di grandezza;

2) la somministrazione di cortisone riconduce in ogni caso alla norma il tasso glicemico; ma la sua azione sulla ricostituzione delle riserve di glicogeno epatico si esplica in maniera nettamente maggiore nei ratti a dieta completa che non in quelli a dieta carente. Nei primi si riscontra un contenuto medio di glicogeno di mg 385,3 per 100 grammi di fegato (\*), nei secondi soltanto di mg 168,9 ( $P < 0,05$ );

<sup>(23)</sup> J. Biol. Chem., 114, 583, 1936.

<sup>(24)</sup> J. Biol. Chem., 100, 483, 1932.

<sup>(25)</sup> J. Biol. Chem., 188, 167, 1951.

(\*) Le iniezioni di cortisone e di pantotenato di calcio sono state eseguite ogni due ore, nello stesso momento. Agli animali ricevuti il solo cortisone è stata praticata al posto del pantotenato di calcio una iniezione di  $\text{cm}^3$  0,25 di acqua bidistillata sterile.

3) la somministrazione contemporanea di cortisone e pantotenato di calcio fa rilevare una netta differenza di comportamento fra ratti non carenti e carenti. Mentre nei primi si ottengono valori medi di glicogeno epatico di mg 263,4 % grammi di fegato, che alla indagine statistica non differiscono significativamente dai valori ottenuti con la somministrazione del solo cortisone ( $P < 0,05$ ); negli animali carenti i valori di glicogeno epatico ottenuti appaiono contenuti in limiti molto modesti (mg 45,9 %), praticamente dello stesso ordine di quelli riscontrati nei ratti lasciati senza alcun trattamento. L'acido pantotenico, somministrato in aggiunta al cortisone, sembra pertanto ostacolare l'azione di questo sulla ricostituzione del glicogeno epatico, pur mantenendo il tasso glicemico degli animali su un livello normale. Questo fatto, che avevamo del resto reso noto nella comunicazione precedente, appare, al confronto con quanto avviene nei ratti non carenti, legato alla condizione di carenza.

#### CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dai risultati delle presenti esperienze emergono due fatti che riteniamo degni di nota: il diminuito grado di sensibilità dimostrato dai ratti carenti surrenectomizzati nei confronti dell'azione del cortisone, e la inibizione di questa pur diminuita risposta quando contemporaneamente viene somministrato il pantotenato di calcio.

Nell'animale carente sembra dunque esistere una certa difficoltà nella gluconeogenesi. L'interpretazione più verosimile potrebbe essere quella di una depressione dei processi di trasformazione delle proteine in idrati di carbonio, per effetto dell'impoverimento in coenzima A, che si verifica nei tessuti degli animali carenti.

Più difficile è il tentativo di interpretare adeguatamente il secondo fatto da noi constatato. Non ci sembra, alla luce delle nostre attuali conoscenze e di fronte al reperto di un tasso glicemico normale, di potere spiegare l'azione di ostacolo alla ricostituzione del glicogeno epatico come dovuta a un blocco della già depressa gluconeogenesi dell'animale carente.

---

(\*) Tassi di glicogeno epatico ben più elevati e corrispondenti a quelli dei ratti intatti è possibile ottenere nei ratti surrenectomizzati somministrando la stessa quantità di cortisone in soluzione idrosalina<sup>(6)</sup>, oppure sottoponendo gli animali nei tre giorni susseguenti alla surrenectomia a diete iperproteiche (sino al 58% di proteine)<sup>(26)</sup>. Nelle nostre prove abbiamo preferito non variare dopo l'intervento operatorio la composizione percentuale della dieta.

<sup>(26)</sup> PABST M. L., SHEPPARD R., KNIZENGA M. H.: *Endocrinology*, 41, 55, 1947.

Accettabile appare invece l'idea che la somministrazione massiva di pantotenato di calcio possa esaltare nel ratto carente funzioni enzimatiche depresse dallo stato di carenza e favorire così l'utilizzazione del glucosio neoformato per azione del cortisone, impedendone l'accumulo nel fegato sotto forma di glicogeno.

Seguendo queste possibilità interpretative abbiamo intrapreso uno studio sulla gluconeogenesi del ratto carente di acido pantotenico attraverso la eliminazione del glucosio e dell'azoto in animali florizinati.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia.

---