

62. R. ANGELICO e M. QUINTILIANI. — Contributo alla conoscenza dell'acido pantotenico. - Rivista critico-sintetica e ricerche sperimentali.

Riassunto. — Gli Autori nella prima parte del loro lavoro fanno una esposizione critica della vasta mole di ricerche che hanno portato alla conoscenza della struttura e proprietà chimiche dell'acido pantotenico, della sua azione sugli organismi inferiori e superiori, dell'azione biologica dei suoi omologhi e dei metodi microbiologici di dosaggio. Riten-
gono inoltre utile, nella seconda parte, apportare il contributo della loro esperienza riferendo delle ricerche personali nelle quali viene posta in luce l'azione dell'acido pantotenico quale fattore dell'accrescimento e del trofismo cutaneo del ratto.

Résumé. — Parmi les nombreux facteurs composant le groupe de vitamines B, on assigne une place importante à l'acide pantothénique en raison de sa grande diffusion dans la nature et de son action tant sur les organismes supérieurs que sur les inférieurs.

Dans la première partie de ce mémoire, les AA. font un exposé critique de l'imposante quantité de recherches, qui, à partir de la première constatation de son action sur les levures et des études sur le « facteur du filtrat », ont porté à la connaissance de la structure et des propriétés chimiques, ainsi que de l'action biologique de cet important facteur, qu'on a tâché d'encadrer dans son rôle naturel. On expose ainsi les recherches concernant l'action de l'acide pantothénique comme facteur de la croissance et du trophisme cutané chez le poulet et le rat, son action sur d'autres organismes supérieurs, les tentatives pour l'appliquer à la thérapie humaine et enfin les observations anatomo-pathologiques de sa carence et les études sur son métabolisme et sa toxicité.

L'étroit parallélisme existant entre le monde des organismes supérieurs et celui des organismes inférieurs est mis en évidence par l'action que l'acide pantothénique exerce comme facteur de croissance chez les animaux en même temps que comme stimulant du développement de beaucoup de micro-organismes. Les AA. illustrent cette action et celle de ses homologues ayant un pouvoir bactériostatique, en exposant la conception théorique que l'on a sur ces faits et les méthodes de dosage microbiologique, dont l'extension, à travers la β -alanine, au domaine des aminoacides, représente une conquête de la moderne biochimie microbienne.

Dans la seconde partie de ce mémoire, les AA. rapportent les résultats de leurs recherches expérimentales sur l'acide pantothénique comme facteur de la croissance et du trophisme cutané chez le rat, afin de fixer les bases pour l'élaboration éventuelle d'une méthode de dosage. On décrit aussi l'évolution de la croissance et des manifestations cutanées

présentées par les animaux soumis à une diète dépourvue d'acide panto-thénique et les effets obtenus par l'administration préventive de doses diverses de pantothénate de calcium. Il résulte que la dose appropriée pour exercer une action protectrice efficace est de 60 γ par jour.

Summary. — Among the numerous factors of the B complex, pantothenic acid occupies a place of notable interest because of its very frequent occurrence in nature and of its action on organisms of the higher as well as of the lower classes.

In the first part of this paper the AA. take a critical survey of the large amount of investigations which, from the observation of its action on yeasts and from the studies on the «factor of the filtrate», have led to the knowledge of the structure and chemical properties as well as of the biological action of this important factor, endeavouring to exactly ascertain and define its natural role. Thus, a review is made of the researches concerning the action of pantothenic acid as a factor of growth and of cutaneous trophism in the chicken and the rat, its action on other superior organisms, the attempts to apply it in human therapy, and finally the anatomo-pathological manifestations consequent on its deficiency and the studies on its metabolism and its toxicity.

The close parallelism existing between the world of the higher and that of the lower organisms is evidenced, in the case of pantothenic acid, by the action it manifests both as a growth factor in animals and as a stimulant of development in a number of micro-organisms. The AA. illustrate this action and that of its homologues having a bacteriostatic action, setting forth the theoretical concept suggested by these facts and the methods of microbiological determination, the extension of which, through β -alanine, to the field of amino acids, represents a conquest of modern microbial biochemistry.

In the second part of this paper the AA. report the results of their experimental investigations on pantothenic acid as a factor of growth and of cutaneous trophism in the rat, in order to establish a basis for eventually working out a determination method. Thus, a description is given of the evolution of growth and of the cutaneous manifestations observed in animals subjected to a diet lacking pantothenic acid, and of the effects obtained through preventive administration of different doses of calcium pantothenate. It results that the dose required to confer on the animal an effective protection is of 60 γ per day.

Zusammenfassung. — Unter den zahlreichen Faktoren des Komplexes B, nimmt die Pantothensäure eine Stelle von bemerkenswertem Interesse ein, und dies weil sie in der Natur sehr verbreitet ist und auf höhere sowie niedere Organismen einwirkt.

Im ersten Teil dieser Arbeit geben die VV. eine kritische Darlegung der umfangreichen Untersuchungen, die durch Hervorheben ihrer Wirkung auf die Hefen und durch die Beobachtung des «Filtrat-Faktors», zur Erkennung der Struktur und der chemischen, sowie der biologischen Eigenschaften dieses wichtigen Faktors geführt haben. Sie versuchen es, diesen in seinen natürlichen Rang einzureihen. Es werden die Untersuchungen dargelegt, welche die Wirkung der Pantothenensäure als Wachstumsfaktor und als Faktor der Hauttrophik des Huhnes und der Ratte betreffen. Ihre Wirkung auf andere höhere Organismen, die Versuche der Anwendung in der menschlichen Therapie, und die anatomisch-pathologischen Beobachtungen ihres Mangels, sowie die Studien ihres Metabolismus und ihre Giftigkeit werden beschrieben.

Der enge Parallelismus zwischen den höheren und niederen Lebewesen wird durch die gleichzeitige Wirkung der Pantothenensäure als Wachstumsfaktor oder Wachstumsförderer für zahlreiche Organismen dargelegt. Die VV. erläutern diese Wirkung, sowie jene der Homologen mit bakterio-statischer Wirkung, indem sie den biologischen Begriff und die mikrobiologischen Bestimmungsmethoden darlegen, deren Ausdehnung über β -Alanin bis zum Bereich der Aminosäuren eine Errungenschaft der modernen Biochemie ist.

Im zweiten Teil der Arbeit geben die VV. die Ergebnisse ihrer experimentellen Untersuchungen über die Pantothenensäure als Wachstumsfaktor und bei der Hauttrophik der Ratte wieder, um die Voraussetzungen für eine eventuelle Ausarbeitung einer Dosierungsmethode festzulegen. Es werden, der Verlauf des Wachstums und die kutanen Erscheinungen bei den Tieren beschrieben, die einer an Pantothenensäure mangelnden Diät unterzogen wurden, und die Wirkung einer vorangehenden Eingabe von verschiedenen Dosen Calcium-Pantothenat dargelegt.

Es ergibt sich, dass eine 60 γ Dosis pro Tag im Stande ist, eine erfolgreiche Schutzwirkung auszuüben.

PARTE PRIMA

Rivista critico-sintetica

STRUTTURA E PROPRIETÀ CHIMICHE DELL'ACIDO PANTOTENICO

Fin dal 1901 Wildiers ⁽¹⁾ aveva osservato che seminando del lievito in un terreno culturale sintetico, costituito da materiali chimicamente puri, il suo sviluppo era intensificato dall'aggiunta di un estratto sterile

(¹) La Cellule, 18, 311 (1901).

cotto di una cultura dello stesso lievito. Egli chiamò « bios » la sostanza attivatrice presente in tale estratto. Per molti anni l'osservazione di Wildiers rimase poco conosciuta, e solo con l'intensificarsi degli studi sui fattori vitaminici essa fu ripresa e costituì il punto di partenza di tutta una serie di ricerche che hanno portato molta luce su uno dei capitoli più interessanti e complessi nel campo delle vitamine.

Williams ⁽²⁾ nel 1919 affermò la natura vitaminica del « bios » identificandolo con la cosiddetta vitamina B, unica allora conosciuta del complesso oggi noto.

Tale ipotesi resse per qualche anno fino a che Fulmer ⁽³⁾, Miller ⁽⁴⁾ ed altri dimostrarono che il « bios » non era una sostanza semplice, ma un complesso di vari fattori, diversi nella struttura chimica e nell'azione biologica. Lash Miller ⁽⁵⁾ nel 1928 separò il « bios » in due frazioni: « bios I » e « bios II ». Il « bios I » fu riconosciuto come mesoinosite da Eastcott ⁽⁶⁾, mentre il « bios II » fu separato ulteriormente da Kogl ⁽⁷⁾ in due frazioni: « bios II-A » di natura imprecisata, presumibilmente contenente sostanze diverse, e « bios II-B » o « biotina », oggi identificata con la vitamina H.

Un'osservazione interessante è quella fatta, nel 1929, da Williams e coll. ⁽⁸⁾, i quali si accorsero che, adsorbendo il « bios » su terra di folloni, il residuo non adsorbito mostrava su alcuni ceppi di *Saccaromices cerevisiae*, fra cui il ceppo adoperato da Wildiers, un potere stimolante la crescita pressochè uguale a quello della sostanza originaria. Per le successive esperienze ⁽⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁾ tendenti a frazionare il « bios » fu adoperato il metodo dell'elettrolisi frazionata. In tal modo gli Autori riuscirono a separarlo in due frazioni: l'una a carattere acido, facilmente dializzabile e molto attiva, l'altra a carattere basico, difficilmente dializzabile e pressochè inattiva. Il fattore di accrescimento dei lieviti potè così essere grossolanamente identificato per una sostanza, presente in quasi tutti i materiali provenienti dal mondo biologico, a carattere acido, facilmente dializzabile, di natura nè olefinica nè aromatica, non contenente gli ordinari gruppi aldeidici, chetonici o idrocarbonati, e che, data la sua pres-

(2) J. Biol. Chem., 38, 465 (1919).

(3) J. Am. Chem. Soc., 46, 723 (1924).

(4) Science, 59, 197 (1922).

(5) cit. QUAGLIARIELLO, Chim. Biol., Napoli (1943).

(6) J. Phys. Chem., 32, 1094 (1928).

(7) J. Phys. Chem., 24, 43 (1926).

(8) J. Am. Chem. Soc., 51, 2764 (1929).

(9) J. Am. Chem. Soc., 53, 783 (1931).

(10) J. Am. Chem. Soc., 53, 4171 (1931).

(11) J. Am. Chem. Soc., 54, 3462 (1932).

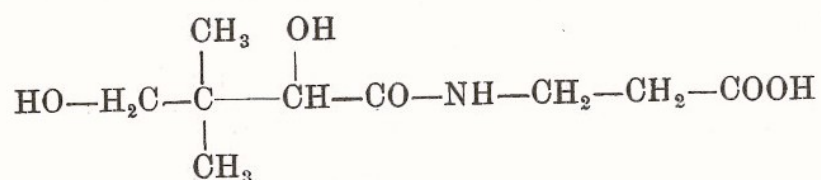
sochè universale diffusione, fu chiamata *acido pantotenico* dal greco $\pi\acute{\alpha}\varsigma, \pi\acute{\alpha}\nu\tau\omicron\varsigma$ = tutto).

La sua formula bruta fu approssimativamente stabilita come $C_8H_{15}O_5N$ oppure $C_8H_{13}O_5N$ ⁽¹²⁻¹³⁾ (in realtà è $C_9H_{17}O_5N$).

Le successive ricerche furono volte a identificare la struttura molecolare dell'acido pantotenico: fu così dimostrato che entrava a far parte della molecola un aminoacido: la β -alanina, probabilmente originata nei vegetali e negli animali a partire dall'acido aspartico. Williams e coll. nel 1939 ⁽¹⁴⁻¹⁵⁾ partendo dall'ipotesi che esistesse una relazione fra l'acido pantotenico e la β -alanina, dato che quest'ultima esercitava sui lieviti un'azione favorente la crescita molto simile a quella dell'acido pantotenico, trovarono che aggiungendo β -alanina al mezzo di cultura sintetico di un lievito e coltivandolo poi per 40 ore, nei prodotti di autolisi della cultura era presente acido pantotenico, evidentemente sintetizzato dal lievito a partire dalla β -alanina. Gli Autori sottoposero allora l'acido pantotenico ad idrolisi con acidi od alcali e nei prodotti di scissione riuscirono ad isolare la β -alanina.

La struttura della frazione non β -alaninica fu determinata l'anno successivo. Dapprima Williams e coll. ⁽¹⁶⁾ dimostrarono la presenza in questa frazione di un gruppo α -idrossilico, capace di spontanea lattonizzazione e che indicarono come α -idrossi- γ -lattone. L'isolamento in forma cristallina e la esatta identificazione furono ottenuti da Stiller e coll. ⁽¹⁷⁾, i quali poterono stabilire che si trattava dell'acido α - γ -diossi- β - β -dimetilbutirrico che si formerebbe nei vegetali a partire dalla valina.

La formula dell'acido pantotenico risultò allora fissata per:



acido α , γ -diossi- β , β -dimetil-butiril β -amino-propionico, ovvero β -alanilamide dell'acido α , γ -diossi- β , β -dimetil-butirrico.

Esso è una sostanza oleosa, giallo pallida, vischiosa, solubile in acqua, resistente al calore, ma labile all'azione degli acidi e degli alcali concentrati. Si usa generalmente sotto forma del suo sale di calcio cristallizzato. Non se ne conosce allo stato presente alcun metodo chimico o

⁽¹²⁾ WILLIAMS e coll., J. Am. Chem. Soc., 60, 2719 (1938).

⁽¹³⁾ WILLIAMS e coll., J. Am. Chem. Soc., 61, 454 (1939).

⁽¹⁴⁾ J. Am. Chem. Soc., 61, 1421 (1939).

⁽¹⁵⁾ J. Am. Chem. Soc., 58, 695 (1936).

⁽¹⁶⁾ J. Am. Chem. Soc., 62, 1776 (1940).

⁽¹⁷⁾ J. Am. Chem. Soc., 62, 1779 (1940).

fisico di dosaggio L'acido pantotenico è sintetizzato dalle piante verdi, da diversi lieviti, da funghi e batteri: nel lievito sarebbe stato ottenuto un enzima capace di sintetizzare la β -alanina col lattone dell'acido. La forma dell'acido pantotenico esistente in natura è quella destrógira; la forma levógira ha un'attività biologica di gran lunga minore; per ottenere gli stessi effetti occorrerebbero dosi 30 volte superiori. Un grammo di acido pantotenico corrisponderebbe a 71.000 Unità-pollo e a 50.000.000 Unità-Streptobatterio; l'unità-pollo sarebbe uguale a 14 γ ⁽¹⁸⁻¹⁹⁾.

Ormai la via per ottenere acido pantotenico sintetico era aperta. Già Williams ⁽²⁰⁾ e Woolley ⁽²¹⁾ avevano ottenuto sintesi parziali unendo la frazione lattonica, ottenuta per idrolisi, con β -alanina sintetica. Stiller e coll. ⁽²²⁾ ottennero la sintesi totale riuscendo a preparare per via sintetica anche la frazione lattonica nelle forme (d) e (l); delle quali la forma (l) entra nella costituzione dell'acido pantotenico attivo. Essi ottennero così quest'ultimo nelle forme (d), (l) e racemica e confrontando la sua attività con quella dell'acido pantotenico ricavato da una sintesi parziale e dell'acido pantotenico naturale ottennero i seguenti risultati:

1) (l) lattone sintetico + β -alanina sintetica = (d) acido pantotenico con attività uguale a quella dell'a. p. resintetizzato e al 99-100% dell'attività dell'a. p. naturale;

2) (d) lattone + β -alanina sintetica = (l) acido pantotenico inattivo;

3) (d,l) lattone + β -alanina sintet. = (d,l) acido pantotenico con attività uguale al 50% di quella dell'acido pantotenico naturale.

Ulteriori studi sulla chimica dell'acido pantotenico portarono alla preparazione di nuovi prodotti sintetici, dei suoi sali di calcio e di sodio ⁽²³⁻²⁴⁻²⁵⁾ e dei suoi omologhi dei quali dovremo diffusamente occuparci più avanti.

AZIONE BIOLOGICA

L'acido pantotenico esercita la sua azione biologica su un vastissimo raggio, sia nel campo degli organismi inferiori che in quello degli organismi superiori. Distingueremo quindi nella trattazione l'azione sui microorganismi: lieviti, lactobacilli, protei, streptococchi, difterici ed altri germi, da quella sugli organismi superiori: pollo, ratto, topino, maiale.

(18) McELROY e GOSS, J. Biol. Chem., 130, 437 (1939).

(19) KUHN e WIELAND, Ber., 73, 971 e 1134 (1940).

(20) Science, 89, 486 (1939).

(21) J. Am. Chem. Soc., 61, 978 (1939).

(22) J. Am. Chem. Soc., 62, 1785 (1940).

(23) LEVY, WYLLARD e STILLER, J. Am. Chem. Soc., 63, 2846 (1941).

(24) FORD, J. Am. Chem. Soc., 68, 1667 (1946).

(25) PARKE e LAWSON, J. Am. Chem. Soc., 63, 2869 (1941).

uomo, soffermandoci più lungamente sulla seconda perchè ad essa si ricollegano le nostre ricerche sperimentali.

AZIONE SUI MICROORGANISMI

Lieviti. — Come abbiamo già detto l'acido pantotenico esercita una spiccata azione sull'accrescimento di alcuni lieviti, azione che permise a Williams di identificarlo e di isolarlo chimicamente.

Partendo dal concetto espresso da Lwoff ⁽²⁶⁾ che i fattori di accrescimento veri e propri sono « sostanze di cui l'organismo è incapace di realizzare la sintesi e in assenza delle quali è impossibile ogni moltiplicazione dello stesso organismo », vediamo di valutare criticamente la natura dell'azione dell'acido pantotenico sui lieviti.

E' da considerare l'acido pantotenico un fattore vero e proprio di accrescimento, oppure un semplice fattore stimolante la crescita? In effetti i lieviti seminati su terreni sintetici non arrestano del tutto il loro sviluppo, ma sono capaci ugualmente di crescere sia pure ad un ritmo lento e stentato. Tenendo allora presente tale possibilità dei lieviti di avere un accrescimento, anche minimo, nei mezzi sintetici e che questo accrescimento può essere favorito, per quanto con minore intensità, dalla aggiunta di sostanze diverse dall'acido pantotenico (la biotina, la β -alanina etc.), ci sembra di non poter riconoscere a quest'ultimo una indispensabilità e una specificità tali da farlo ascrivere fra i fattori veri e propri di accrescimento dei lieviti, ma piuttosto di doverlo considerare come uno stimolante, sia pure particolarmente efficace. Ed è l'efficacia della sua azione stimolante che ha permesso a Williams di poterlo identificare e di dosarlo quantitativamente dal rilievo della sua azione biologica.

Al fine di stabilire poi la posizione dell'acido pantotenico nei riguardi delle altre sostanze capaci di esercitare una azione stimolante, nell'anno successivo alla sua scoperta, Williams e Sounders ⁽²⁷⁾ condussero una prima analisi critica, comparando la sua azione con quella dell'inositolo e della tiamina. Essi sperimentarono su 6 ceppi diversi di *Saccaromices cerevisiae* coltivati su un terreno sintetico. L'acido pantotenico dimostrò un'attività quanto mai spiccata su tutti i ceppi, ben dimostrabile anche a dosi di 0,008 γ per cm^3 di mezzo culturale. Anche l'inositolo manifestò una certa attività, sia pure di molto inferiore, mentre l'aggiunta di vitamina B₁ agiva soltanto su uno dei ceppi. La combinazione dell'acido pantotenico con queste due sostanze, più con la prima che con la seconda, ne rinforzava, ove più ove meno a seconda dei ceppi, l'azione stimolante. Oltre all'inositolo, diffusissimo nei tessuti animali e vegetali e all'aneu-

⁽²⁶⁾ Ann. Inst. Pasteur, 61, 580 (1938).

⁽²⁷⁾ Biochem. J., 28, 1887 (1934).

rina, importante per la sua funzione di cocarbossilasi, fu portata l'attenzione su altre sostanze, quale la biotina, anch'essa largamente diffusa, e la β -alanina, capace di sostituire l'acido pantotenico su alcuni lieviti che sono in grado di operare una sintesi autoctona dell'acido pantotenico stesso. In rapporto a tali fattori Williams, Snell ed Eakin ⁽²⁸⁾ e Leonian e Lilly ⁽²⁹⁾ affermarono che l'acido pantotenico è il più attivo, capace di agire anche da solo su tutti i ceppi di lievito. La biotina si dimostrò attivissima anche a minime dosi su tutti i ceppi ma soltanto in combinazione con gli altri fattori; mentre la tiamina e l'inositolo erano attivi soltanto su determinati ceppi. In quanto alla β -alanina, come abbiamo già detto, essa si dimostrò capace di agire soltanto su quei ceppi che la utilizzano per la sintesi dell'acido pantotenico. In conclusione quindi l'acido pantotenico si distingue dagli altri fattori stimolanti la crescita dei lieviti per la universalità della sua azione e per la capacità di agire da solo.

Circa il meccanismo di azione dell'acido pantotenico sui lieviti, Williams e collab. ⁽³⁰⁻³¹⁾ hanno riscontrato che esso stimola l'attività respiratoria, favorendo così le fermentazioni e facilita la deposizione del glicogeno nelle cellule. Questa azione stimolante l'attività respiratoria, che è stato possibile distinguere da quella stimolante l'accrescimento, fa ritenere l'acido pantotenico, data la sua grande diffusione in natura, un fattore essenziale per la fisiologia cellulare. Sembra probabile che l'acido pantotenico entri a far parte di un sistema enzimatico che interviene nel metabolismo degli idrati di carbonio. Ciò viene confermato anche in altri campi: in alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus* esso interviene nel metabolismo del glucosio e del triptofano ⁽³²⁻³³⁾; e, negli organismi superiori, la sua somministrazione al coniglio ha effetto ipoglicemizzante ⁽³⁴⁾.

Lactobacilli. — La dimostrazione che l'acido pantotenico esercita una attività favorente la crescita dei Lactobacilli prese origine dai lavori di Tatum, Snell e Peterson ⁽³⁵⁾, i quali constatarono, nel 1937, che aggiungendo a un terreno di cultura costituito da peptone, glucosio e sali inorganici un estratto acquoso di patata la crescita dei Lactobacilli veniva notevolmente favorita. Se poi si idrolizzava il peptone l'estratto di patata diveniva indispensabile, determinandosi in sua assenza l'arresto completo

⁽²⁸⁾ J. Am. Chem. Soc., 62, 1204 (1940).

⁽²⁹⁾ J. Bact., 43, 17 (1942).

⁽³⁰⁾ Biochem. J., 30, 2036 (1936).

⁽³¹⁾ J. Gen. Phys., 22, 637 (1938-39).

⁽³²⁾ SEVAG e GREEN, J. Biol. Chem., 154, 719 (1944).

⁽³³⁾ SEVAG e GREEN, J. Bact., 48, 631 (1944).

⁽³⁴⁾ WRIGHT, J. Biol. Chem., 142, 445 (1942).

⁽³⁵⁾ J. Bact., 33, 207 (1937).

dell'accrescimento. Gli Autori conclusero per l'esistenza di due fattori diversi: un fattore del peptone a carattere acido e un fattore della patata a carattere basico. In successive osservazioni trovarono che entrambi i fattori potevano essere sostituiti con un estratto acquoso di fegato; mentre con l'uso di terreni altamente sintetici (caseina idrolizzata, triptofano e sali minerali) il solo fattore del peptone si dimostrava realmente indispensabile. Le ulteriori ricerche di Snell, Strong e Peterson (³⁶) furono perciò volte alla sua identificazione. Essi prepararono dalla frazione alcool-solubile di un estratto di fegato una sostanza a carattere acido, estraibile con etere, la quale si dimostrò essenziale e insostituibile per l'accrescimento di 14 ceppi di Lactobacilli: tale sostanza era piuttosto labile al calore, agli acidi e specialmente agli alcali, resisteva ai comuni agenti precipitanti e alla H_2O_2 . Il terreno di cultura adoperato era costituito da peptone idrolizzato con acido, glucosio, triptofano, cistina, riboflavina, acetato di sodio e sali inorganici. L'accrescimento dei Lactobacilli veniva determinato dal grado di intorbidamento delle culture o dalla titolazione dell'acido lattico sviluppato in 5-6 giorni di cultura a 37-38°, essendo questo strettamente legato alla crescita dei microorganismi e potendo quindi costituire un esatto test di accrescimento. Gli Autori osservarono che il loro fattore mostrava notevoli analogie con l'acido pantotenico ed infatti ad una analisi più accurata fu possibile concludere a favore dell'identità fra le due sostanze (³⁷⁻³⁸).

Da porre in particolare rilievo è il fatto che l'accrescimento dei bacilli lattici è del tutto inibito dalla mancanza di acido pantotenico, la cui azione inoltre non può essere sostituita da altri fattori: bisognerà allora concludere che per questi microorganismi l'acido pantotenico rappresenta, al contrario che per i lieviti, non un semplice stimolante, ma un vero e proprio fattore di accrescimento nel senso di Lwoff. Sui Lactobacilli, ed ancor più esattamente che sui lieviti per la maggiore specificità, è possibile allora dosare l'acido pantotenico presente in una data sostanza in base alla intensità della sua azione confrontata con delle curve standard. E' questo infatti uno dei metodi di dosaggio più comunemente adoperati, al quale sono stati apportati via via ulteriori perfezionamenti tendenti a purificare al massimo i materiali costituenti i terreni culturali, per eliminare ogni possibile causa di errore (³⁹).

Sarà interessante infine ricordare che fra i Lactobacilli richiedenti l'acido pantotenico come fattore indispensabile al loro accrescimento, è

(³⁶) Biochem. J., 31, 1789 (1937).

(³⁷) J. Am. Chem. Soc., 60, 2825 (1938).

(³⁸) J. Bact., 38, 293 (1939).

(³⁹) PENNINGTON, SNELL e WILLIAMS, J. Biol. Chem., 35, 213 (1940).

da considerare il *Lactobacillus oralis*, il quale è incapace di crescere in assenza di acido pantotenico ⁽⁴⁰⁾. Questo Lactobacillo permise di scoprire la presenza di acido pantotenico nella saliva umana; al cui maggiore o minore contenuto in acido pantotenico sarebbe legata la possibilità di accrescimento del Lactobacillo nel cavo orale dell'uomo.

Protei. — Ceppi di *Proteus Morganii*, a differenza di altri ceppi di Protei, non erano capaci di dare culture in serie se coltivati in semplici mezzi sintetici. Si provò allora ⁽⁴¹⁾ ad aggiungere al mezzo culturale delle sostanze capaci di favorire l'accrescimento dei Protei, ma nè vari aminoacidi, nè vari fattori di accrescimento, quali la riboflavina, la aneurina, l'adermina, l'acido nicotinico, l'acido pimelico si dimostrarono capaci di permettere i trapianti in serie. Un'attività in tal senso fu invece rinvenuta in notevole grado in un estratto alcoolico di crusca di riso o di frumento, noti quali fonti naturali di acido pantotenico, il che indirizzò le ricerche verso questa sostanza. Fu adoperato un pantotenato di bario che in presenza dei fattori di accrescimento sopraccennati era capace, alla dose di 1 γ per 10 cm³ di mezzo culturale, di dare un accrescimento rigoglioso protrahentesi per 5 passaggi consecutivi senza altra aggiunta di sostanza attiva. Ulteriori esperienze dimostrarono che l'acido pantotenico da solo non era in grado di sostenere tale accrescimento. Procedendo allora per eliminazione si trovò che erano indispensabili soltanto il pantotenato e l'acido nicotinico, oppure il pantotenato e la cozimasi. Tale risultato è in armonia con l'osservazione che l'acido nicotinico viene impiegato nella sintesi biologica della cozimasi. L'attività dell'acido pantotenico anche in questo caso risultò specifica ⁽⁴²⁻⁴³⁾, per cui esso anche per il *Proteus Morganii* si dimostrò un vero e proprio fattore di accrescimento.

Streptococco emolitico. — Un altro microorganismo dimostratosi sensibile all'azione dell'acido pantotenico è lo *Streptococcus haemoliticus* ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾. La scoperta di tale sensibilità trasse origine dall'osservazione che, mentre la cultura dello streptococco in un terreno costituito da gelatina idrolizzata glucosio nicotinamide e sali inorganici non era seguita da alcuna crescita, l'aggiunta di un estratto di fegato era capace di dare un ottimo accrescimento. Nell'estratto di fegato fu identificata la presenza di glutazione, tiocromo, acido nicotinico, betaina, flavina, glucosammina, ma tutte queste sostanze erano inattive se mancava il precipitato calcio-alcoolico

⁽⁴⁰⁾ HILL e coll., J. Dent. Res., 21, 467 (1942).

⁽⁴¹⁾ PELCZAR e PORTER, Proc. Soc. Exp. Biol. e Med., 43, 151 (1940).

⁽⁴²⁾ PELCZAR e PORTER, J.A.M.A., 115, 523 (1940).

⁽⁴³⁾ PELCZAR e PORTER, J. Biol. Chem., 139, 111 (1941).

⁽⁴⁴⁾ SUBBAROW e RANE, J. Am. Chem. Soc., 61, 1616 (1939).

⁽⁴⁵⁾ SUBBAROW e RANE, J. Biol. Chem., 134, 455 (1940).

del'estratto stesso. Dimostrando tale estratto alcune somiglianze con l'acido pantotenico, fu sostituito da questo: si potè così mettere in evidenza che le due sostanze erano identiche. Nel 1938 poi Woolley e Hutchings ⁽⁴⁶⁾ furono in grado di precisare più esattamente le richieste nutritive dello streptococco emolitico, affermando che al terreno sintetico occorreva aggiungere per avere la crescita riboflavina, acido pantotenico e ferro ridotto. Tale azione favorente la crescita dell'acido pantotenico non sarebbe indispensabile per tutti i ceppi di streptococco emolitico. Gli Autori, sperimentando su vari ceppi, poterono stabilire infatti che per alcuni bastava l'acido pantotenico idrolizzato con alcali oppure la semplice frazione acida della sua molecola, e per altri si poteva avere un buon accrescimento anche in assenza dell'acido pantotenico stesso.

Difterici, altri bacilli e microrganismi. — Per il *Corynebacterium Difteriae* l'acido pantotenico dimostrò di possedere un'attività variabile a seconda dei ceppi adoperati. Happold ⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾ coltivando i *Corynebacteri* su terreno di Müeller, precisò che esso era essenziale per l'accrescimento di alcuni ceppi di *gravis* e di *intermedi*, mentre agiva soltanto come un fattore accessorio per gli altri ceppi e per tutti quelli di *mitis*. Si precisò anche che l'attività di stimolo sull'accrescimento non era accompagnata da una maggiore produzione di tossina.

Non è possibile riportare qui la numerosissima serie di ricerche condotte su altri microorganismi sui quali l'acido pantotenico si dimostra più o meno attivo. Ci limitiamo perciò a segnalare che esso è stato dimostrato necessario insieme ad altri fattori per l'accrescimento di alcuni tipi di *Pneumococcus* ⁽⁴⁴⁾, di *Pasteurelle* ⁽⁴⁹⁾, di alcune *Brucelle* ⁽⁵⁰⁾ - fra cui qualche ceppo di *Brucella abortus* ⁽⁵¹⁾, dei batteri nodulari delle leguminose ⁽⁵²⁾, dell'*Acetobacter suboxidans* ⁽⁵³⁾, dell'*Escherichia Coli* ⁽⁵⁴⁾, di alcuni anaerobi non sporulanti ⁽⁵⁵⁾, del *Clostridium tetanicum* ⁽⁵⁶⁾, del *Clostridium acetobutylicum* ⁽⁵⁷⁾, *Rhizobium* ⁽⁵⁸⁾ etc. E' stato inoltre accertato che alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus* richiedono la presenza

⁽⁴⁶⁾ J. Bact., 38, 285 (1939).

⁽⁴⁷⁾ Brit. J. Exp. Pat., 20, 396 (1939).

⁽⁴⁸⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 43, 412 (1940).

⁽⁴⁹⁾ BERKMAN, SOUNDERS e KOSER, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 44, 68 (1940).

⁽⁵⁰⁾ MCCOLLUM e DICK, J. Inf. Dis., 71, 193 (1943).

⁽⁵¹⁾ MCCOLLUM e DICK, J. Inf. Dis., 71, 198 (1943).

⁽⁵²⁾ MCBURNEY, BOLLEN e WILLIAMS, Proc. Nat. Ac. of Sc., 21, 301 (1935).

⁽⁵³⁾ UNDERKOFER, BANTZ e PETERSON, J. Bact., 45, 183 (1943).

⁽⁵⁴⁾ SALLE e DUNN, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 32, 168 (1934).

⁽⁵⁵⁾ WEST, LEWES e MILITZER, J. Bact., 43, 155 (1942).

⁽⁵⁶⁾ MUELLER e MILLER, J. Bact., 43, 763 (1942).

⁽⁵⁷⁾ RUBBO e GILLESPIE, Nature, 146, 838 (1940).

⁽⁵⁸⁾ WEST e WILLSON, Enzymol., 8, 152 (1940).

di acido pantotenico nel loro mezzo di cultura soltanto nei primi due o tre giorni di crescita (fattore di isolamento) ⁽⁵⁹⁻⁶⁰⁾.

Fra gli altri microorganismi citiamo l'influenza dell'acido pantotenico sullo sviluppo di alcuni protozoi ⁽⁶¹⁾ e funghi filamentosi ⁽⁶²⁻⁶³⁾. Alcuni microorganismi possono sintetizzare l'acido pantotenico se si fornisce loro l'una o l'altra delle parti costituenti la sua molecola: la β -alanina o il lattone pantoico; ma in ogni caso l'aggiunta di acido pantotenico al mezzo di cultura è più efficace di quella dei suoi precursori.

AZIONE SUGLI ORGANISMI SUPERIORI

L'azione dell'acido pantotenico sugli organismi superiori costituisce un capitolo di notevole complessità. Da circa un trentennio numerosi Aa. si sono occupati dell'argomento e prima ancora che Williams isolasse chimicamente l'acido pantotenico, la presenza nei prodotti naturali di un fattore avente la sua azione era stata già segnalata e tale fattore era stato diversamente denominato. Solo quando furono note le ricerche sulla sua struttura e sulle sue proprietà, i vari Aa. furono in grado di riconoscere che i fattori da loro segnalati e in altro modo denominati non erano altro che acido pantotenico.

Nel fare la storia della definizione dell'azione biologica dell'acido pantotenico sugli organismi superiori (*) occorrerà fare un passo indietro e passare in rassegna il più rapidamente possibile i tentativi di identificazione dei vari fattori di accrescimento di tali organismi. Ciò equivarrà, lasciando da parte gli studi sulle vitamine più note, a ricordare le ricerche sui numerosi componenti del complesso vitaminico B. Problema invero

⁽⁵⁹⁾ KRAUSPOFF, SNELL e MCCOY, *Enzymol.*, 7, 327 (1939).

⁽⁶⁰⁾ PORTER e PELCZAR, *J. Bact.*, 41, 173 (1941).

⁽⁶¹⁾ ELLIOT, *Biol. Bull.*, 68, 82 (1935).

⁽⁶²⁾ NORRIS e LIPPINCOTT, *Nat. Canc. Inst.*, 2, 29 (1941).

⁽⁶³⁾ MUELLER e COHEN, *J. Bact.*, 34, 381 (1937).

(*) Nella nostra trattazione ci limitiamo a parlare di quegli organismi superiori sui quali più vasta è stata la sperimentazione sull'azione biologica dell'acido pantotenico. Riferiamo soltanto qui altre osservazioni che meritano interesse di citazione. Da alcuni Autori sarebbe stata dimostrata l'influenza dell'acido pantotenico sulle larve di alcuni insetti ⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾. Shock e Sebel ⁽⁶⁶⁾ hanno osservato che l'introduzione di pantotenato di calcio o di sodio nel liquido di perfusione di muscolo di rana, produce un aumento delle contrazioni di questo, proporzionale alla concentrazione del pantotenato introdotto. Infine McCall, Waismann, Elvehjem, Jones ⁽⁶⁷⁾ hanno studiato la carenza di acido pantotenico nella scimmia: la maggior parte delle manifestazioni riscontrate ricordano quelle osservate nelle altre specie superiori.

⁽⁶⁴⁾ LWOFF e NICOLLE, *Compt. R. Soc. Biol.*, 138, 205, 341 (1944).

⁽⁶⁵⁾ SUBBAROW e HUTCHINGS, *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 1616 (1939).

⁽⁶⁶⁾ *Am. J. of Phys.*, 142, 274 (1944).

⁽⁶⁷⁾ *J. Nutr.*, 31, 685 (1946).

assai arduo, sia per la vasta mole dei lavori pubblicati e sia per le difficoltà che si incontreranno nello sforzo di volere inquadrare, con la massima esattezza possibile, il nostro fattore nel suo ruolo naturale.

Azione sul pollo e sul ratto. — Nel 1916 Mc Collum e Kennedy ⁽⁶⁸⁾ avevano dimostrato che negli estratti acquosi dei germi di cereali, nel lievito, nel latte ecc. era contenuta una sostanza indispensabile per l'accrescimento dei ratti, la quale era anche capace di guarire la polinevrite dei polli. La sua azione non poteva essere sostituita dall'aggiunta del fattore liposolubile A, già scoperto da Stepp nel 1909 ⁽⁶⁹⁾, anch'esso necessario per l'accrescimento del ratto, per cui gli Aa. ammisero l'esistenza di un secondo fattore, che essi chiamarono *fattore idrosolubile B*, ritenendolo identico alla vitamina antinevritica. Nel 1926 Smith e Hendrick ⁽⁷⁰⁾ dimostravano che riscaldando il lievito per cinque ore a 120° andava distrutta la vitamina antinevritica, mentre il fattore di accrescimento rimaneva inalterato. Pertanto la vitamina antinevritica, termolabile, fu indicata come vitamina B₁ e l'altra, relativamente termostabile, come vitamina B₂. Questa, non ancora perfettamente conosciuta nè chimicamente nè biologicamente, fu per molti anni considerata un fattore unico, sicuramente in relazione con l'accrescimento dei polli e dei ratti e da alcuni ritenuta capace di prevenire delle lesioni cutanee a tipo pella-groso che la sua carenza faceva insorgere, in verità non costantemente, in questi animali.

Ma intanto altri fattori venivano segnalati nel complesso B oltre il B₁ e il B₂, e precisamente il B₃, fattore termolabile necessario al piccione per mantenere il peso costante, studiato da Williams e Waterman ⁽⁷¹⁾ e da Gurin, Eddy, Keresztesy ⁽⁷²⁾; il B₅ relativamente più termostabile, adsorbibile su terra di folloni e capace di promuovere la crescita dello stesso animale (Cont, Kinnersley, Peters ⁽⁷³⁾); e infine il B₄, anch'esso termolabile e adsorbibile su terra di folloni, che Reader aveva dimostrato capace di stimolare la crescita e prevenire una paralisi del treno posteriore nel ratto ⁽⁷⁴⁾.

Nel 1933 Roscoe ⁽⁷⁵⁾ affermò che il sintomo più caratteristico della carenza di vitamina B₂ nel ratto fosse la mancanza di crescita e una inco-

⁽⁶⁸⁾ J. Biol. Chem., 24, 291 (1916).

⁽⁶⁹⁾ Biochem. Zeitsch., 22, 452 (1909).

⁽⁷⁰⁾ U. S. Publ. Health Serv. Publ. Health Rep., 41, 201 (1926).

⁽⁷¹⁾ J. Biol. Chem., 78, 311 (1928).

⁽⁷²⁾ J. Biol. Chem., 87, 729 (1930).

⁽⁷³⁾ Biochem. J., 27, 225 (1933).

⁽⁷⁴⁾ Biochem. J., 23, 685 (1929).

⁽⁷⁵⁾ Biochem. J., 27, 1663 ((1933).

stante dermatite. Sorse allora (⁷⁶ ⁷⁷ ⁷⁸) l'ipotesi che ciò fosse dovuto alla mancanza di due diversi fattori, ma successive prove dello stesso Autore (⁷⁹) con diete altamente purificate, non poterono convalidare l'ipotesi che la dermatite fosse dovuta alla carenza di un fattore distinto da quello dell'accrescimento: ambedue gli ipotetici fattori, ottenuti da estratti acquosi di lievito, dal filtrato del bianco d'uovo e da polvere di carne essiccata, mostrarono una distribuzione relativamente simile ed una analoga minore resistenza al riscaldamento in ambiente alcalino: si confermò quindi la loro identità. Una prova di tale identità fu anzi fornita da Kline, Keenen, Elvehjem ed Hart (⁸⁰) nello stesso anno, i quali ottennero nei polli, autoclavando la dieta a 120°, l'insorgenza della polinevrite, curabile con vitamina B₁, mentre col solo riscaldamento a 95-100° per 144 ore insorgeva una dermatite a tipo pellagroso con arresto della crescita. In questo caso i sintomi scomparivano aggiungendo alla dieta lievito autoclavato o estratto di fegato o latte in polvere, mentre del tutto inefficace dimostravasi l'aggiunta di vitamina B₁. Fu così fissato il quadro carenziale da deficienza di vitamina B₂ nel pollo: arresto della crescita e dermatite, quest'ultima squisitamente specifica.

Ma ben presto, nello stesso 1933, a sconvolgere i concetti allora fissati vennero le ricerche di Ellinger e Koschara (⁸¹) da una parte, e di Kuhn e coll. (⁸²) dall'altra, i quali dai materiali che presentavano l'attività della vitamina B₂ isolarono i cosiddetti «liocromi», pigmenti idrosolubili con una caratteristica fluorescenza giallo verde, in seguito denominati «flavine». Si credette dapprima che essi potessero sostituire la vitamina B₂ in tutte le sue attività; ma presto, come vedremo appresso, si vide che pur agendo sull'accrescimento, non avevano alcuna efficacia sui sintomi cutanei del pollo e del ratto. Gli Autori americani proposero per le flavine la denominazione di Vitamina G, lasciando quella di Vitamina B₂ al fattore antipellagroso, che essi ritenevano unico, con azione sulla pellagra umana, sulla dermatite dei ratti e dei polli e sulla cosiddetta «black tongue» dei cani. Tale ipotesi si dimostrò ben presto completamente errata e per ciascuna di queste affezioni fu messo in evidenza un fattore preventivo particolare: la vitamina PP per la pellagra umana e per la lingua nera canina [Goldberger e coll. (⁸³)]; la vitamina B₆ o adermina, isolata

(⁷⁶) CHICK e ROSCOE, *Biochem J.*, 21, 698 (1927) e 22, 790 (1928).

(⁷⁷) SURE e SMITH, *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 28, 44 (1930).

(⁷⁸) KUHN e coll., *Ber. Deuts. Chem. Ges.*, 66, 317 (1933).

(⁷⁹) *Biochem. J.*, 27, 1937 (1933).

(⁸⁰) *J. Biol. Chem.*, 99, 295 (1933).

(⁸¹) *Nature*, 133, 553 (1934).

(⁸²) *Ber. Deuts. Chem. Ges.*, 66, 576, 1034-1577 (1943).

(⁸³) U. S. Publ. Health Serv. Publ. Health Rep., 41, 297-1025 (1926); 43, 657-1385 (1928); 44, 2768 (1929).

dalle lattoflavine nel 1934 da Giorgy ⁽⁸⁴⁾ (adsorbibile su terra di folloni, termostabile e a carattere basico, poi ottenuta sinteticamente), capace di prevenire la dermatite del ratto ed infine il fattore antidermatitico del pollo, che, come vedremo più tardi, sarà identificato da Jukes con l'acido pantotenico, interessato, insieme alla B₆, nel trofismo cutaneo del ratto.

La prova definitiva della non identità delle flavine con il fattore anti-pellagroso (allora chiamato vitamina B₂) fu fornita nel 1935 da Elvehjem e Koehn ⁽⁸⁵⁾. Essi ottennero la dermatite con il metodo della « heated diet » di Kline, Keenen, Elvehjem ed Hart già accennato: riscaldando cioè a 95-100° per 144 ore una dieta costituita da granoturco, crusca, caseina, sale comune, olio di fegato di merluzzo, carbonato di calcio. I concentrati vitaminici in grado di curarla furono preparati per autolisi da estratti di fegato, rimuovendo le flavine per adsorbimento su terra di folloni. Essi trovarono così che l'eluato dopo l'adsorbimento, e cioè le flavine, era inattivo, mentre il filtrato, da essi ritenuto vitamina B₂, mostrava una spiccata azione curativa. Il filtrato si dimostrò solubile in alcool etilico in determinate concentrazioni, insolubile in etere e cloroformio, solubile in alcool amilico e stabile alla luce. Nello stesso anno Stare ⁽⁸⁶⁾ sperimentando contemporaneamente su ratti e polli concluse, in accordo con i ricercatori inglesi, che la vitamina B₂ era un complesso costituito almeno dalle flavine e dal fattore anti-pellagroso, entrambi necessari per l'accrescimento, accennando in via ipotetica ad una eventuale identità del fattore anti-pellagroso con la vitamina B₆ di Giorgy. In seguito la denominazione di vitamina B₂ (oggi rimasta alle flavine) del fattore anti-pellagroso fu sostituita da quella meno impegnativa di « fattore del filtrato » e l'ipotesi della sua identità con la vitamina B₆ fu definitivamente abbandonata in quanto Giorgy provò che quest'ultima era distrutta dall'esposizione alla luce, mentre il fattore del filtrato non era sensibile ⁽⁸⁴⁾.

Uno studio approfondito sulle proprietà del « fattore del filtrato » venne condotto nel 1936 da Lepkowsky e Jukes ⁽⁸⁷⁾, i quali poterono stabilire che esso differiva dalle vitamine B₁ e G perchè non adsorbibile in soluzione acida su terra di folloni e carbone, dalla vitamina B₁ perchè non veniva distrutto dal riscaldamento in autoclave, dalla vitamina G perchè non veniva distrutto per esposizione al calore secco a 120° e perchè restava inalterato alla luce.

Lo studio della sua distribuzione in svariati alimenti portò alla conclusione che essa non era simile a quella della vitamina PP e quindi quest'ultima, in seguito riconosciuta come amide dell'acido nicotinico, non

⁽⁸⁴⁾ Biochem J., 29, 741-760-767 (1935).

⁽⁸⁵⁾ J. Biol. Chem., 108, 709 (1935)

⁽⁸⁶⁾ J. Biol. Chem., 111, 567 (1935).

⁽⁸⁷⁾ J. Biol. Chem., 115, 557 (1936)

poteva con ogni probabilità essere identificata con il fattore antidermatico del pollo. Fu questa dunque la prima affermazione che la pellagra umana e la dermatite del pollo erano probabilmente dovute a carenza di fattori diversi.

Gli stessi Autori in collaborazione con Krause ⁽⁸⁸⁾ proseguirono nei tentativi di identificazione di questo « terzo fattore » del complesso vitaminico B, cioè del residuo ottenuto dopo aver rimosso le vitamine B₁ e G con un leggero adsorbimento su terra di folloni. Sottoponendo tale residuo ad un nuovo e prolungato adsorbimento su terra di folloni riuscirono a separarlo in due fattori diversi: *fattore 1* l'adsorbito, che preveniva la dermatite dei ratti mentre era inattivo su quella dei polli, e che in seguito si vide corrispondere alla vitamina B₆ di Giorgy; *fattore 2* che invece preveniva la dermatite del pollo e al quale nelle successive ricerche fu riservata la denominazione di *fattore del filtrato*. Le esperienze furono eseguite nel seguente modo: ratti venivano sottoposti a dieta carenzata del complesso B, con aggiunta però delle vitamine B₁ e G: si otteneva così un arresto della crescita. Aggiungendo a tale dieta il fattore 2 si aveva una lenta ripresa della crescita, ma si sviluppava nella quasi totalità degli animali una dermatite acuta: soltanto con l'aggiunta del fattore 1 l'accrescimento si normalizzava del tutto e regrediva la dermatite. L'aggiunta del solo fattore 1 dava un lieve aumento di peso senza sintomi cutanei. La mancanza combinata di ambedue i fattori provocava l'arresto totale della crescita e la morte degli animali in poche settimane. Nei polli invece il fattore 1 non mostrava alcuna apprezzabile azione nè sulla crescita, nè sulla dermatite; mentre con l'aggiunta del fattore 2 si otteneva una buona ripresa dell'accrescimento e la guarigione delle lesioni cutanee.

Le cose stavano a questo punto quando, nel medesimo anno, Elvehjem, Koehn ed Oleson ⁽⁸⁹⁾ studiando il fabbisogno alimentare del ratto e adoperando diete ed estratti vitaminici altamente purificati, trovarono che oltre alla vitamina B₁ somministrata in forma cristallina, alla B₄ e alla B₆ fornite da estratti di grano bianco, alla G (lattoflavina) e al fattore antipellagroso del pollo (fattori 1 e 2 del filtrato) i ratti richiedevano per il loro accrescimento un altro fattore. Esso si trovava nel precipitato alcool-etereo che si otteneva nella separazione delle flavine dagli estratti di fegato e che abitualmente veniva scartato: la sua somministrazione dava rapidamente una crescita normale. Il fattore in questione era termolabile come la vitamina B₁ e mostrava cospicue differenze dagli altri fattori fino allora conosciuti: si distingueva dalle flavine, dalla B₁ e dal fattore antidermatitico del pollo perchè si separava da essi nel trattamento di estrazione, dalla B₄ e dalla B₆ per la diversa fonte di origine.

⁽⁸⁸⁾ J. Biol. Chem., 115, 505 (1936).

⁽⁸⁹⁾ J. Biol. Chem., 115, 707 (1936).

Gli Autori assegnarono a questo fattore la denominazione di fattore precipitato alcool-etereo e in seguito per maggiore brevità di *fattore W*.

Restava allora da definire la natura precisa del fattore del filtrato, termine col quale si designava la frazione 2 ottenuta nel modo sopradescritto. Dell'argomento si occupava Jukes dal 1937, ^(90 91 92) il quale dopo averne studiato minutamente le caratteristiche chimiche si accorse che queste mostravano strette analogie con quelle dell'acido pantotenico. Si era ormai nel 1939 e già note erano le ricerche di Williams su quest'ultimo. E' pertanto merito di Jukes l'aver dimostrato che il fattore antidermatitico del pollo non era altro che l'acido pantotenico di Williams. Siamo di fronte al punto di collegamento fra due serie di ricerche diverse. Autori diversi, lavorando i primi sull'accrescimento dei lieviti, i secondi sullo accrescimento e sulle manifestazioni cutanee del pollo e del ratto, potevano così giungere ad eguali conclusioni: ed è questo un fatto di particolare importanza perchè, oltre ad avere apportato una luce su due intricati argomenti, rappresenta nella storia dei fattori vitaminici un esempio dello stretto parallelismo fra il mondo degli organismi superiori e quello degli organismi inferiori.

La prova decisiva dell'identificazione del fattore antidermatitico del pollo con l'acido pantotenico veniva fornita dalle seguenti esperienze: quattro gruppi di pulcini di 1 giorno di età vennero prima nutriti normalmente per otto giorni; quindi si somministrò loro per dieci giorni la surricordata «heated diet» di Kline: alla fine di questo periodo gli animali presentavano chiari sintomi di dermatite e arresto della crescita. Lasciando il primo gruppo e dieta carenzata, al secondo gruppo fu aggiunto giornalmente pantotenato di calcio, preparato dallo stesso autore alla dose di mg 1,5 per 10 g di dieta, al terzo gruppo alla dose di mg 10 per 10 g di dieta, mentre al quarto gruppo fu aggiunto giornalmente un estratto acquoso di crusca di riso alla dose di cm³ 3. Il peso rimase pressochè immutato nei primi due gruppi, mentre subì un notevole incremento nei secondi due. I sintomi cutanei, presenti in tutti gli animali del primo gruppo e nell'80% degli animali del secondo, scomparvero invece del tutto negli animali del terzo e del quarto. Fu così dimostrata l'identità fra l'acido pantotenico e il fattore antidermatitico contenuto nell'estratto di crusca di riso.

Alle ricerche di Jukes vennero presto numerose conferme, Woolley, Waismann ed Elvehjem ⁽⁹³⁾ dimostrarono che i concentrati di fattore antidermatitico del pollo erano rapidamente inattivati, come l'acido panto-

⁽⁹⁰⁾ J. Biol. Chem., 117, 11 (1937).

⁽⁹¹⁾ J. Biol. Che., 128, 35 (1939).

⁽⁹²⁾ J. Am. Chem. Soc., 61, 975 (1939).

⁽⁹³⁾ J. Am. Chem. Soc., 61, 997 (1939).

tenico, dal trattamento con alcali e da essi isolarono la β -alanina. Trovarono inoltre che aggiungendo al residuo, dopo estrazione della β -alanina, β -alanina sintetica si poteva sintetizzare una sostanza con attività pressochè uguale a quella del concentrato originario. In un lavoro successivo poi Jukes (⁹⁴) poté confermare la sua scoperta sperimentando con successo su un campione originale di acido pantotenico, fornitogli da Williams, in confronto con un estratto acquoso di crusca di riso, fonte naturale di fattore antidermatitico.

Giunti all'identificazione del fattore antidermatitico del pollo (o fattore del filtrato) con l'acido pantotenico, resta ora da chiarire quale sia il ruolo esatto di questo nella alimentazione del ratto (*), ricordando che il fattore del filtrato ha una certa importanza per il suo accrescimento. Il problema è piuttosto complesso in quanto il ratto richiede per il suo accrescimento un numero elevato di fattori; fra gli altri abbiamo già accennato alla vitamina B₆ e al fattore W.

E' appunto a quest'ultimo fattore che si riferiscono le ricerche di Elvehjem e coll. (⁹⁶). Essi ne studiarono le proprietà concludendo che trattavasi di un acido debole, solubile in fenolo e anilina e non in etere, distinto dalla vitamina B₆, dall'acido nicotinico e dal fattore antidermatitico del pollo. Nell'anno successivo essi riuscirono a dimostrare che i loro concentrati di fattore W contenevano acido pantotenico in maniera considerevole e che parte dell'attività stimolante la crescita era dovuta a questa vitamina sebbene essa non fosse in grado da sola di assicurare un normale accrescimento. Gli Autori separarono l'acido pantotenico mediante estrazione acido-eterea, dimostrandone la presenza in questo estratto col metodo già citato di Snell, Strong e Peterson sul *Lactobacillus casei*, e riservarono la denominazione di fattore W al residuo, anch'esso necessario per una crescita normale. I discordanti risultati degli Autori riportati precedentemente erano probabilmente dovuti al fatto che essi somministravano vitamina B₆ sotto forma di estratti di lievito contenente anche fattore W. A questo punto delle indagini sembrò quindi accertato che l'acido pantotenico giocava anch'esso un ruolo nell'accrescimento del ratto, come era stato grosso modo notato oltre ad Elvehjem e coll. da Subbarow e Hutchings nello stesso anno (⁹⁷).

(⁹⁴) J. Biol. Chem., 129, 225 (1939).

(*) Riferiamo incidentalmente le osservazioni di Nelson ed Evans (⁹⁵) secondo i quali la carenza di acido pantotenico, iniziata soltanto nel giorno dell'accoppiamento, determinerebbe nelle ratte femmine l'interruzione della gravidanza con riassorbimento degli embrioni.

(⁹⁵) J. Nutr., 31, 497 (1946).

(⁹⁶) J. Biol. Chem., 128, 23, (1939).

(⁹⁷) J. Biol. Chem., 132, 65 (1940).

Una prova decisiva di questa asserzione venne fornita da Oleson, Woolley e Elvehjem ⁽⁹⁸⁾ i quali poterono stabilire con maggiore precisione l'attività dell'acido pantotenico sull'accrescimento del ratto. La dieta base da essi adoperata era la seguente: saccarosio, caseina purificata, miscela salina di Mendel Osborne, olio vegetale; con aggiunta di tiamina, riboflavina, vitamina B₆ sintetica, acido nicotinico e colina; inoltre ad ogni ratto venivano somministrate due gocce di olio di fegato di merluzzo per settimana. L'acido pantotenico necessario per le esperienze era ricavato da un estratto di fegato, da cui si otteneva un concentrato contenente circa il 10% della sostanza determinata mediante il saggio microbiologico. I risultati ottenuti furono i seguenti: i ratti ricevanti soltanto la razione basale fin dall'epoca dello svezzamento si dimostrarono incapaci di accrescersi, arrestandosi a pesi variabili fra i 40 e i 60 grammi. Aggiungendo 250 mg di estratto di fegato pro die si ebbe un accrescimento di g 3-4 al giorno; con l'aggiunta di una quantità di concentrato capace di fornire 100 γ al giorno di acido pantotenico la crescita era di g 2-4 in media. Se il concentrato veniva previamente trattato con alcali i ratti si comportavano come quelli posti soltanto a dieta basale. Con quantità maggiori di acido pantotenico non si riuscì ad ottenere una crescita più spiccata. Considerando poi gli incrementi settimanali di crescita si trovò che i ratti ricevanti il concentrato di acido pantotenico crescevano meglio durante le prime due o tre settimane, mentre nelle successive la crescita diveniva più lenta. Evidentemente i ratti mancavano di un fattore in aggiunta all'acido pantotenico e presente invece negli estratti di fegato, quale il fattore W. Inoltre la β -alanina da sola non era capace di dare alcuna crescita e così neppure la frazione lattonica dell'acido pantotenico; il che fa pensare che il ratto richieda l'intera molecola per il suo accrescimento. Ci siamo dilungati nello esporre i risultati di queste ricerche perchè esse costituiscono il primo studio veramente completo dell'azione biologica dell'acido pantotenico sull'accrescimento del ratto.

A conferma di questi risultati dobbiamo riportare le ricerche degli Autori inglesi che giunsero ad identiche conclusioni. Essi ritenevano la vitamina B₂ « il costituente termostabile del complesso B che deve essere aggiunto alle diete contenenti tutti gli altri fattori dietetici essenziali, compresa la vitamina B₁; per mantenere l'accrescimento e lo stato di salute del ratto » [Chick, Copping, Edgar ⁽⁹⁹⁾]. Considerata da questo punto di vista la vitamina B₂ appariva come un complesso del quale si vennero identificando via via i vari costituenti. Nel 1938 Edgar, El Sadr e Macrae ⁽¹⁰⁰⁾ sottoponendo estratti di fegato privati della vitamina B₁ e delle

⁽⁹⁸⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 42, 151 (1939).

⁽⁹⁹⁾ Biochem. J., 29, 722 (1935).

⁽¹⁰⁰⁾ Biochem. J., 32, 2200 (1938)

flavine ad adsorbimento su terra di folloni li separarono in due fattori: «fattore dell'eluito» con azione sulla dermatite dei ratti (uguale al fattore 1 di Lepkowsky e alla vitamina B₆ di Giorgy) e «fattore del filtrato» con azione sull'accrescimento dei ratti stessi (uguale al fattore 2 di Lepkowsky). Lo studio delle proprietà chimiche di quest'ultimo, condotto da Macrae, Todd, Lytgoe, Work, Hind, El Sadr ⁽¹⁰¹⁾, mostrò una notevole analogia fra le sue proprietà e quelle dell'acido pantotenico di Williams, per cui gli Autori si proposero di accertare una eventuale identità fra le due sostanze. In precedenza ⁽¹⁰²⁾ avevano dimostrato che nei loro estratti di fegato erano presenti, oltre ai membri già noti del complesso B₂ necessari per l'accrescimento dei ratti (riboflavina, nicotinamide, vitamina B₆), almeno altri tre fattori sconosciuti: il *fattore α* o fattore del filtrato, a carattere acido, estraibile in soluzione acida con alcool amilico, labile ad acidi e ad alcali e non adsorbibile su terra di folloni; il *fattore β* non estraibile in soluzione acida per mezzo di solventi organici e identico secondo gli Autori al fattore W di Elvehjem e al fattore Bw di Lunde e Kringstad; e il *fattore γ* di natura imprecisata, la cui presenza era dimostrata dal fatto che aggiungendo alla dieta dei ratti ricevuti i fattori α e β un estratto acido di fegato autoclavato si aveva un notevole aumento della crescita. Ricerche di microtitolazione eseguite nel 1940 da Lytgoe, Macrae, Stanley, Todd e Work ⁽¹⁰³⁾ mostrarono la natura acida del fattore del filtrato (fattore α), la presenza di un legame amidico nella sua molecola e la liberazione dopo idrolisi con alcali di una frazione aminoacida e di un'altra di tipo lattonico. La frazione aminoacida fu estratta come β-naftalenesulfonil-β-alanina, mentre la frazione lattonica venne coniugata con β-alanina sintetica. I materiali suddetti e un campione di pantotenato di calcio vennero sperimentati sui ratti a dieta carente di 1 complesso B con aggiunta di vitamina B₁, di riboflavina e di vitamina B₆ cristallizzata. In tali condizioni sperimentali gli Autori ottennero un buon accrescimento settimanale con la somministrazione di una dose pro die di fattore del filtrato o di 100 o meglio ancora di 50 γ di pantotenato di calcio, ovvero della frazione lattonica coniugata con la β-alanina. Insignificanti risultati si ottennero con 25 γ giornalieri di pantotenato, mentre la somministrazione contemporanea di 1 dose di fattore del filtrato + 100 γ di pantotenato di calcio non aumentò che di poco l'accrescimento ottenuto con ciascuna di queste sostanze isolatamente somministrate. La frazione lattonica da sola si dimostrò inefficace. Con queste ricerche poté dunque confermarsi, oltre alla identità chimica, l'identità di azione biologica fra fattore del filtrato e acido pantotenico. Le due

⁽¹⁰¹⁾ Blochem. J., 33, 1681 (1939).

⁽¹⁰²⁾ Biochem. J., 32, 2225 (1938).

⁽¹⁰³⁾ Biochem. J., 34, 1335 (1940).

sostanze mostrarono di potersi vicendevolmente sostituire; la dose ottimale per il ratto di pantotenato di calcio risultò essere di 50 γ giornalieri.

Ad analoghe conclusioni giunsero Lunde e Kringstad ⁽¹⁰⁴⁾, i quali oltre al fattore antidermatitico del pollo, identificabile con l'acido pantotenico, indicarono come fattore Bw un fattore necessario all'accrescimento del ratto e uguale al fattore W di Elvehjem. Distinsero inoltre il fattore Bx capace, come vedremo, di prevenire la acromotrichia dei ratti neri, fattore che poi finirono con l'identificare con l'acido pantotenico.

Fin qui le ricerche che portarono alla identificazione del fattore antidermatitico del pollo con l'acido pantotenico, e quindi alla definizione del ruolo che questo fattore esercita nell'accrescimento del ratto.

Uno studio recente e abbastanza completo sull'azione biologica dell'acido pantotenico nel ratto è dovuto a Schwartz ⁽¹⁰⁵⁾. Di questo lavoro avremo occasione di occuparci diffusamente a proposito delle nostre ricerche sperimentali. Acenniamo quindi soltanto ai risultati in esso riepilogati. Un lotto numeroso di ratti, sottoposto ad una particolare preparazione per impedire l'eventuale accumulo di riserve di acido pantotenico, fu posto a dieta carenzata con l'aggiunta opportuna di vitamine, seguendo i criteri del citato studio di Oleson, Woolley ed Elvehjem. Il 72% degli animali così trattati arrestò il suo accrescimento fra la terza e la quinta settimana di esperimento. A questo punto fu somministrato l'acido pantotenico sotto forma di pantotenato di sodio. In tal modo l'Autore ottenne una ripresa del peso proporzionale alla dose di vitamina somministrata. Potè così fissare la Unità ratto in quella quantità di sostanza che somministrata giornalmente provocava un aumento di peso pari a 20 grammi in 4 settimane e tale U.R. trovò corrispondente a 21 γ di acido pantotenico. Dal complesso delle esperienze risultò che la crescita era in generale minima nelle prime due settimane, mentre diveniva notevole dalla terza settimana in poi, e durava per qualche settimana. L'Autore propose di stabilire con tal metodo un test di controllo per il dosaggio dell'acido pantotenico contenuto nei vari preparati. Il metodo più appropriato di valutazione è rappresentato, secondo Schwartz, dalla valutazione del tempo impiegato per la crescita di 20 grammi: una volta ottenutasi tale crescita, il valore attivo dell'acido pantotenico diminuirebbe considerevolmente; il che spinse l'Autore a pensare alla necessità di un altro fattore da aggiungere all'acido pantotenico per ottenere un accrescimento, durevole e normale. Infatti, tanto nelle prove curative che in quelle preventive, gli animali raggiunto il peso medio di 125 grammi arrestavano la loro crescita; fatto che indusse Schwartz a designare tale fattore aggiuntivo come fattore 125.

⁽¹⁰⁴⁾ Naturwiss., 28, 157 (1940).

⁽¹⁰⁵⁾ H. S. Zeitsch. f. Phys. Chem., 275, 232 (1942).

Nel corso della nostra trattazione abbiamo visto come ad uno ad uno sono stati identificati da una unica fonte numerosi fattori, oggi ben noti, che trovano applicazione nella prevenzione e nella cura di parecchie malattie dell'uomo e degli animali. Ardua è stata l'opera degli Autori sia per la non perfetta purificazione delle diete e degli estratti in principio adoperati, sia per la effettiva identità fra vari fattori che, identificati separatamente da Autori diversi, venivano diversamente denominati. Ma è stato appunto questo lavoro di identificazione di fattori apparentemente diversi, l'opera mirabile che abbiamo avuto occasione di passare in rassegna. Ormai con la scoperta di altri fattori questa opera chiarificatrice è giunta a posizioni avanzate ed è da augurarsi che presto venga completata in maniera da poter permettere una chiara e completa illustrazione del capitolo delle vitamine del complesso B.

Sintomi cutanei del ratto. — Il trofismo cutaneo del ratto riveste una particolare importanza nei riguardi dell'azione biologica dell'acido pantotenico, per cui siamo costretti per ragioni di chiarezza a farne un capitolo separato. Il quadro carenziale da mancanza di vitamina B₆ nel ratto è rappresentata dalla cosiddetta «acrodinia». Questa si manifesta con lesioni eritematose ed erosive intorno al naso, accompagnate da abbondante secrezione, con arrossamento e tumefazione delle zampe e in alcuni casi con incrostazioni alle orecchie. Invece la mancanza di acido pantotenico nella dieta determinerebbe la cosiddetta «acromotrichia». Tale schematizzazione non corrisponde purtroppo esattamente alla realtà. Controverse sono le descrizioni delle lesioni cutanee secondo i diversi Autori e non tutti ammettono la relazione dell'acromotrichia con il deficit di acido pantotenico; d'altra parte spesso all'alterazione strettamente pigmentaria si accompagnano nelle descrizioni, una serie di altri sintomi cutanei che rendono i quadri carenziali estremamente variabili. Vediamo dunque di passare in rassegna le ricerche che hanno portato ad una esatta definizione delle manifestazioni cutanee da carenza di acido pantotenico.

L'acromotrichia fu segnalata per la prima volta nel 1939 da Bakke, Aschelong e Zibiden ⁽¹⁰⁶⁾, i quali somministrando a ratti neri una dieta priva di vitamina B, con semi di frumento al posto di quest'ultima, osservarono che il pelo, iniziando con chiazze per lo più simmetriche e progressivamente estendentisi, diveniva grigio argenteo. Gli Autori pensarono che il fenomeno fosse dovuto alla presenza nella loro dieta di una eventuale sostanza velenosa; solo più tardi la sindrome fu messa in relazione con una carenza vitaminica. Nel 1938 Morgan, Cook e Davison ⁽¹⁰⁷⁾ osservarono che alimentando ratti con diete prive o povere di fattore del filtrato il loro pelo presentava delle zone di depigmentazione, senza che

⁽¹⁰⁶⁾ C. R. Acad. Sci., 191, 1157 (1930).

⁽¹⁰⁷⁾ J. Nutr., 15, 27 (1938).

gli animali presentassero segni di dermatite o alopecia e arrestassero la loro crescita. La sindrome osservata non veniva attenuata o prevenuta dalla somministrazione di vitamina B₆ o di lattoflavina, che piuttosto la aggravavano; e inattivi si dimostravano pure sia gli idrati di carbonio che i sali di rame.

Il rapporto esistente fra fattore del filtrato e acromotrichia veniva messo quasi contemporaneamente in evidenza da Lunde e Kringstad (¹⁰⁸⁻¹⁰⁹), i quali nel tentativo di isolare il fattore antigrigio da loro chiamato Bx, e caratterizzarne la posizione nei riguardi del fattore antidermatico del pollo di Jukes e del fattore di accrescimento del ratto (da loro chiamato Bw) condussero una serie di esperienze che vale la pena di riportare. Gli Autori, somministrando agli animali una dieta priva di vitamina B con aggiunta di aneurina e lattoflavina, ottennero in 3-6 settimane una dermatite a tipo pellagroso che guarì con la somministrazione di vitamina B₆. Guarita la dermatite non si ebbe però miglioramento della crescita e comparve una alterazione del pelo: nei ratti albinici macchie prima brune, poi rossiccie, che dal capo si estendevano al dorso; nei ratti neri chiazze simmetriche in cui il pelo diveniva grigio perla. In nessuno degli animali fu possibile ottenere contemporaneamente la comparsa della acrodinia e della acromotrichia: la mancanza di entrambi i fattori dunque determinava soltanto la comparsa della prima manifestazione. L'acromotrichia in alcuni casi scompariva spontaneamente dopo 12 settimane; ma veniva guarita, insieme con l'arresto della crescita, dalla somministrazione di sostanze contenenti il fattore del filtrato. Un estratto metilico di crusca di riso era capace di favorire la crescita ma non influiva sulla acromotrichia; mentre il residuo dell'estrazione non era capace di influire nè sulla crescita nè sulla manifestazione del pelo. Gli Autori allora conclusero, dopo avere escluso con la somministrazione di sali di ferro o di rame, che l'acromotrichia fosse dovuta ad un fattore anemico, che il fattore di accrescimento era estraibile con alcool metilico, mentre il fattore antigrigio veniva perduto forse perchè termolabile. Con queste ricerche si venne quindi a confermare che l'acrodinia era dovuta a deficit di vitamina B₆ mentre per l'arresto del peso e per l'acromotrichia entravano in gioco due fattori, termostabile ed estraibile con alcool metilico il primo, termolabile e non estraibile il secondo, fattore antigrigio.

L'esistenza di due fattori diversi per l'acrodinia e per l'acromotrichia fu confermata nell'anno successivo da Oleson, Bird, Elvehjem ed Hart (¹¹⁰), i quali descrissero dapprima una tipica acrodinia e quindi la comparsa di erosioni e di alopecia periorbitali a forma di occhiali con

(¹⁰⁸) H. S. Zeitsch. f. Phys. Chem., 257, 201 (1938).

(¹⁰⁹) J. Nutr., 29, 321 (1940).

(¹¹⁰) J. Biol. Chem., 127, 23 (1939).

secrezione di essudato vischioso. Il filtrato su terra di folloni di un estratto di fegato guariva i sintomi oculari (ed era anche in grado di guarire la dermatite dei polli), mentre l'eluato era efficace sulla acrodinia ed il fattore W era necessario per ottenere una crescita perfetta. Nello stesso anno Oleson, Elvehjem ed Hart ⁽¹¹¹⁾ portando i loro studi sulla acromotrichia, cercarono di stabilire le relazioni esistenti fra fattore antigrigio, fattore W, acido pantotenico e il fattore che preveniva le lesioni periorculari. Essi trovarono che l'estratto di fegato intero era attivissimo, attivo anche il fattore del filtrato; mentre l'eluato, l'olio di grano che preveniva l'acrodinia, l'acido adenilico, la vitamina B₆, l'acido pantotenico e il fattore W erano inattivi nel riportare alla norma le condizioni del pelo.

In conclusione quindi, mentre per l'acrodinia fu facile identificare il fattore che poteva provenirla nella Vitamina B₆, per la acromotrichia e per le altre lesioni cutanee, pur ammettendo l'efficacia del fattore del filtrato, a questo punto delle ricerche, non si era ancora riusciti, forse a causa della sua termolabilità che ne rendeva difficile l'estrazione, ad identificare precisamente quale fattore riuscisse a prevenirla, nè a stabilire se si trattasse di un solo o più fattori, nè ad attribuire tale azione all'acido pantotenico.

Oltre ai quadri carenziali cutanei già descritti, altri più complessi costituiti da chiazze grigie simmetriche, diradamento del pelo con irrudimento e perdita della normale lucentezza, dermatite squamosa generalizzata, infiammazione della mucosa nasale e croste ematiche all'inserzione dei baffi, venivano ottenuti da Unna e Samson ⁽¹¹²⁾: tali lesioni venivano reintegrate dal pantotenato di calcio in dosi giornaliere di 80-100 γ o da concentrati di crusca di riso o di fegato a pari contenuto di acido pantotenico, dosato microbiologicamente. Lo stesso Unna ⁽¹¹³⁾, ottenuto in carenza l'arresto del peso dei ratti, notava, alla seconda settimana, diradamento del pelo con comparsa di macchie rugginose, secrezione nasale, talora ematica, ulcere periorali e croste ematiche ai baffi. Il diradamento del pelo era talmente intenso da mettere a nudo la pelle, ruvida e squamosa. Il processo iniziava in genere alla testa e si irradiava a tutto il corpo, e nel 10-20% degli animali si aveva tumefazione ed essudato palpebrale con formazione di un alone alopecico periorcolare: all'autopsia si notavano manifestazioni emorragiche sottocutanee, viscerali e surrenali. L'acido pantotenico sintetico, alla dose di 80 γ giornalieri ristabiliva l'accrescimento e migliorava nettissimamente, ma non

⁽¹¹¹⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 42, 283 (1939).

⁽¹¹²⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 45, 309 (1940).

⁽¹¹³⁾ J. Nutr., 20, 565 (1940).

completamente, le manifestazioni cutanee. Nè la frazione lattonica, nè la β -alanina da sole si dimostravano attive.

A questa identificazione dell'acido pantotenico come il fattore capace di prevenire, anche se non completamente, le manifestazioni del tipo di acromotrichia del ratto, si aggiungono affermazioni di altri Autori e di particolare importanza quella già citata di Lunde e Kringstad, i quali finirono con l'identificare con fattori ormai noti quei fattori, sia dell'accrescimento che delle manifestazioni cutanee, che avevano diversamente denominati. Essi infatti conclusero per l'esistenza nel filtrato del fattore antidermatico del pollo o acido pantotenico; del fattore Bw di accrescimento, molto probabilmente uguale al fattore W; ed infine del fattore Bx che, per le sue caratteristiche chimiche, per la sua labilità e per la sua attività biologica sui sintomi cutanei, dimostrarono in seguito identico all'acido pantotenico [in collaborazione con Jansen ⁽¹¹⁴⁾]. Dello stesso parere circa l'attività dell'acido pantotenico sul trofismo cutaneo furono anche Subbarow ⁽¹¹⁵⁾, Giorgy e Polling ⁽¹¹⁶⁾, Morgan e Simms ⁽¹¹⁷⁾, Frost, Moore e Dan ⁽¹¹⁸⁾, Unna, Richard e Samson ⁽¹¹⁹⁾ pur ammettendo una certa incostanza dell'azione e, in ogni caso, una influenza non completa. Parere diverso è invece espresso da altri fra i quali i già citati Oleson, Elvehjem e Hart, lo stesso Williams ⁽¹²⁰⁾, Nielsen, Oleson Elvehjem ⁽¹²¹⁾ e, in un certo senso, anche Emerson ed Evans ⁽¹²²⁾. Per questi ricercatori non è confermata l'azione dell'acido pantotenico sulla acromotrichia. E' difficile poter spiegare la ragione di tale diversità di vedute, conseguenza di osservazioni contrastanti. Forse bisognerà richiamare alla memoria l'esistenza di altri fattori più di recente identificati: quali l'acido pteroilglutammico o folico, o meglio la vitamina H₁ o acido paraaminobenzoico, che spiega una azione di prevenzione sulla acromotrichia, ma occorrerebbe andare più a fondo studiando quali rapporti esattamente intercorrano fra questi due ultimi fattori e l'acido pantotenico. Comunque non crediamo possibile oggi poter dubitare dell'azione che l'acido pantotenico esplica sul processo di elaborazione del pigmento al quale ci sembra, oltre che alla crescita strettamente legato. Una ricerca veramente chiarificatrice in proposito è quella condotta da

⁽¹¹⁴⁾ Naturwiss., 28, 550 (1940).

⁽¹¹⁵⁾ J. Biol. Chem., 132, 789 (1940).

⁽¹¹⁶⁾ Science, 92, 202 (1940).

⁽¹¹⁷⁾ J. Nutr., 19, 223 (1940).

⁽¹¹⁸⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 46, 507 (1941).

⁽¹¹⁹⁾ J. Nutr., 23, 553 (1941).

⁽¹²⁰⁾ Science, 92, 561 (1940).

⁽¹²¹⁾ J. Biol. Chem., 133, 637 (1940).

⁽¹²²⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 46, 655 (1941).

Schartz (¹²³) contemporaneamente a quelle condotte sull'accrescimento del ratto.

Secondo questo Autore, nei ratti posti nelle stesse condizioni di carenza adottate per lo studio dell'accrescimento, l'acromotrichia appare dopo la terza settimana: il periodo di latenza richiesto per la comparsa delle alterazioni coincide in generale con quello necessario per la comparsa dei primi sintomi di guarigione. Ciò per il fatto che non si tratterebbe di scoloramento dei peli già esistenti, ma della crescita di nuovi peli depigmentati. Il pelame del ratto sarebbe costituito da due tipi di peli, il primo lanoso, fine, soffice, e corto; il secondo robusto, lungo e lucido, che copre il precedente determinando il colore. Quest'ultimo sarebbe soggetto all'acromotrichia mentre il primo cade prolungando il tempo di carenza. L'acromotrichia insorge più rapidamente negli animali giovani; mentre è più lenta nei vecchi in cui meno attivo è il ricambio del pelame. Gli eventuali quantitativi di acido pantotenico presenti nell'organismo all'inizio dell'esperienza vengono quindi utilizzati più per la crescita dell'animale che per l'elaborazione della melanina: essendo l'acido pantotenico necessario per ambedue le funzioni, esse entrerebbero quasi in concorrenza con prevalenza della funzione biologicamente più importante quale è quella dell'accrescimento. Con la somministrazione di 20 γ giornalieri di acido pantotenico l'Autore ottenne la guarigione dell'80% degli animali trattati; mentre la stessa quantità somministrata profilatticamente si dimostrava efficace sull'87%. Con dosi minori, insufficienti a sopperire al completo fabbisogno, si poteva ottenere un buon ritmo di accrescimento, ma compariva lo stesso l'alterazione del pelo; le stesse dosi, superato il periodo di accrescimento, erano capaci, perchè non più utilizzate per questo, di guarire l'acromotrichia. A parte la questione delle dosi, l'acido pantotenico esplicherebbe in conclusione una azione elettiva sia sull'accrescimento che sul trofismo cutaneo del ratto. Questa ricerca costituisce quindi una valida conferma alle ricerche dei precedenti Autori.

Azione sul topino. — L'osservazione di Birch, Giorgy e Harris (¹²⁴), che sottoponendo i topini alla dieta di Goldberger con aggiunta di tiamina e riboflavina, notarono arresto del peso e la comparsa di lesioni cutanee che nelle stesse condizioni non apparivano nel ratto, ha richiamato l'attenzione dei ricercatori sulla diversità esistente fra il fabbisogno alimentare del ratto e quello del topino.

Nel 1940 Norris e Hauschild (¹²⁵) alimentando i topini con una dieta composta di caseina purificata, saccarosio, olio di fegato di merluzzo,

(¹²³) H. S. Zeitch. f. Phys. Chem., 275, 245 (1942).

(¹²⁴) Biochem. J., 29, 2830 (1935).

(¹²⁵) Science, 92, 316 (1940) e 92, 384 (1940).

burro, miscela salina ed aggiungendovi diverse dosi di piridossina, tiamina, acido nicotinico, riboflavina, notarono in 30-40 giorni la comparsa di una sintomatologia carenziale che poteva esser guarita dall'aggiunta di lievito oppure di un estratto idroalcoolico di lievito o di fegato, mentre non veniva modificata dal filtrato dopo adsorbimento su terra di folloni. Gli animali arrestavano il loro accrescimento e la sintomatologia cutanea presentava i seguenti caratteri: zampe, orecchie, naso, coda e, nella maggior parte dei casi, occhio normali; raramente un essudato vischioso perioculare; perdita del pelo all'addome, che lasciava la pelle umida e splendente alla regione inguinale, con rapida comparsa di squame furfacee sul dorso, al collo e all'inguine. Se gli animali riuscivano a superare tale stadio di carenza la pelle frequentemente cominciava a distaccarsi in larghi lembi, particolarmente sul dorso, lasciandone una nuova sottostante priva di pelo, umida ma per il resto di aspetto normale; e in alcuni casi fu possibile mantenere in vita gli animali fino alla perdita completa del pelo, eccetto alcune piccole zone coperte da una fine peluria attorno alla testa. Tale sintomatologia non si sviluppava in tutti i casi; in alcuni si generalizzava la dermatosi squamosa, ricoprendo tutto il mantello cutaneo di squame furfacee bianchiccie e umide.

L'inositolo si dimostrò capace di migliorare la suddescritta sintomatologia, ma ben presto si vide l'importanza dell'acido pantotenico nel prevenire e curare tali manifestazioni. Woolley fu così in grado di studiare la relazione esistente fra le due sostanze ⁽¹²⁶⁾. Egli vide che aggiungendo alla dieta base inositolo, alla dose di 100 mg per 100 grammi di razione non si verificavano i fenomeni citati, ma dopo qualche settimana si notava un deficit di accrescimento e la comparsa di una serie di disturbi neuro-muscolari costituiti da ipereccitabilità, difficoltà nel controllo del treno posteriore e forse crisi dolorose, denunciate dalla comparsa di movimenti rapidi e violenti e squittii. Successivamente insorgevano accessi di contrazioni cloniche del treno posteriore ed infine una più o meno completa paralisi. In alcuni animali invece si notò la comparsa di abbondante essudazione perioculare e di una alopecia simile a quella descritta dagli altri Autori. Non sempre fu notata la coesistenza delle due sindromi, la neuro-muscolare e la cutanea; in qualche caso alla prima non seguì la seconda; in altri comparve soltanto la seconda accompagnata dal solo deficit di accrescimento. L'acido pantotenico si dimostrò capace alla dose di 5 mg per 100 grammi di dieta, di guarire tutte le manifestazioni sopradescritte e in qualunque stadio. D'altra parte la stessa dieta con l'aggiunta del solo acido pantotenico senza inositolo produceva un rallentamento della crescita e, a partire dalla sesta settimana, la com-

⁽¹²⁶⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 46, 565 (1941).

parsa della alopecia; disturbi che potevano essere guariti dall'aggiunta di inositolo.

Fu così dimostrata e in seguito confermata da Norris e Lippincott ⁽¹²⁷⁾ l'importanza dell'acido pantotenico per l'accrescimento ed il trofismo neuro-muscolare e cutaneo del topino.

Azione sul cane. — Il fabbisogno alimentare del cane in rapporto all'acido pantotenico fu studiato nel 1940 da Mc Kibbin, Black, Elvehjem ⁽¹²⁸⁾, i quali notarono che i cuccioli alimentati con dieta priva di acido pantotenico rimanevano piccoli e gracili e soccombevano facilmente. Gli Autori pensarono però alla contemporanea necessità, per un buon accrescimento, di altri fattori e in particolare del fattore W. Due anni dopo Schaefer, Mc Kibbin ed Elvehjem ⁽¹²⁹⁾ descrissero con precisione la sindrome da carenza di acido pantotenico nel cane. Essa si sviluppava nel giro di 4-6 settimane nei cuccioli appena divezzati e si manifestava con arresto della crescita, turbe gastro-intestinali, rapida e grave prostrazione fino allo stato comatoso, polipnea, tachicardia, convulsioni, morte. Tali manifestazioni venivano in seguito illustrate da Silber ⁽¹³⁰⁾.

L'acido pantotenico, capace di guarire le manifestazioni descritte, alla dose di 100 mg pro die per Kg di peso per via endovenosa, si dimostrò quindi indispensabile per l'accrescimento del cane.

Azione sul maiale — Hughes ⁽¹³¹⁾ nel 1942, segnalò per il primo l'importanza dell'acido pantotenico per l'accrescimento del porco. Nell'anno successivo Wintrobe, Follis, Alcayaga, Paulson, Humphreis ⁽¹³²⁾ descrissero in giovani porci le manifestazioni prodotte dalla somministrazione di una dieta priva di acido pantotenico: dapprima essi presentavano diarrea, perdita di appetito, e spiccato arresto di accrescimento; quindi tosse con abbondante secrezione nasale, perdita del pelo e alterazioni infiammatorie della lingua. Alla rettoscopia rilevavasi la presenza di colite con iperemia della mucosa, edema e focolai emorragici; mentre l'esame del sangue metteva in evidenza uno spiccato stato di anemia e, analogamente a quanto osservato nei cani, diminuzione dei cloruri plasmatici, talora ipoglicemia, e nella fase terminale iperazotemia spiccata: l'acido pantotenico, alla dose di 500 mg pro die per Kg di peso, era capace di ricondurre alla norma le condizioni descritte.

Azione sull'uomo. — Scarse in verità sono le conoscenze sull'attività biologica dell'acido pantotenico sull'uomo, sulla sua azione preventrice

⁽¹²⁷⁾ J. Nat. Canc. Inst., 2, 39-47 (1941).

⁽¹²⁸⁾ Am. J. Phys., 130, 365 (1940).

⁽¹²⁹⁾ J. Biol. Chem., 143, 321 (1942).

⁽¹³⁰⁾ J. Nutr., 27, 425 (1944).

⁽¹³¹⁾ J. Agric. Res., 64, 185 (1942).

⁽¹³²⁾ Bull. J. Hopkins. Hosp., 73, 313 (1943).

o curativa di eventuali manifestazioni morbose. E tale scarsezza sembra ancora più notevole quando si pensi alla vasta mole delle ricerche sull'azione del nostro fattore su altri organismi. Non si conosce una avitaminosi nè una ipovitaminosi umana da acido pantotenico. L'azione dimostrata da questo fattore sul trofismo cutaneo di alcuni animali ha portato l'attenzione di alcuni Autori su una eventuale azione sul trofismo del pelo umano e contro l'incanutimento dei capelli. Brandaleone, Main e Steele ⁽¹³³⁾ somministrando a 19 soggetti attempati con capelli grigi, per otto mesi consecutivi, 200 mg di pantotenato di calcio, 50 mg di acido paraminobenzoico e 5 g di lievito di birra pro die, soltanto in due casi ottennero un ripristino del colore bruno dei capelli; mentre negli altri 17 casi non notarono alcun miglioramento, o tutt'al più la comparsa di discutibili sfumature giallastre o verdognole nei capelli grigi.

Poco giustificate ci sembrano quindi le speranze di un ringiovanimento ottenuto con la somministrazione di questo fattore vitaminico, prospettato come rimedio contro la caduta dei capelli e addirittura contro la canizie. Tenendo però conto dei parziali risultati ottenuti da Brandaleone e collaboratori sarebbe necessario un più approfondito studio, pur rilevando le difficoltà della sperimentazione umana.

Ben più importante appare l'attività dell'acido pantotenico come fattore antiemorragico. Tale azione già sospettata nei ratti in base al quadro della avitaminosi sperimentale [Daft e coll. ⁽¹³⁴⁾], è stata successivamente dimostrata nell'uomo e si esplicherebbe attraverso un aumento del numero e della conglutinabilità delle piastrine e con un aumento del fibrinogeno ematico. A questo proposito Annoni ⁽¹³⁵⁾, rifacendosi all'attività antiemorragica dimostrata dall'istidina e da altri amino-acidi, con un meccanismo non ancora sufficientemente chiarito, avanza l'ipotesi che l'azione antiemorragica dell'acido pantotenico possa essere attribuita alla β -alanina contenuta nella sua molecola.

L'evidente importanza dell'acido pantotenico nel metabolismo tissulare ha indotto infine Scielonoff e Naz ⁽¹³⁶⁾ a tentare con pomate e soluzioni che lo contengano la terapia locale di diverse forme morbose: noma, flemmoni con necrosi tissulari, escare, ustioni, cistiti ribelli. Gli Autori affermano che l'acido pantotenico possiede evidentemente proprietà stimolanti la riparazione dei tessuti lesi: esso agirebbe stimolando i processi fermentativi dei tessuti lesi e la fagocitosi; donde un aumento delle possibilità di difesa dai germi e dalle loro tossine.

⁽¹³³⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 53, 47 (1947).

⁽¹³⁴⁾ U. S. Publ. Health Sery. Pubbl. Health Rep., 56, 1353 (1940).

⁽¹³⁵⁾ Riforma Medica, 43, 1369 (1942).

⁽¹³⁶⁾ Gaz. San., 3, 32 (1943).

L'importanza dell'acido pantotenico quale fattore indispensabile per il normale trofismo del sistema nervoso è stata recentemente messa in luce da Gopalan ⁽¹³⁷⁾ e da Peraita ⁽¹³⁸⁾ il quale ultimo attribuisce ad una sua deficiente utilizzazione il verificarsi di sindromi parestesico-causalgiche riscontrate in Spagna durante la guerra civile e pertanto denominate « complesso sintomatico di Madrid ». Secondo Gopalan le manifestazioni causalgiche guarirebbero con la somministrazione di pantotenato di calcio alla dose di 20-40 mg pro die.

Il fabbisogno giornaliero di acido pantotenico per l'uomo sarebbe stato fissato per mg 10-12 pro die ⁽¹³⁹⁾.

OSSERVAZIONI ANATOMOPATOLOGICHE
NELLE CARENZE DI ACIDO PANTOTENICO

Pollo. — In carenza di acido pantotenico era stato osservato frequentemente lo sviluppo di alterazioni degenerative a carico del sistema nervoso centrale, capaci di dare talvolta la comparsa di manifestazioni paralitiche. Tali lesioni, secondo Philips ed Engel ⁽¹⁴⁰⁾ sarebbero però prevenute dalla somministrazione di riboflavina, alla cui carenza che determina lesioni cheratomalaciche nei nervi periferici, si dovrebbe la comparsa della paralisi; mentre nella carenza del solo acido pantotenico, pur riscontrandosi le alterazioni midollari, non comparirebbe paralisi.

Le lesioni di nervi periferici, che debbono attribuirsi a carenza associata di riboflavina e acido pantotenico, consistono, secondo i sopradetti Autori, in una tipica neuromalacia con rigonfiamento della mielina, degenerazione e frammentazione dei cilindrassi, cui si accompagna una tipica proliferazione delle cellule di Schwann.

Nel midollo si ha degenerazione della guaina mielinica largamente distribuita in tutte le fibre della sostanza bianca, eccetto che nella regione posteriore. Nel segmento brachiale le cellule nervose mostrano i segni di una cromatolisi dei corpuscoli di Neisser.

Nei preparati allestiti con l'impregnazione argentea si mettono in evidenza spazi vacuolari nelle sezioni trasverse, mentre nelle sezioni longitudinali si riscontrano frequentemente alterazioni dei cilindrassi con frammentazione delle neurofibrille.

Fra le alterazioni cutanee riscontrate ricordiamo le lesioni infiammatorie agli angoli della bocca e negli spazi interstiziali e la diffusa desquamazione secca dell'epitelio cheratinizzato.

⁽¹³⁷⁾ Ind. Med. Gaz., 81, 22 (1946).

⁽¹³⁸⁾ Int. Zeitsch. f. Vitaminforsch., 20, 1 (1948).

⁽¹³⁹⁾ J. Am. Med. Ass., 119, 1 (1942).

⁽¹⁴⁰⁾ J. Nutr., 18, 227 (1939).

Ratto. — All'esame autoptico dei ratti morti in carenza di acido pantotenico l'alterazione più caratteristica che si riscontra, oltre alla spiccata ipotrofia, alla disidratazione e alla scomparsa del tessuto adiposo, è la necrosi emorragica della corteccia delle ghiandole surrenali, che fu descritta da numerosi Autori e in modo particolare da Daft e coll. (¹⁴¹), e nello stesso anno dai già citati Morgan e Simms. L'aspetto istologico di queste lesioni, così come fu descritto da Nelson (¹⁴²), Ashburn (¹⁴³), consiste in congestione, emorragia, atrofia con necrosi parcellare e diffusa. La corticale si presenta spiccatamente impoverita nel contenuto in grassi, con fibrosi connettivale. La zona reticolare è fortemente colpita con comparsa e progresso delle lesioni dal centro verso la periferia. Nel 1946 Deane e McKibbin (¹⁴⁴) studiando il valore istochimico di queste lesioni, hanno trovato una spiccata diminuzione dei lipoidi e una progressiva scomparsa dei chetosteroidi che diviene completa nel giro di 6 settimane. Quanto sopra depone per una deficienza assoluta di ormone cortico-surrenale nei ratti in carenza di acido pantotenico.

A carico della tiroide Morgan e Simms hanno poi trovato che il colloide si colora uniformemente, mentre alcuni acini ghiandolari presentavano il lume interamente coperto da cellule epiteliali. Ciò depone per una relativa inattività della ghiandola stessa.

Le lesioni cutanee, di cui abbiamo già descritto il polimorfismo e l'incostanza, si presentano con alopecia, presenza di squame, inspessimento cutaneo con eventuali ulcerazioni. Microscopicamente il processo è rappresentato da una lieve ipercheratosi, acantosi, e paracheratosi incostante cui si associa talora un lieve grado di edema e vescicolazione. I follicoli piliferi sono dilatati e nelle zone di alopecia anche le ghiandole sebacee si presentano disintegrate. Abbiamo poi accennato ad altre lesioni cutanee che, sia pure incostanti, sono abbastanza caratteristiche. Tra queste importanza notevole hanno le incrostazioni ematiche intorno ai baffi, che ad una analisi più accurata condotta da McElroy, Salmon e Figge (¹⁴⁵) si rivelarono costituite non da sangue ma da coproporfirina secreta dalle ghiandole. In successive osservazioni gli Autori (¹⁴⁶) riuscirono a dimostrare che tali incrostazioni sono dovute ad una alterazione del metabolismo dell'acqua, secondaria alle lesioni necrotiche riscontrate nei surreni, e confermarono che la porfirina viene prodotta dalle ghiandole.

(¹⁴¹) U. S. Publ. Health Serv. Publ. Health Rep., 55, 1333 (1940).

(¹⁴²) U. S. Publ. Health Serv. Publ. Health Rep., 54, 2250 (1939).

(¹⁴³) U. S. Publ. Health Serv. Publ. Health Rep., 55, 1337 (1940).

(¹⁴⁴) Endocrinol., 38, 335 (1946).

(¹⁴⁵) Science, 94, 467 (1941).

(¹⁴⁶) J. Sab. a. Cl. Med., 27, 1495 (1942).

dole in quanto l'ablazione delle medesime era in grado di prevenire la comparsa di siffatte manifestazioni.

Tali lesioni cutanee, secondo Jurgens e Pfaltz ⁽¹⁴⁷⁾ sarebbero riproducibili facendo ritenere acqua ad animali normali. Gli animali in carenza sarebbero allora più soggetti alle alterazioni del metabolismo idrico. L'acido pantotenico eserciterebbe una influenza sulla tolleranza dell'acqua in relazione con la funzione surrenale (*).

Variazioni ematologiche in ratti in carenza di acido pantotenico sono state descritte da Piette ⁽¹⁵¹⁾. L'Autore descrive nel 70% degli animali l'insorgere di una anemia ipercromica: nel midollo notavasi iperplasia della serie rossa con grande numero di eritroblasti di aspetto normale, accanto ad altri a grande alone protoplasmatico basofilo; a carico della serie bianca inibizione della maturazione degli elementi mieloblastici.

Ricordiamo infine altre osservazioni degli stessi Jurgens e Pfaltz, i quali descrivono congestioni e infiammazioni del tratto respiratorio dovute alla somministrazione di acido pantotenico. Queste osservazioni trovano conferma nelle ricerche di West, Bent, Rivera, Tisdale ⁽¹⁵²⁾, i quali affermano che i ratti in carenza di acido pantotenico si dimostrano meno recettivi alle infezioni da pneumococco di 1° tipo in confronto di ratti ricevuti la vitamina in oggetto.

Topino. — Ai già citati Norris e Lippincott si deve la descrizione del quadro anatomopatologico della carenza di acido pantotenico nel topino: surreni normali; dermatosi ipercheratosica, atrofica, desquamativa; degenerazioni mieliniche nello sciatico e nel midollo, del quale vengono più frequentemente colpiti i fascicoli gracile e cuneato, la regione del tratto piramidale e le radici posteriori.

Cane. — Le alterazioni anatomopatologiche descritte nel cane da Shaefer, McKibbin ed Elvehjem consistono in degenerazione grassa del fegato, marezzeria del timo, tipica necrosi emorragica dei surreni e, in alcuni casi, segni di gastroenterite, talvolta con intussuscezione intestinale.

⁽¹⁴⁷⁾ Zeitsch. f. Vitaminforsch., 14, 243 (1944).

(*) Riferiamo qui, per inciso, le ricerche di Dumm e Ralli ⁽¹⁴⁸⁾, i quali hanno dimostrato l'importanza dell'acido pantotenico nella dieta di ratti surrenectomizzati, che possono sopravvivere a lungo senza ormono-terapia se trattati con acido pantotenico. Questo proteggerebbe i ratti dal disturbo del metabolismo dei carboidrati, prevenendo la caduta del tasso glicemico, e manterrebbe inalterato il bilancio idrico ⁽¹⁴⁹⁻¹⁵⁰⁾.

⁽¹⁴⁸⁾ Endocrinol., 43, 283 (1948).

⁽¹⁴⁹⁾ LIPMANN e coll., J. Biol. Chem., 167, 869 (1947).

⁽¹⁵⁰⁾ GAUNT e coll., Endocrinol., 38, 127 (1946).

⁽¹⁵¹⁾ Bull. Soc. Ch. Biol., 2, 525 (1947).

⁽¹⁵²⁾ Arch. Biochem., 3, 321 (1944).

Maiale. — Nel porco sono state descritte alterazioni a carico della mucosa rettale con atrofia delle cellule che rivestono le ghiandole, formazione di piccoli ascessi ed ulcerazioni (Wintrobe e coll.).

METABOLISMO DELL'ACIDO PANTOTENICO

Su questo argomento le cognizioni sono ancora scarse e quanto mai oscure.

Il tasso di acido pantotenico nel sangue ammonta, secondo Snell, Stanbery e Spies ⁽¹⁵³⁾, in media a γ 0,22%. Pelczar e Porter ⁽¹⁵⁴⁾ trovarono invece γ 0,059%. La differenza fra questi valori deve essere attribuita al fatto che gli uni condussero le determinazioni sul contenuto totale di acido pantotenico, gli altri sull'acido pantotenico libero. Questo fatto dimostrerebbe che normalmente una notevole quantità di acido pantotenico è contenuta nel sangue in forma combinata [Wright ⁽¹⁵⁵⁾].

Stanbery e coll. hanno trovato nell'urina valori medi intorno a mg 3,81. Un coefficiente di depurazione — «clearance renale» — dell'acido pantotenico è stato fissato da Wright e coll. ⁽¹⁵⁶⁾ per 0,2-0,5 cm³/min.

Pearson ⁽¹⁵⁷⁾ studiando il metabolismo dell'acido pantotenico nell'uomo trovò che, dopo somministrazione di alte dosi di pantotenato di calcio, il tasso di questa sostanza nel sangue aumentava rapidamente in dipendenza del valore della dose stessa e della via di somministrazione: la somministrazione parenterale produceva un aumento maggiore che non quella per via orale. L'aumento della concentrazione dell'acido pantotenico nel sangue, dietro somministrazione massiva, era maggiore nel plasma che non nelle cellule. Con la somministrazione di un grammo di pantotenato di calcio, la quantità totale di tale sostanza recuperata nelle urine dopo 26 ore era in tre soggetti eguale rispettivamente al 7,8-11,7-8,6%. Di tale quantità totale oltre il 50% veniva eliminato durante le prime due ore; quindi si aveva una rapida diminuzione del tasso di escrezione, parallela alla diminuzione della concentrazione nel sangue. Tali osservazioni sono state in seguito confermate da Schmidt ⁽¹⁵⁸⁾ in ricerche farmacologiche; soltanto una parte dell'acido pantotenico somministrato può essere ritrovata nelle urine.

Recentemente sarebbe stata dimostrata una stretta relazione fra l'acido pteroilglutammico o folico e il metabolismo dell'acido pantotenico. L'acido folico sarebbe capace di far regredire alcuni segni di ca-

⁽¹⁵³⁾ J. Biol. Chem., 135, 353 (1940).

⁽¹⁵⁴⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 47, 3, (1941).

⁽¹⁵⁵⁾ J. Biol. Chem., 147, 261 (1943).

⁽¹⁵⁶⁾ Am. J. of Phys., 145, 633 (1946).

⁽¹⁵⁷⁾ Am. J. of Phys., 135, 69 (1941).

⁽¹⁵⁸⁾ Acta Pharm. Tox., 1, 120-125 (1945).

renza di acido pantotenico, prodotti dalla somministrazione di succinin-sulfotiazolo [Lemeull, Wright, Welch ⁽¹⁵⁹⁾], sostanza che, come la sulfopiridina [Harrdl, West, Jefferson e Rivera ⁽¹⁶⁰⁾] avrebbe un'azione inibente sull'acido pantotenico (e a questa azione sarebbe legata la sua attività batteriostatica). L'acido folico interverrebbe favorendo una maggiore utilizzazione dell'acido pantotenico.

TOSSICITÀ DELL'ACIDO PANTOTENICO

Unna, che ha compiuto una serie di ricerche sulla tossicità delle vitamine del complesso B, ha ottenuto in collaborazione con Greslin ⁽¹⁶¹⁾ i seguenti risultati circa la tossicità dell'acido pantotenico, adoperando nelle sue esperienze pantotenato di calcio:

Effetti locali. — Furono studiati per instillazione nel sacco congiuntivale di conigli di cm³ 0,5 di soluzione al 10% e per iniezione sottocutanea di 1 cm³ della stessa soluzione. In nessun caso seguirono sintomi infiammatori o irritativi. L'infiltrazione dei tessuti sottocutanei era riassorbita così rapidamente come una iniezione di soluzione fisiologica.

Tossicità acuta. — Dosi letali (g per kg di peso) calcolate su gruppi di 10 animali per dose:

	Via orale	Via sottocutanea	Via intraperit.	Via endov.
Topino	10	2,7	0,92	0,91
Ratto	10 g per Kg. non danno sintomi tossici	3,4	0,82	—

La dose letale provocava prostrazione e deficit respiratorio. La morte sopravveniva entro la prima ora dall'iniezione endovenosa o intraperitoneale, entro le prime due ore dalla somministrazione orale o dall'iniezione sottocutanea. Nei cani e nelle scimmie la somministrazione di 1 g di pantotenato di calcio per kg di peso non provocò sintomi tossici. Gli animali sacrificati dopo due settimane non mostravano alterazioni anatomiche.

Tossicità cronica. — Fu ricercata nei ratti, cani e scimmie. Sia negli animali in accrescimento, sia in quelli adulti la somministrazione orale o mediante inoculazione sottocutanea di dosi da 50 mg a 1 g *pro die*, in rapporto al peso dell'animale, per un periodo di tempo di 100-120 giorni

⁽¹⁵⁹⁾ J. Nutr., 27, 55 (1944).

⁽¹⁶⁰⁾ J. Nutr., 25, 471 (1943).

⁽¹⁶¹⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 45, 311 (1940).

non produsse sintomi tossici nè anomalie di sviluppo ponderale degli animali in accrescimento, o della stabilità del peso degli animali adulti.

AZIONE BIOLOGICA DEGLI OMOLOGHI DELL'ACIDO PANTOTENICO

E' questo un campo quanto mai interessante dal quale sono state tratte una serie di osservazioni importantissime fra le quali primeggia, come abbiamo già accennato, quella che alterando in determinati modi la molecola dell'acido pantotenico si possono ottenere sostanze la cui azione inibisce quella dell'acido pantotenico stesso.

L'acido pantotenico possiede una alta specificità di azione. Essa è stata dimostrata nelle esperienze di Barnett e Robinson (¹⁶²): dei vari composti sintetizzati soltanto l'acido idrossipantotenico dimostra di avere una attività apprezzabile: esso ne differisce per la presenza di un gruppo idrossimetilico al posto di un gruppo metilico in posizione β . L'assenza di entrambi i gruppi metilici in posizione β ne sopprime l'attività; la mancanza di uno soltanto la riduce considerevolmente [Mitchell e coll. (¹⁶³)]. L'attività è analogamente soppressa quando la frazione lattonica propria dell'acido pantotenico venga coniugata invece che con la β -alanina con altri aminoacidi, quali α -alanina, acido β -amino-butyrico, acido aspartico, lisina.

Infine la perdita del *gruppo idrossilico in posizione α* non solo sopprime l'attività stimolante la crescita dei batteri, ma conduce a sostanze che ne inibiscono la crescita. Tale è il caso dell'acido desossipantotenico. Si vede così come l'alterazione della struttura chimica dell'acido pantotenico può dare come risultato sostanze ad azione batteriostatica. Il fatto non è nuovo in quanto si era già notato che la sulfanilamide corrisponde all'acido solfonico, analogo all'acido para-amino-benzoico, il quale ultimo è in grado di inibire l'azione batteriostatica della stessa sulfanilamide (¹⁶⁴⁻¹⁶⁵).

Basandosi su questa osservazione McIlwain (¹⁶⁶) riuscì a preparare l'acido piridin- β -solfonico analogo dell'acido nicotinico e antagonista di questo. Da queste esperienze è nata la teoria generale secondo la quale i batteriostatici, analoghi di alcune sostanze indispensabili per il metabolismo batterico, vengano assunti per azione di massa dalle cellule, data la somiglianza strutturale, ma non possono venire utilizzati. Infatti la *pantoiltaurina* e la *pantoiltauramide*, preparate da Snell nel 1941 (¹⁶⁷),

(¹⁶²) Biochem. J., 36, 357-364 (1942).

(¹⁶³) J. Am. Chem. Soc., 62, 1776-1791 (1940).

(¹⁶⁴) Woods, Brit. J. Exp. Pat., 21, 74 (1940).

(¹⁶⁵) SELBIE, Brit. J. Exp. Pat., 164, 2190 (1940).

(¹⁶⁶) Brit. J. Exp. Pat., 21, 136 (1940) e 22, 148 (1941).

(¹⁶⁷) J. Biol. Chem., 139, 975 (1941) e 141, 121 (1941).

derivate dalla sintesi della frazione lattonica rispettivamente con l'acido solfonico e con la solfonamide corrispondenti alla β -alanina, mostrano una chiara azione batteriostatica sui microorganismi che richiedono l'acido pantotenico per il loro accrescimento. Che tale azione sia di carattere competitivo lo dimostra il fatto della reversibilità in presenza di eccesso di acido pantotenico.

Circa la natura dell'azione dei derivati solfonici dell'acido pantotenico, McIlwain (¹⁶⁸⁻¹⁶⁹), partendo dal concetto che l'acido pantotenico, data la sua alta specificità e la quantità minima richiesta, agisca come coenzima, pensa che i suoi derivati solfonici blocchino i centri attivi cui deve avere accesso l'acido pantotenico per esplicare la sua normale attività. La pantoiltaurina si dimostra più attiva, nella sua azione inibitrice, della pantoiltauramide, forse per una minore affinità per gli enzimi che utilizzano l'acido pantotenico.

Mentre l'acido pantotenico agisce sui microorganismi che lo richiedono per la loro crescita in quantità pressochè uguali per le varie specie, la pantoiltaurina mostra un potere inibitorio spiccatamente variabile fra una specie e l'altra. McIlwain ha proposto il termine di «indice antibatterico» al rapporto minimo fra inibitore e fattore di accrescimento, la cui presenza nel mezzo di cultura sia necessaria per arrestare la crescita. Tale indice, nel caso delle nostre sostanze, ascende per alcuni microorganismi ai valori seguenti:

<i>Streptococcus haemoliticus</i>	500-
<i>Streptococcus lactis</i>	8000
<i>Propiono-bacterium pentosacetum</i>	8000
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	1000
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	500
<i>Lactobacillus arabinosus</i>	1000-2000

Anche questa differente sensibilità all'azione inibitrice dovrebbe attribuirsi a differente affinità con gli enzimi che sono interessati nel metabolismo dell'acido pantotenico.

McIlwain e Howking (¹⁷⁰) sono in seguito riusciti a riprodurre in vivo tale azione inibente. Somministrando a ratti dosi di pantoiltaurina tali da mantenere nel sangue una concentrazione corrispondente, rispetto all'acido pantotenico, all'indice antibatterico per lo streptococco emolitico, hanno potuto proteggere gli animali dalla somministrazione di 10.000 dosi letali *pro die* di streptococchi. E data la sensibilità alla pantoiltaurina di alcuni streptococchi sulfamido-resistenti e del bacillo

(¹⁶⁸) Biochem. J., 36, 417 (1942).

(¹⁶⁹) Brit. J. Exp. Pat., 23, 95 (1942).

(¹⁷⁰) The Lancet, 244, 449 (1943).

difterico, hanno prospettato la possibilità di una tale applicazione nella terapia umana.

Un altro omologo dell'acido pantotenico, il *fenilpantotenone*, segnalato da Wolley ⁽¹⁷¹⁾ sarebbe contrastato nella sua azione batteriostatica non solo dall'acido pantotenico, ma anche dall'acido glutammico, dalla prolina e dalla istidina. Esso sarebbe efficace, secondo Keston e Wortis ⁽¹⁷²⁾, nel trattamento della malaria sperimentale degli uccelli e dell'uomo.

DIFFUSIONE IN NATURA DELL'ACIDO PANTOTENICO

Il nome stesso dell'acido pantotenico, attribuitogli dai suoi scopritori (dal greco *πάς πάντος* = tutto) attesta la sua pressochè universale diffusione. Nel corso della nostra trattazione abbiamo passato in rassegna le innumerevoli fonti da cui fu possibile ottenerlo e assai difficile sarebbe riunire in unico capitolo i suoi svariati luoghi di provenienza. E' per questa ragione che abbiamo preferito trattare per ultimo della sua diffusione in natura. Ci limiteremo peraltro ai dati più importanti. L'acido pantotenico è stato ritrovato in estratti provenienti da crusca di riso, fegato di bue, uova di granchi e ricci di mare, ostriche, alghe, culture di *Bacillus Subtilis* e *Aspergillus Niger*, latte, bianco d'uovo ecc. Ed inoltre negli estratti di tessuti di tutti i raggruppamenti biologici: cordati, artropodi, echinodermi, molluschi, anulati, platelminti, mixomiceti, batteri, funghi, alghe, spermatofiti. Negli animali superiori fu poi messo in evidenza in tutti i tessuti del cane, del ratto, del pollo, del bue, dell'agnello, del maiale. Gli organi più ricchi di acido pantotenico sarebbero il fegato e il rene, seguiti da cuore, milza, cervello, pancreas, lingua, polmone; di meno ne conterrebbe il tessuto muscolare; ma questi dati non sono concordamente ammessi. Nel campo vegetale ricordiamo il suo ritrovamento nei pomodori e nelle patate; le piante verdi in genere lo contengono nei loro organi di riserva.

Riportiamo da R. Abderhalden ⁽¹⁷³⁾ la seguente tabella:

100 grammi di alimento contengono	Acido pantotenico in mg	100 grammi di alimento contengono	Acido pantotenico in mg
Fegato di bue	4,0	Cavolo bianco, cavolfiore .	1,1
Carne di bue	2,0	Cavolo rapa	0,1
Cuore di bue	6,0	Fagioli bianchi	0,2
Carne di vitello o di maiale	1	Patate	0 05
Tuorlo d'uovo	5-10	Pomidori	0,2
Albumi	0	Mele	0,65
Grano integrale	1,1	Aranci	0,05
Segale integrale	1	Lievito	18

⁽¹⁷¹⁾ J. Biol. Chem., 163, 181 (1946).

⁽¹⁷²⁾ Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 61, 439 (1946).

⁽¹⁷³⁾ Vitamine, Hormone, Fermente, Ed. Schwabe, Basel (1946).

DOSAGGIO MICROBIOLOGICO DELL'ACIDO PANTOTENICO

L'applicazione dei metodi microbiologici per il dosaggio delle vitamine è relativamente recente. Fu solo in questi ultimi anni che i microbiologi studiando i terreni nutritivi per i microorganismi fissarono il concetto di sostanze necessarie per la crescita, in analogia quindi con i fattori vitaminici essenziali per gli organismi superiori. Si vide così che alcuni di questi fattori erano contemporaneamente indispensabili per gli organismi inferiori.

Il dosaggio microbiologico delle vitamine, impiegato soprattutto per i componenti del complesso B, si basa sul concetto generale che i fattori di crescita, metaboliti essenziali, vengono richiesti dalle cellule che non sono capaci di effettuarne la sintesi o da cellule che in seguito ad una evoluzione fisiologica regressiva (anche provocata ad es. da raggi X o ultravioletti) abbiano perduto la facoltà di sintetizzarli. In un mezzo di cultura in cui manca un solo fattore di crescita il microorganismo non è capace di moltiplicarsi; l'aggiunta del fattore richiesto basta per assicurare la ripresa della moltiplicazione.

Innumerevoli sono le difficoltà che si incontrano nella esecuzione di un dosaggio microbiologico, ma incontestabili appaiono i vantaggi di esso nei riguardi della non sempre possibile applicazione di metodi chimici e biologici sugli organismi superiori, della lunghezza e del costo di questi ultimi. Indice di tali difficoltà sono i numerosi metodi proposti per ciascuna vitamina, la cui pluralità può d'altra parte costituire un vantaggio perchè permette di confrontare fra loro i diversi risultati ottenuti.

Ci limitiamo alla semplice enumerazione dei punti essenziali da tenere presenti per una buona esecuzione di un dosaggio microbiologico, esulando una trattazione diffusa dal nostro compito e rimandando per essa a testi speciali (¹⁷⁴⁻¹⁷⁵). Essi sono: la scelta del microorganismo in relazione al suo fabbisogno nutritizio e vitaminico; il mantenimento delle culture di collezione; la preparazione del terreno basale carente della sola vitamina che si vuol studiare; l'estrazione della vitamina dal campione o dall'estratto in cui si trova; l'inseminamento con il microorganismo test; l'incubazione; la determinazione della risposta alla vitamina, eseguita valutando la crescita della cultura direttamente (opacimetria) o attraverso lo studio delle attività biochimiche del germe (produzione di acido lattico, di CO₂, fermentazioni alcoolica ecc.); il perfetto funzionamento del test di controllo; il calcolo dei risultati.

(¹⁷⁴) WELSCH, Le dosage microbiologique des vitamines, Masson Desoer, Paris, Liège (1947).

(¹⁷⁵) SNELL, *Physiol. Reviews*, 28, 255 (1948).

Nel caso particolare dell'acido pantotenico abbiamo visto come non sia possibile effettuarne il dosaggio per via chimica. Il dosaggio biologico sugli animali superiori è stato proposto da alcuni Autori. Gli studi già citati di Jukes sul fattore del filtrato hanno portato alla proposta di un metodo di dosaggio basato sulla sua capacità di prevenire la dermatite del pulcino: una unità sarebbe stata fissata nel decimo del fabbisogno giornaliero ottimale. Le cifre ottenute sembrano essere molto elevate e ciò verrebbe attribuito o alle difficoltà di estrazione dell'acido pantotenico dai prodotti che lo contengono ⁽¹⁷⁶⁾, o più facilmente alla presenza nei substrati analizzati di fattori diversi influenzanti la crescita dell'animale in esperimento ⁽¹⁷⁷⁾. Lo stesso potrà dirsi per i metodi basati sull'accrescimento del ratto, di cui ricordiamo le già diffusamente citate ricerche di Schwartz e quelle di Bacon e Jenkins ⁽¹⁷⁸⁾.

Un ulteriore approfondimento di questi studi e un perfezionamento delle tecniche in uso potrà rendere tali metodi di pratica attuazione.

Restano intanto in discussione, e del resto sono gli unici utilizzati nella pratica, i metodi microbiologici.

Nel caso dell'acido pantotenico abbiamo visto come microbiologi e biologi abbiano contribuito in campi differenti alla definizione e alla perfetta conoscenza di questo importante fattore. Nei riguardi della sua azione sugli organismi inferiori l'acido pantotenico si dimostrò a volte un vero e proprio fattore di accrescimento, come nel caso dei *Lactobacilli*, *Protei* ed altri batteri, a volte, come nel caso dei lieviti, un semplice fattore stimolante la crescita, in qualche rarissimo caso un semplice fattore di isolamento (*Staph. aureus*): e abbiamo già notato il valore di queste definizioni.

E' appunto sfruttando queste sue diverse capacità che sono stati scelti i microorganismi su cui praticare i dosaggi. Alcuni Autori hanno scelto lo *Streptococcus lactis*, altri il *Leuconostoc mesenteroides*, altri ancora lo *Streptobacterium plantarum*; ma i metodi entrati nella pratica si riferiscono all'accrescimento del *Lactobacillus casei* e del *Proteus Morganii*. Ci limitiamo qui alla citazione dei metodi proposti e al loro concetto teorico, rimandato ai lavori originali per i vari accorgimenti tecnici e per la preparazione dei terreni speciali.

Metodo di Pennington, Snell e Williams ⁽³⁹⁾: si basa sullo studio dell'accrescimento, in presenza di acido pantotenico, del *Lactobacillus casei* Σ (ATCC n. 7469). La risposta del germe viene determinata sia opacimetricamente, sia dal rilievo della sua attività biochimica consi-

⁽¹⁷⁶⁾ GYORGY, Ann. Rev. of Biochem., 11, 329 (1942).

⁽¹⁷⁷⁾ WILLIAMS, Adv. Enzymol., 3, 253 (1943).

⁽¹⁷⁸⁾ Biochem. J., 37, 492 (1943).

stente nello sviluppo di acido lattico, dopo 24-72 ore di incubazione. Nel mezzo basale di cultura sono presenti tutti i fattori nutritizi e tutti i fattori vitaminici noti, ad eccezione del solo acido pantotenico. Accanto ad una serie di tubi cui sono state aggiunte per controllo quantità note diverse, della vitamina in oggetto, si istituiscono altre serie di tubi con concentrazioni diverse del campione da dosare. La valutazione dei risultati verrà fatta in confronto con la serie di controllo. Per i campioni molto poveri in acido pantotenico è stato anche descritto un micrometodo.

Metodo di Strong, Feehey e Earle ⁽¹⁷⁹⁾: differisce dal precedente soltanto per la differente composizione del terreno basale di cultura.

Metodo di Pelczar e Porter ⁽⁴¹⁻⁴³⁾: si basa sullo studio, per opacimetria, dell'accrescimento del *Proteus Morganii*, proporzionale alla quantità di acido pantotenico aggiunta al mezzo culturale.

Metodo di Landy e Dicken ⁽¹⁸⁰⁾: questo metodo per il quale il ceppo adoperato è lo stesso *Lactobacillus casei*, è stato proposto per il dosaggio della riboflavina, basandosi sul concetto che la crescita del microorganismo è proporzionale alla concentrazione di una qualsiasi delle sei seguenti vitamine, restando fisse cinque di esse: riboflavina, acido nicotico, acido pantotenico, piridossina, biotina, acido folico. Con opportune sostituzioni potrà allora servire anche per l'acido pantotenico.

Nella esecuzione di questi metodi microbiologici particolare cura dovrà prestarsi alla preparazione del materiale da esaminare. Non in tutti i substrati l'acido pantotenico si trova libero e facilmente utilizzabile; bisognerà allora ricorrere alla omogeneizzazione dei campioni o all'uso di enzimi diversi che rendano libero l'acido pantotenico senza però agire sul suo legame amidico. Tali operazioni non sono necessarie per i liquidi organici che basterà diluire senza preliminarne estrazione. Il rigoroso uso di test di controllo eviterà, soprattutto per il *Lact. casei*, la interferenza di altri fattori che possano agire sulla crescita, per quanto tale microorganismo, come anche il *Proteus*, non risenta alcun influsso da parte dei costituenti la molecola dell'acido pantotenico. Se si confrontano i due principali metodi proposti, quello di Snell e coll. e quello di Pelczar, si vede che quest'ultimo dà in genere valori inferiori; nei dosaggi eseguiti sulle urine è stata però constatata una perfetta concordanza di risultati.

Chiudiamo questa breve rassegna sui metodi microbiologici ricordando che la β -alanina possiede una attività specifica di fattore di accrescimento per alcuni lieviti ad es. il *Saccaromices cerevisiae*. Sono stati proposti alcuni metodi di dosaggio di essa ed inoltre un metodo di do-

⁽¹⁷⁹⁾ Ind. Engl. Chem. An. Ed., 13, 566 (1941).

⁽¹⁸⁰⁾ J. Lab. Clin. Med., 27, 1086 (1942).

saggio simultaneo dell'acido pantotenico e della β -alanina [metodo di Nielsen e coll. ⁽¹⁸¹⁾]: prima si misura l'effetto di entrambi i fattori sui lieviti; quindi quello del solo acido pantotenico sullo *Streptobacterium plantarum* che è insensibile alla β -alanina; per differenza si otterrà il valore della β -alanina. Queste osservazioni sulla β -alanina rivestono una particolare importanza in quanto hanno aperto la strada ad una nuova applicazione della biochimica microbica: il dosaggio cioè degli aminoacidi, alcuni dei quali sono specificamente indispensabili per alcuni germi. Sono stati così proposti dei metodi per il dosaggio della leucina, isoleucina, lisina, metionina, valina, acido aspartico, acido glutammico ecc. Ci limitiamo alla semplice citazione esulando la questione dal nostro argomento.

PARTE SECONDA

Con le presenti ricerche sperimentali ci siamo proposti di esaminare il comportamento dei ratti albini del nostro allevamento di fronte alla carenza di acido pantotenico, al fine di fissare le promesse indispensabili per la eventuale elaborazione di un metodo di controllo di facile e corrente attuazione e di acquisire la necessaria esperienza che ci consentisse di indagare sulle funzioni in vivo dell'acido pantotenico: campo di ricerca che ci sembra quanto mai interessante. Naturalmente in questa prima serie di ricerche, per raggiungere lo scopo prefissoci, ci siamo messi nella scia dei precedenti autorevoli ricercatori.

Per comodità di esposizione riferiamo i risultati ottenuti distinguendoli in due serie, la prima riguardante lo studio della carenza, la seconda l'azione protettiva dell'acido pantotenico somministrato preventivamente.

I. SERIE. - STUDIO DELLA CARENZA DI ACIDO PANTOTENICO

La dieta da noi adoperata per ottenere la carenza di acido pantotenico è quella adoperata da Schwartz ed è simile a quella precedentemente adottata da Oleson, Elvehjem e Woolley. Essa consiste in

Zucchero di canna	73 parti
Caseina purificata	18 »
Olio di fegato di merluzzo	2 »
Burro	0,6 »
Miscela salina	4 »
Agar-Agar	2 »

con l'aggiunta giornaliera di

⁽¹⁸¹⁾ Naturwiss., 31, 550 (1943).

Aneurina	20	γ
Lattoflavina	12,5	»
Cloridrato di adermina	10	»
Cloruro di colina	1	mg
Amide acido nicotinico	1	»

Le vitamine venivano sciolte in acqua in modo che le dosi predette fossero contenute in cm³ 0,1 e somministrate giornalmente con pipetta. La purificazione della caseina era ottenuta col metodo di Hammarsten precipitazione ripetuta con acido acetico da soluzione alcalina diluitissima) (182).

Giovani ratti provenienti da diverse covate e d'ambo i sessi, a peso iniziale che appresso specificheremo, venivano sottoposti al citato trattamento. Il peso veniva rilevato in partenza e successivamente due volte alla settimana per tutta la durata della permanenza in vita degli animali. Nello stesso tempo veniva fatta attenzione al presentarsi di eventuali alterazioni della cute e alle condizioni generali dei piccoli ratti. In generale gli animali, dopo un giorno o due di scarsa assunzione di cibo, si abituavano facilmente alla nuova dieta che veniva in seguito ingerita avidamente e somministrata *ad libitum*.

Una questione che ci si presentò subito, all'inizio delle nostre esperienze, fu quella di una preparazione o meno degli animali al trattamento con dieta carenzata. In generale gli Autori che si sono occupati dell'argomento non parlano di una eventuale preparazione, ma Schwartz, preoccupato che gli animali posti in carenza potessero avere delle riserve di acido pantotenico tali da influenzare il decorso della successiva carenza, ha pensato di sottoporre i ratti ad una particolare preparazione consistente nell'alimentare le madri, fin dal periodo della gestazione, con una dieta formata da riso al latte e un po' di pane bianco e quindi di somministrare tale dieta ai piccoli nati dopo lo svezzamento fino al momento in cui dovevano essere posti in esperimento.

Noi abbiamo voluto provare a mettere in carenza gli animali sia preparati con la dieta di Schwartz, sia provenienti dall'alimentazione normale e pertanto abbiamo diviso in due settori gli animali diversamente trattati.

Primo settore. — Gli esperimenti sono stati condotti su due gruppi di animali. Alimentata la madre gestante con riso al latte e pane bianco, abbiamo somministrato tale dieta ai piccoli nati fino al raggiungimento in un primo gruppo di g 55-63 e in un secondo gruppo di g 38-46 (peso leggermente superiore a quello raggiunto da Schwartz). Quindi si iniziava la somministrazione della dieta carenzata (vedi grafico n. 1).

(182) Nova acta Reg. Soc. Scient. Upsala, vol. extra ord. editum, Upsala (1877).

Controlli dell'uno e dell'altro gruppo venivano alimentati per tutta la durata dell'esperimento con la dieta preparatoria. Essi, indifferentemente, mostravano un costante aumento di peso che nel giro di 5 settimane supe-

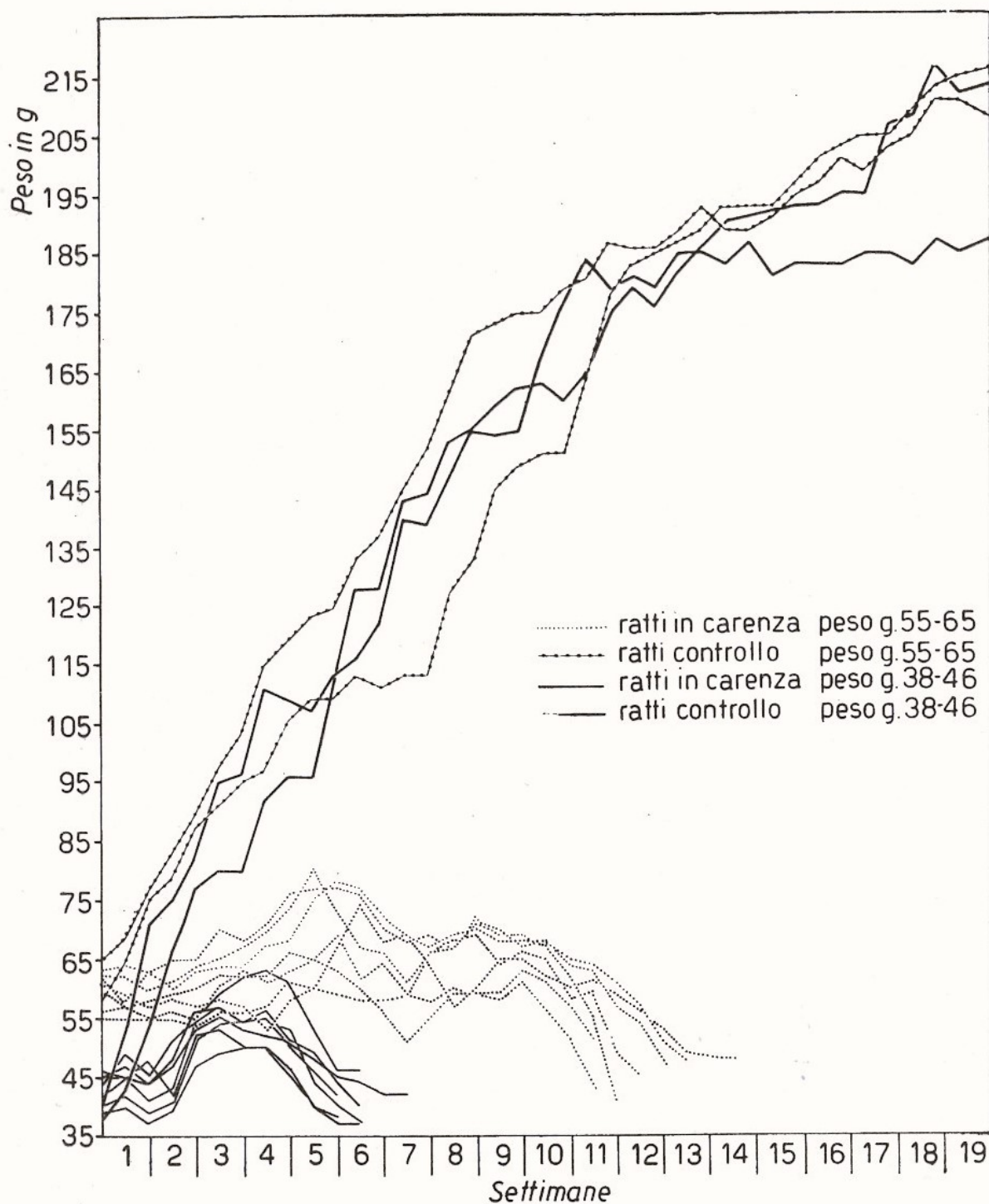


GRAFICO N. 1.

Carenza di acido pantotenico in ratti già preparati con riso, latte e pane bianco

rava i 100 grammi, in decima settimana i 180 e permanevano a lungo in vita, qualcuno oltre i 200 grammi.

Prendiamo prima in considerazione il primo gruppo di animali a peso di partenza sui 55-65 grammi. All'inizio si ha una caduta del peso che raggiunge il massimo nella seconda o terza settimana (da 1 a 8 grammi) e

che forse è dovuta al mutato tipo di alimentazione. Quindi comincia una ripresa del peso che raggiunge il massimo alla quinta o sesta settimana toccando un peso di 10-15 grammi più alto di quello iniziale. A questo punto si ha una diminuzione del peso che porta in settima settimana, con più o meno ampie oscillazioni, ai valori di partenza. Quindi un nuovo periodo di crescita fino alla nona settimana nel quale però non si raggiungono i massimi della precedente elevazione. Dalla decima settimana in poi inizia la caduta finale del peso che precipita rapidamente nella undecima o dodicesima settimana. La morte degli animali si ha a partire dalla undicesima settimana e non oltre la quattordicesima.

Il secondo gruppo è formato da animali il cui peso di partenza era di 38-46 grammi. La curva del peso mostra spiccate differenze da quella del gruppo precedente: iniziale abbassamento del peso (seconda settimana), ripresa ed elevazione del peso con massimi alla terza o quarta settimana (dai 10 ai 20 g in più del peso iniziale); all'inizio della quinta settimana comincia una rapida discesa non oscillante e la morte degli animali avviene alla sesta o alla settima settimana.

Confrontando le curve del primo e del secondo gruppo appare evidente un accorciamento del tempo di mantenimento in vita degli animali posti in carenza a peso inferiore. Mentre nel primo gruppo si riproduceva grossolanamente la curva riprodotta da Schwartz nel suo lavoro, nel secondo gruppo si ha un accorciamento del tempo di sopravvivenza; la curva appare come dimezzata e viene a mancare la seconda ripresa del peso. Sembra dunque che l'accorciamento del tempo di sopravvivenza debba essere messo in relazione col minor peso di partenza: questi animali, più giovani dei precedenti, mostrano una minore resistenza alla carenza di acido pantotenico: in accordo cioè con la maggiore esigenza di questa vitamina nel primo periodo di crescita, quando ancora, non intervengono altri fattori.

Questi risultati differiscono da quelli ottenuti da Schwartz il quale è riuscito a mantenere in vita fino a 12-13 settimane animali del peso di partenza di 28-32 grammi, inferiore a quello dei nostri, riproducendo una curva molto simile a quella da noi ottenuta con animali a peso di partenza notevolmente superiore (55-63 g). Non abbiamo elementi per poter spiegare tale differenza; forse potrà avere importanza il diverso ceppo di origine dei ratti adoperati.

Nell'esposizione dei risultati ottenuti abbiamo fermato la nostra attenzione sul decorso delle curve del peso e sulla sopravvivenza degli animali. Ma contemporaneamente abbiamo potuto osservare delle modificazioni a carico dei tegumenti, che in ambedue i gruppi, si manifestano ad alcuni giorni dall'inizio del trattamento con dieta carenzata. Essi consistono in: pelo arruffato, sporco, chiazze di eritema cutaneo con dirada-

mento del pelo; arrossamento del naso con segni di una rinite con apprezzabile secrezione (vedi fig. 1).

Su tali sintomi cutanei e sull'arresto dell'accrescimento non ci è stato possibile intervenire beneficamente con alte dosi giornaliere di acido pantotenico, la cui somministrazione, peraltro limitata a pochi casi, si sarebbe dimostrata inefficace su animali nei quali si era già stabilito lo stato carenziale.

Secondo settore. — Anche qui gli esperimenti sono stati condotti su due gruppi di animali. I ratti prima di essere posti a dieta carenzata



FIG. 1.

Ratto dopo 25 giorni di carenza di acido pantotenico

erano stati alimentati, e così le loro madri gestanti, con il vitto normale del nostro laboratorio, costituito alternativamente o da pane e verdura o da una pappa formata da pane, brodo di cotiche o di carne, protalbina o polvere di sangue, acqua: il tutto *ad libitum*. Il primo gruppo è costituito da ratti posti in carenza al peso di g 20-43; il secondo da ratti posti in carenza al peso di 52-96 grammi (vedi grafico n. 2).

Le curve del peso riscontrate nel primo gruppo mostrano una lieve ascesa iniziale che ha il suo massimo alla terza settimana, quindi una discesa più o meno oscillante con *exitus* alla quarta o quinta settimana ed eccezionalmente alla sesta o nona. Come si vede il mantenimento in vita di questi animali è molto più breve di quello degli animali preparati con riso, latte e pane bianco.

Tale differenza si rende ancora più manifesta nel gruppo di ratti di peso superiore (52-96 g), i quali, messi a dieta carenzata, sopravvivono non più di quattro, cinque settimane, e la loro curva anziché mostrare degli innalzamenti è costituita da una linea, tranne qualche piccolo innalzamento, assolutamente discendente.

Dello stesso settore fanno parte due gruppi di controllo dei due tipi di peso di partenza: un gruppo alimentato con riso, latte e pane bianco

che si comporta come i controlli del precedente settore ed un gruppo alimentato con vitto normale del laboratorio. Quest'ultimo mostra una curva

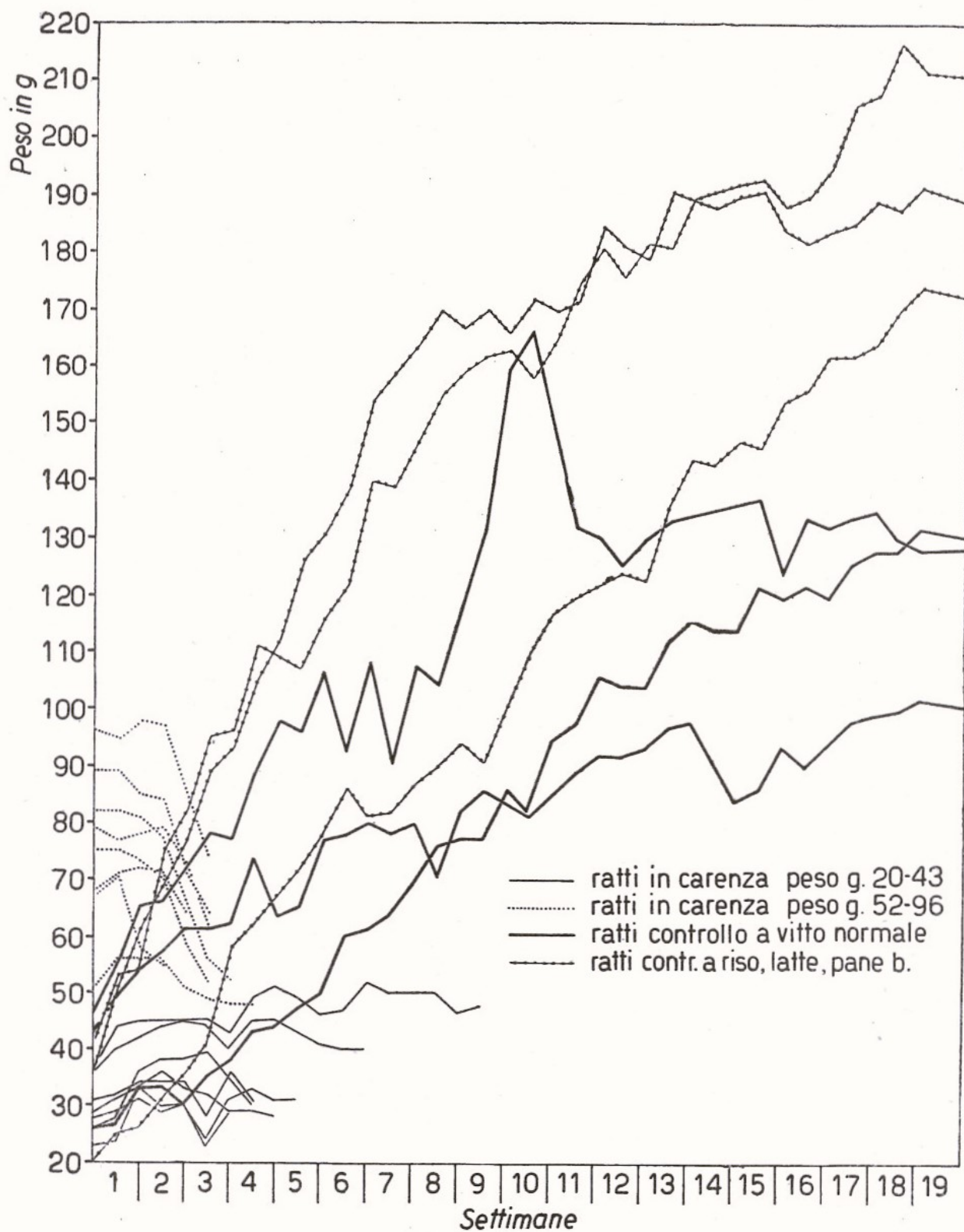


GRAFICO N. 2.

Carenza di acido pantotenico in ratti provenienti dall'alimentazione normale

ascendente che raggiunge in un caso i 170 grammi, negli altri circa i 120. Gli animali si mantengono in vita oltre 20 settimane.

Dall'osservazione dei fatti riscontrati ci sembra dover concludere che la preparazione degli animali con riso, latte e pane bianco, tendente

ad escludere la possibilità di riserve di acido pantotenico, non abbia importanza sul decorso della successiva carenza; anzi, come dimostrano i controlli, tale dieta si rivela alimentariamente più efficiente permettendo agli animali di raggiungere pesi più alti di quelli riscontrati negli animali mantenuti al vitto normale del nostro laboratorio.

A dieta carenzata gli animali pretrattati mostrano una maggiore resistenza a tale alimentazione, resistenza proporzionale al periodo di pretrattamento: cioè quelli a peso maggiore di partenza (e quindi più a lungo trattati con riso, latte e pane bianco) raggiungono la dodicesima o tredicesima settimana; quelli a minor peso di partenza (meno a lungo trattati con riso, latte e pane bianco) la sesta o settima settimana.

Invece gli animali non trattati preventivamente con una particolare preparazione, posti a dieta carenzata, non sopravvivono più di 5-6-9 settimane e tale sopravvivenza non è nemmeno legata al peso di partenza ma piuttosto, nelle curve del peso, inversamente proporzionale. Dove in sostanza non sembra esistano notevoli differenze di comportamento nella carenza fra i due settori è nei gruppi di peso più basso in cui appare più manifesto il deficit di acido pantotenico.

Per quanto riguarda i sintomi cutanei gli animali di questo settore presentano gli stessi fenomeni osservati in quelli del settore precedente: pelo arruffato, sporco, chiazze di eritema cutaneo con diradamento del pelo, arrossamento del naso con segni di una rinite con apprezzabile secrezione.

In definitiva, mentre nei riguardi dell'accrescimento, adoperando una diversa dieta di preparazione, abbiamo notato un diverso comportamento, tale differenza non si è rilevata nei riguardi della sintomatologia cutanea, presentando gli animali dei due settori alterazioni del trofismo cutaneo identiche per qualità, intensità e momento di comparsa. Saremmo di fronte ad una dissociazione nel comportamento dei due fenomeni, quello dell'accrescimento o quello del trofismo cutaneo.

Schwartz per evitare che si costituissero negli animali riserve di acido pantotenico tali da ostacolare il decorso della successiva carenza, ha voluto adottare come dieta di preparazione quella del riso, latte e pane bianco, meno completa, dal punto di vista vitaminico, per lo meno per quanto riguarda l'acido pantotenico, del vitto normale di laboratorio, giornalmente variato, da noi adoperato (vedi tabella nella Parte I al capitolo: Diffusione in natura).

Noi abbiamo anche voluto seguire questo criterio in una parte delle nostre ricerche. Nel corso della preparazione abbiamo incontrato qualche difficoltà: le madri gestanti, già trattate con tale dieta, pur avendo a disposizione il cibo *ad libitum*, uccidevano con grande frequenza i piccoli

nati, ostacolandoci più volte nel rifornimento degli animali; fatto solo eccezionalmente osservato nelle madri alimentate normalmente.

La somministrazione però di tale dieta nel nostro caso, anzichè favorire, ha ostacolato l'impiantarsi della carenza, che siamo riusciti ad ottenere molto più rapidamente nei ratti provenienti dalla alimentazione normale. Quasi che il minor contenuto della dieta di riso, latte e pane bianco in acido pantotenico fosse compensato dalla maggiore possibilità di utilizzazione e risparmio della vitamina, possibilità dovuta alla stessa composizione della dieta e in particolare al suo maggior contenuto in costituenti plastici ed energetici.

Ma perchè questa maggiore resistenza alla carenza si esplica soltanto nell'accrescimento e non nel trofismo cutaneo dissociando i due fenomeni? Richiamiamo una considerazione dello stesso Schwartz, secondo il quale gli eventuali quantitativi di acido pantotenico presenti nell'organismo all'inizio dell'esperimento vengono utilizzati più per la crescita dell'animale che per l'elaborazione della melanina: essendo l'acido pantotenico necessario per ambedue le funzioni, esse entrerebbero quasi in concorrenza, con prevalenza della funzione biologicamente più importante quale è quella dell'accrescimento. Questa osservazione fatta da Schwartz a proposito della acromotrichia dei ratti grigi, potrebbe applicarsi al nostro caso. Quei minimi quantitativi di acido pantotenico presenti nella dieta di riso, latte e pane bianco, in animali più forti per il maggior valore nutritivo della dieta, sono valsi a differire il manifestarsi del deficit di accrescimento lasciando libero di manifestarsi il disturbo del trofismo cutaneo. E ciò starebbe anche per una maggiore specificità dell'acido pantotenico come fattore di accrescimento, concetto del resto espresso da altri Autori.

Un tale comportamento non si è invece riscontrato negli animali provenienti dall'alimentazione normale, nei quali il deficit di acido pantotenico, indipendentemente dalle eventuali riserve, si è subito chiaramente manifestato sia sull'accrescimento che sul trofismo cutaneo, non avendo gli animali così trattati acquisito una particolare resistenza, perchè non sottoposti preventivamente ad una alimentazione ricca in elementi energetici e plastici. Questa minore resistenza alla dieta carenzata trova conferma, come vedremo, nel fatto che nei nostri ratti della seconda serie è stato necessario somministrare una maggiore quantità di acido pantotenico per ottenere una azione protettiva.

Per le ragioni suesposte, nelle successive esperienze abbiamo preferito adoperare ratti provenienti dalla normale alimentazione del nostro laboratorio.

II SERIE. - STUDIO DELL'AZIONE PROTETTIVA DELL'ACIDO PANTOTENICO
SOMMINISTRATO PREVENTIVAMENTE

Per questa serie di esperimenti furono impiegati ratti provenienti dall'alimentazione normale del nostro laboratorio, del peso di partenza oscil-

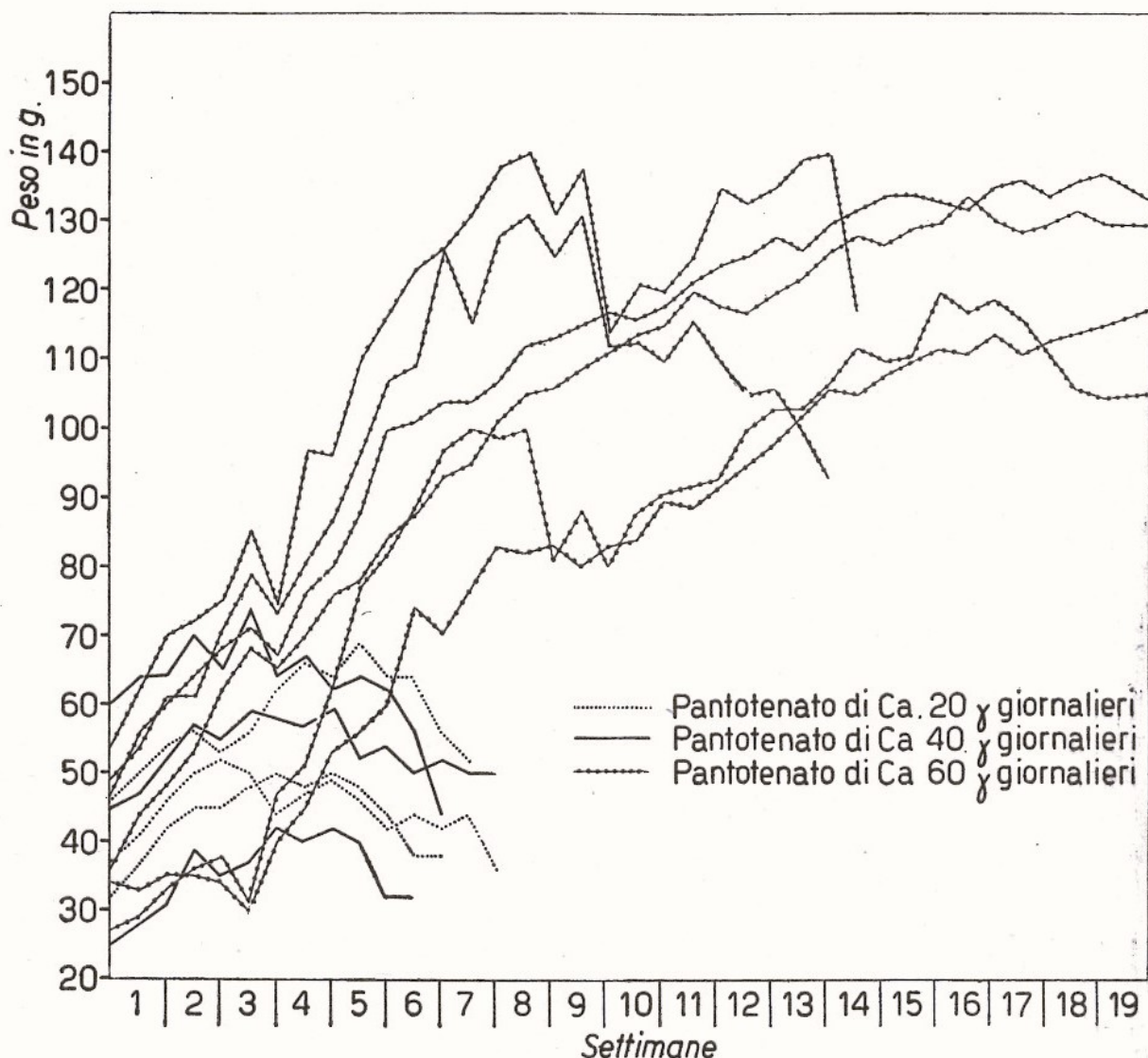


GRAFICO N. 3.

Azione protettiva dell'acido pantotenico sull'accrescimento di ratti in carenza

lante fra 24 e 75 grammi. Gli animali posti a dieta carenzata vennero suddivisi in 3 gruppi ai quali veniva somministrata per via sottocutanea rispettivamente la quantità giornaliera di 20-40-60 γ di un sale dell'acido pantotenico: il pantotenato di calcio [vedi grafico N° 3 (*)].

Primo gruppo: 11 ratti del peso di g 32-46.

La somministrazione giornaliera di 20 γ di pantotenato di calcio non sembra mostrare una influenza apprezzabile sul decorso della carenza

(*) I singoli tracciati dei grafici riportati riproducono, per ragioni di maggior chiarezza, la media dei tracciati di due o tre animali di quasi identico comportamento.

riscontrato negli animali di controllo. Le curve ottenute sono infatti di poco dissimili da quelle della carenza pura. Si nota soltanto un prolungamento di una o due settimane del tempo di sopravvivenza ed un lievissimo maggior aumento di peso; non tali però da poter fornire una chiara dimostrazione dell'effetto della vitamina somministrata. I sintomi cutanei sono presenti e riproducono quelli descritti nei controlli in carenza.

Secondo gruppo: 9 ratti del peso di g 25-60.

Anche la somministrazione giornaliera di 40 γ di pantotenato di calcio non sembra mostrare alcuna influenza apprezzabile sul decorso della carenza: questo gruppo riproduce perfettamente il gruppo precedente.



FIG. 2.

Ratto dopo 25 giorni di carenza + 60 γ pro die di pantotenato di calcio

Terzo gruppo: 17 ratti del peso di g 27-54.

La somministrazione giornaliera di 60 γ di pantotenato di calcio si dimostra capace di ostacolare il decorso della carenza. Il peso sale più o meno regolarmente sino alla ottava settimana in cui in qualche caso si raggiungono i 100-140 grammi con aumento massimo rispetto al peso iniziale di 86 grammi; quindi si nota generalmente una flessione del peso che dura fino alla decima settimana raggiungendo i minimi di 80-110 grammi. Segue con ampie oscillazioni una ripresa del peso sino a raggiungere su per giù i massimi precedenti. Un terzo degli animali (circa il 34%) decede alla tredicesima o quattordicesima settimana, mentre due terzi (circa il 66%) raggiungono oscillando lievemente la diciannovesima settimana in cui o decedono o vengono sacrificati al peso di circa 100-130 grammi.

Confrontando la curva suaccennata con quella degli animali di controllo a vitto normale e con quella degli animali posti in carenza si vede come la somministrazione di 60 γ giornalieri di pantotenato di calcio sia capace di esercitare una azione protettiva sui ratti carenzati. Non si rag-

giungono i pesi e il periodo di sopravvivenza degli animali di controllo a vitto normale, ma in confronto agli animali posti in carenza si ha una maggiore durata del periodo di sopravvivenza e un più alto e costante aumento di peso. Il 66% degli animali raggiunge e supera la diciannove-



FIG. 3.

Ratto dopo 42 giorni di carenza + 60 γ pro die di pantotenato di calcio
(lo stesso animale della figura 2)

sima settimana di vita con massimi di peso sui 100-140 grammi (nelle carenze la massima sopravvivenza è di nove settimane con un massimo di peso di g 98). Solo un terzo degli animali (il 34% circa) decede alla tredicesima o quattordicesima settimana. Gli animali di questo gruppo non



FIG. 4.

Ratto ad alimentazione normale

mostrano alterazioni del pelo. Soltanto qualcuno (fig. 2) mostrò leggermente accennati i sintomi cutanei osservati negli animali in carenza assoluta; ma il persistere nel trattamento con il pantotenato fece completamente regredire la sintomatologia cutanea in pochi giorni; sicchè gli stessi animali, come è facile vedere nelle fig. 3 e 4, appaiono del tutto simili agli animali di controllo a vitto normale.

Volendo trarre delle conclusioni dai dati suesposti sarà bene riepilogarli gruppo per gruppo confrontandoli con quelli ottenuti nei controlli sia tenuti a vitto normale che tenuti a dieta carenzata. Nella unita tabella sono riportati i dati principali ottenuti nel complesso delle esperienze.

	Animali di controllo	Animali di carenza	Animali in carenza con aggiunta di acido pantotenico		
	vitto normale	dieta carenzata	dieta carenzata		
Dieta					
Numero animali per gruppo	12	16	11	9	17
Acido pantotenico somministrato (pant. Ca)	—	—	20	40	60
Percentuale		84 ⁰ / ₀ 16 ⁰ / ₀			66 ⁰ / ₀ 34 ⁰ / ₀
Sopravvivenza in settimane	19 e oltre	3-5 7-9	6-7	6-7	19 e 14 oltre
Peso massimo raggiunto g	169 e oltre	98	69	74	140
Aumento massimo di peso rispetto all'iniziale g	118	15	23	18	86
Sintomi cutanei	no	si	si	si	no

Gli animali posti a dieta carenzata hanno un massimo di sopravvivenza di 3-5-7 settimane, ed eccezionalmente di 7-9. Essi presentano chiari sintomi cutanei; l'aumento massimo di peso non raggiunge i 15 grammi.

La somministrazione profilattica a ratti in carenza di 20 e 40 γ di pantotenato di calcio non ci sembra abbia influenzato sensibilmente il decorso della carenza e gli animali presentano delle curve e dei sintomi cutanei di poco dissimili da quelli in carenza assoluta. Tutt'al più abbiamo notato un lieve prolungamento del tempo di sopravvivenza con un tentativo di maggior aumento di peso (grammi 18-23); ma non tali però da poter fornire la prova di una azione protettiva, esplicita in tali dosi, dall'acido pantotenico.

Con la somministrazione giornaliera preventiva di 60 γ di pantotenato di calcio siamo riusciti nel 66% dei casi a prolungare la vita degli animali sino ad oltre la diciannovesima settimana, con il raggiungimento di un peso massimo di g 140 (aumento di peso rispetto a quello iniziale di 86 grammi). Il 34% degli animali è invece venuto a morte entro la tredicesima o quattordicesima settimana. Il sale di acido pantotenico somministrato si dimostra capace di proteggere i ratti dai disturbi cutanei. Se in qualcuno degli animali nelle primissime settimane di carenza tali sintomi furono accennati, la somministrazione successiva fu capace di farli del tutto scomparire.

La dose di 60 γ giornalieri di pantotenato di calcio da noi riscontrata efficace corrisponde su per giù a quella considerata come ottimale da Lytgoe, Macrae, Stanley, Todd e Work (50 γ di pantotenato di calcio) ed è

leggermente inferiore a quella di Unna (80 γ di pantotenato di calcio), di Oleson (75-100 γ di pantotenato di calcio) e infine di Oleson, Woolley, Elvehjem (100 γ di acido pantotenico ottenuto da un concentrato di estratto di fegato). Un accrescimento soddisfacente dei ratti in carenza era invece ottenuto da Schwartz con 21 γ giornalieri di pantotenato di sodio. In tale sensibile differenza di comportamento un ruolo importante potrà giocare il diverso ceppo di ratto adoperato. Ma altri elementi dovranno essere presi in considerazione.

La differenza fra la dose da noi e dalla maggior parte degli Autori impiegata e quella di Schwartz potrebbe dipendere dal diverso sale di acido pantotenico adoperato. Il sale sodico dell'acido pantotenico è formato da una sola molecola di quest'ultimo, mentre, a causa della bivalenza del calcio, nel pantotenato di calcio sono contenute due molecole di acido pantotenico. Tale diversità di contenuto non incide sulla quantità di acido pantotenico da somministrare rappresentando sia il sodio che il calcio circa il 6% dell'intera molecola dei rispettivi sali. La necessità allora di maggior quantità di pantotenato di calcio richiesta per ottenere la azione favorente la crescita e il trofismo cutaneo dei ratti, potrebbe risiedere in altri fattori e probabilmente nella minore attività dei sali di calcio in generale a causa della loro minore dissociabilità.

Ma oltre a queste considerazioni riguardanti il sale adoperato, per spiegare la forte differenza fra la nostra dose efficace e quella di Schwartz dobbiamo richiamarci a quanto accennato nello studio della carenza. 21 γ di acido pantotenico al giorno saranno sufficienti ai ratti preventivamente alimentati con riso latte e pane bianco, dieta, che, come abbiamo visto, differisce il manifestarsi del deficit di accrescimento; 60 γ sono invece indispensabili ai nostri ratti provenienti dall'alimentazione normale, nei quali più rapidamente e con maggior gravità si manifesta, in assenza della vitamina, la sindrome carenziale. Questo fatto potrebbe spiegare la maggior esigenza per questi ultimi della vitamina in oggetto.

Un'ultima considerazione che potrà trarsi dall'esame dei grafici riportati riguarda i massimi di peso e il tempo di sopravvivenza raggiunti dagli animali trattati con la dose efficace di acido pantotenico, in confronto con i dati forniti dagli animali di controllo a vitto normale. La sopravvivenza degli animali trattati ha raggiunto le 20 settimane con aumento massimo di peso sino a 140 grammi, laddove i controlli sono rimasti più a lungo in vita e hanno oltrepassato i 170 grammi. Indubbiamente la dieta da noi adoperata nelle presenti esperienze, eseguite nel 1946-1947, pur con l'aggiunta dell'acido pantotenico, non era completa, mancando alcuni fattori in questi ultimi anni identificati e quindi non com-

presi fra quelli somministrati. L'aggiunta di tali fattori sarà indispensabile per completare i quadri qui descritti.

In conclusione nelle presenti ricerche sperimentali vengono descritti il decorso della crescita e le manifestazioni cutanee presentate dagli animali sottoposti a dieta priva di acido pantotenico. L'azione di questa vitamina quale fattore indispensabile per l'accrescimento e per il normale trofismo cutaneo dei ratti, viene dimostrata dalla sua efficacia protettiva sui sintomi carenziali alla dose di 60 γ giornalieri.

Roma, 15 aprile 1949.
