

17. Leonardo TENTORI e Girolamo VIVALDI. — Anemia macrocitica da carenza di acido folico nel ratto ed attività curativa di alcune sostanze ad azione antianemica (*).

Riassunto. — Ratti albini sono stati alimentati con diete sintetiche addizionate di solfonamidoguanidina o di streptomycina. Tutti gli animali alimentati con la solfonamidoguanidina e il 55% di quelli alimentati con la streptomycina presentarono i sintomi della carenza di acido folico e cioè leucopenia, anemia ipercromica macrocitica e presenza di megaloblasti nel midollo osseo.

E' stata saggiata l'attività terapeutica delle seguenti sostanze: acido folico, vitamina B₁₂ e una miscela di xantopterina e di acido p-aminobenzoilglutamico, queste due ultime sostanze nello stesso rapporto molecolare esistente nell'acido folico. Sono state eseguite prove anche con la xantopterina sola e con il cloruro di cobalto.

La maggiore attività è stata dimostrata dall'acido folico, dalla vitamina B₁₂ e dalla miscela di xantopterina e di acido p-aminobenzoilglutamico.

La xantopterina da sola ed il cloruro di cobalto hanno dimostrato invece una attività policitemica aspecifica.

Résumé. — Des rats albinos ont été alimentés par des diètes synthétiques additionnées de solfonamidoguanidine ou de streptomycine. Tous les animaux alimentés avec la sulfonamidoguanidine et 55% de ceux alimentés avec la streptomycine ont présenté les symptômes de carence d'acide folique, c'est-à-dire léucopénie, anémie hyperchromique macrocytique et présence de mégalo blastes dans la moëlle des os.

On a essayé l'activité thérapeutique des substances suivantes: acide folique, vitamine B₁₂ et un mélange de xantoptérine et d'acide p-amino-benzoilglutamique; ces deux dernières substances dans le même rapport moléculaire existant dans l'acide folique. On a exécuté aussi des essais avec la xantoptérine seule et avec le chlorure de cobalt.

L'activité plus énergique a été constatée dans l'acide folique, dans la vitamine B₁₂ et dans le mélange de xantoptérine et acide p-aminobenzoilglutamique. La xantoptérine seule et le chlorure de cobalt ont montré au contraire une activité polycytémique a-spécifique.

Summary. — Albino rats were fed with synthetic diets added with sulfaguanidine or streptomycin. All animals fed with sulfaguanidine and

(*) Comunicazione presentata al 3° Congresso Internazionale di Ematologia di Cambridge il 25 agosto 1950.

55% of those fed with streptomycin developed folic acid deficiency symptoms, i. e. leukopenia, macrocytic hyperchromic anaemia, appearance of megaloblasts in the bone marrow. The following substances were tested in order to relieve deficiency symptoms: folic acid, vitamin B₁₂, xanthopterin and p-aminobenzoylglutamic acid, the last two in the molecular ratio existing in folic acid. Xanthopterin alone and cobalt ions were also tested. Folic acid, vitamin B₁₂ and xanthopterin added to p-aminobenzoylglutamic acid were most active. Xanthopterin by itself and cobalt ions, on the contrary, show an aspecific polycythemic activity.

Zusammenfassung. — Weisse Ratten wurden mit synthetischer sulfamidoguanidin- und streptomizinhältiger Diät ernährt. Alle unter Zugabe der erstgenannten Substanz und 55% der unter Zugabe der zweiten ernährten Tiere zeigten Symptome des Mangels an Folsäure, und zwar Leukopenie, makrocythische hyperchromische Anämie und Anwesenheit von Megaloblasten im Knochenmark.

Es wurde die therapeutische Wirksamkeit der folgenden Substanzen untersucht: Folsäure, Vitamin B₁₂ und ein Gemisch von Xantopterin und p-Aminobenzoylglutaminsäure, diese beiden Substanzen im gleichen Molekularverhältnis in dem sie in der Folsäure anwesend sind. Es wurden auch Versuche mit Xantopterin allein und mit Kobaltchlorid allein ausgeführt. Am wirksamsten erwiesen sich Folsäure, Vitamin B₁₂ und das Gemisch Xantopterin-p-Aminobenzoylglutaminsäure. Xantopterin allein und Kobaltionen allein zeigten hingegen eine aspezifische polycythemische Wirkung.

E' noto che nel ratto la sola somministrazione di una dieta sintetica priva di acido folico non è in grado di provocare se non in una minima percentuale di animali, una carenza di questo fattore. Per aumentare la percentuale di animali in cui si manifesti la carenza conclamata, è necessario aggiungere alla dieta una sostanza che, inibendo la flora intestinale, impedisca la sintesi che dell'acido folico avviene ad opera di essa. Fino ad ora sono stati adoperati, a questo scopo, composti solfonamidici ad azione più o meno specifica sulla flora in questione (1-2-3-4-5-6-7). In questi ultimi anni, poi, la carenza è stata ottenuta in tempo più breve mediante somministrazione di sostanze antagoniste dell'acido folico (8-9-10-11-12-13) e con altri accorgimenti (14).

Nel presente lavoro riferiamo sulle modalità di provocazione e sul complesso quadro ematologico, caratteristico della carenza, che insorge nel ratto

alimentato con diete sintetiche prive di acido folico, nonchè sulla attività curativa che alcune sostanze ad azione antianemica esercitano in tale carenza.

TECNICA SPERIMENTALE.

Abbiamo eseguito i nostri esperimenti su 84 ratti albinì in accrescimento, del peso di circa 60 grammi, provenienti dall'allevamento del nostro Istituto.

Le diete sintetiche da noi adoperate sono le seguenti:

DIETA I		DIETA II	
Caseina (*)	18	Caseina (*)	18
Saccarosio	67	Saccarosio	67
Miscela salina (**)	4	Miscela salina (**)	4
Burro	9	Burro	9
Olio di fegato di merluzzo	2	Olio di fegato di merluzzo	2
Solfonamidoguanidina (°)	g. 2 %	Streptomicina (°°)	g. 1‰

Ad ogni Kg. delle diete suddette venivano aggiunte le seguenti sostanze ad attività vitaminica:

Tiamina	mg. 10
Riboflavina	» 20
Piridoxina	» 10
Acido nicotinico	» 100
Pantotenato di calcio	» 100
Acido para-aminobenzoico	» 100
Acido ascorbico	» 100
Colina cloridrato	» 200
Inositolo	» 200
Menadione sodio bisolfito	» 50
Alfa-tocoferolo	» 100
Linoleato di etile	g. 10

Quale inibitore della flora intestinale è stata adoperata oltre la solfonamidoguanidina, anche la streptomicina addizionata alla dieta nell'ammontare dell'1 per mille per osservare se la carenza insorgesse negli animali anche a seguito della inibizione esercitata sulla flora intestinale di essi da questa sostanza e per stabilire eventualmente la percentuale degli animali colpiti, il grado di carenza ed il tempo necessario per la provocazione di questa in comparazione con i corrispondenti dati noti per la solfonamidoguanidina.

A tale scopo abbiamo diviso i nostri animali in due gruppi, alimentando il primo gruppo con la dieta I ed il secondo gruppo con la dieta II.

I ratti così alimentati venivano pesati una volta ogni tre giorni e ad

(*) Caseina priva dei fattori idrosolubili della Ditta Piccioni-Brescia.

(**) Miscela salina secondo Osborne e Mendel.

(°) Guanicil Cilag.

(°°) Diidrostreptomicina Abbott.

essi veniva prelevato il sangue per l'esame ematologico completo ogni sette giorni. Raggiunta la carenza, per la cui valutazione usavamo dei criteri che saranno esposti in sede di discussione dei risultati, gli animali sono stati divisi in dieci gruppi dei quali cinque provenivano dal lotto alimentato con la dieta I, e cinque dal lotto alimentato con la dieta II. Su tali gruppi è stata saggiata l'attività curativa delle seguenti sostanze somministrate per via parenterale nelle dosi specificate per ciascun animale:

- 1) Acido pteroilglutamico (*) alla dose di 200 γ alla settimana.
- 2) Vitamina B₁₂ (**) alla dose di 0,5 γ ogni tre giorni.
- 3) Xantopterina (°) alla dose di mg. 1 per Kg. di peso corporeo ogni 15 giorni.
- 4) Xantopterina alla dose di mg. 1 per Kg. di peso corporeo + acido para-aminobenzoilglutamico (°°) alla dose di mg. 1,5 per Kg. di peso corporeo ogni settimana.
- 5) Cloruro di cobalto alla dose di 250 γ ogni quattro giorni.

Ciascuna di queste sostanze è stata somministrata contemporaneamente ad un gruppo di animali alimentati con la dieta I ed a un gruppo di animali alimentati con la dieta II.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

I risultati sono sintetizzati nelle tabelle I e II, e nei grafici da 1 a 10.

1) *Modalità di provocazione della carenza.* — Uno degli scopi del presente lavoro era di paragonare l'attività dei due inibitori usati, solfonamidoguanidina e streptomycin, nell'impedire la sintesi dell'acido folico da parte della flora intestinale; tanto più che l'attività della streptomycin somministrata con tale intendimento, non era stata ancora sperimentata. Sulla base dei risultati ottenuti si può affermare che è possibile ottenere una carenza di acido folico, usando come inibitore intestinale la streptomycin; che la carenza così ottenuta insorge nel 55 % degli animali trattati e che si ottiene in un periodo di tempo pressochè uguale a quello necessario perchè insorga la carenza provocata con la solfonamidoguanidina; con questa ultima sostanza, però, i sintomi della carenza insorgono quasi nel 100 per cento degli animali e si presentano con un carattere di maggiore gravità.

(*) Folato di sodio Squibb.

(**) Rubramin Squibb.

(°) Xantopterina Roche.

(°°) Acido para-aminobenzoilglutamico Lepetit.

TABELLA I (*)

Gruppi	Massima carenza				Dopo trattamento			
	G. R.	G. B.	Hb	V. G.	G. R.	G. B.	Hb	V. G.
1	3,9 ± 0,11	5,9 ± 0,33	71 ± 0,77	1,54 ± 0,04	7,9 ± 0,11	10,0 ± 0,31	86 ± 2,37	0,89 ± 0,02
2	4,0 ± 0,19	7,5 ± 0,43	81 ± 1,97	1,73 ± 0,13	8,1 ± 0,05	12,0 ± 1,35	88 ± 2,08	0,96 ± 0,0006
3	3,7 ± 0,13	6,9 ± 0,50	71 ± 2,50	1,64 ± 0,10	6,5 ± 0,15	15,3 ± 1,52	76 ± 4,83	0,99 ± 0,01
4	4,1 ± 0,10	7,4 ± 0,35	79 ± 1,34	1,60 ± 0,04	7,7 ± 0,15	10,3 ± 0,70	90 ± 1,69	1,00 ± 0,02
5	4,2 ± 0,15	8,1 ± 0,78	75 ± 3,36	1,51 ± 0,01	6,6 ± 0,22	9,7 ± 0,70	99 ± 3,32	1,31 ± 0,03
6	4,3 ± 0,25	5,0 ± 0,66	82 ± 4,95	1,60 ± 0,13	7,8 ± 0,46	11,2 ± 2,44	77 ± 4,55	0,82 ± 0,002
7	4,3 ± 0,11	7,3 ± 0,57	75 ± 2,73	1,49 ± 0,06	5,5 ± 0,21	8,6 ± 0,54	87 ± 2,25	1,33 ± 0,10

Gruppo 1: Dieta I - Terapia: acido pteroilglutamico 200 γ alla settimana.

Gruppo 2: Dieta II - Terapia: acido pteroilglutamico 200 γ alla settimana.

Gruppo 3: Dieta I - Terapia: vitamina B₁₂ 0,5 γ ogni tre giorni.

Gruppo 4: Dieta II - Terapia: vitamina B₁₂ 0,5 γ ogni tre giorni.

Gruppo 5: Dieta II - Terapia: xantopterina mg. 1 per Kg. di peso corporeo ogni 15 giorni.

Gruppo 6: Dieta II - Terapia: xantopterina mg. 1 per Kg. di peso corporeo più acido p-aminobenzoilglutamico mg. 1,5 per Kg.

di peso corporeo ogni settimana.

Gruppo 7: Dieta II - Terapia: cloruro di cobalto 250 γ ogni quattro giorni.

G. R. - globuli rossi espressi in milioni per mm³.

G. B. - globuli bianchi espressi in migliaia per mm³.

Hb - emoglobina per cento (Sahli).

V. G. - valore globulare.

(*) Non sono riportati i dati che si riferiscono a tre gruppi di animali alimentati con la dieta I e curati rispettivamente con xantopterina, xantopterina più acido p-aminobenzoilglutamico, e cloruro di cobalto perchè gli animali sono venuti a morte in grave carenza nei primi 10 giorni dall'inizio del trattamento.

2) *Studio dei sintomi carenziali.* — Dalla letteratura risulta che gli AA. che hanno studiato la carenza di acido folico nel ratto, si basano per l'accertamento e per la valutazione di essa, sui seguenti dati: peso dell'animale, numero dei globuli rossi per mm^3 di sangue, numero dei globuli bianchi per mm^3 di sangue, ematocrito; anzi nei lavori più recenti sono presi in considerazione soprattutto la diminuzione dei globuli rossi e l'aumento dell'ematocrito. Ben pochi sono i lavori in cui vengono riferiti dati riguardanti il quadro midollare (¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷). LECOCQ (¹⁸), somministrando una dieta purificata contenente 1% di istidina e 1% di solfonamidoguanidina, ha ottenuto

TABELLA II

Tipi di cellule	Ratti normali	Ratti carenti	Ratti trattati con acido folico
Mieloblasti	1,0 %	1,9 %	0,7 %
Promielociti e mielociti	6,9 %	5,4 %	5,8 %
Metamielociti e polimorfonucleati	48,0 %	32,2 %	42,2 %
Linfociti	14,6 %	16,7 %	14,5 %
Monociti	3,2 %	3,7 %	2,3 %
Normoblasti	25,8 %	31,4 %	34,5 %
Megaloblasti	—	8,7 %	—

Sommario dei dati dei mielogrammi di ratti normali e di ratti alimentati con dieta II nella fase più grave di carenza e durante il trattamento con acido folico.

in due mesi, una carenza completa nel ratto e riporta i dati del quadro ematico periferico e del mielogramma, segnalando la presenza nel midollo di cellule che egli identifica con i megaloblasti.

Come appare evidente dalla fig. 2, che è costruita con i dati della media dei pesi, si nota che tutti i gruppi di animali che erano alimentati con la dieta contenente streptomycina presentano una curva di accrescimento ad andamento parabolico fino al momento che coincide con l'inizio dei sintomi più gravi di carenza, momento in cui si nota una flessione abbastanza evidente; il trattamento con le varie sostanze sperimentate, provoca negli animali di tutti i gruppi la ripresa di quell'andamento parabolico della curva del peso cui abbiamo accennato; questa ripresa sostanzialmente uniforme in tutti i gruppi non è in rapporto diretto con il grado di guarigione dei sin-

tomi caratteristici della carenza che varia a seconda dell'attività delle sostanze somministrate. L'appiattimento della curva di accrescimento che viene descritto tra i sintomi della carenza (19-20) si nota effettivamente nei grafici dei pesi che si riferiscono ai gruppi di animali alimentati con la dieta I, contenente solfonamidoguanidina, ma è evidente che tale andamento della

RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA I-CURVE DI CRESCITA

LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI

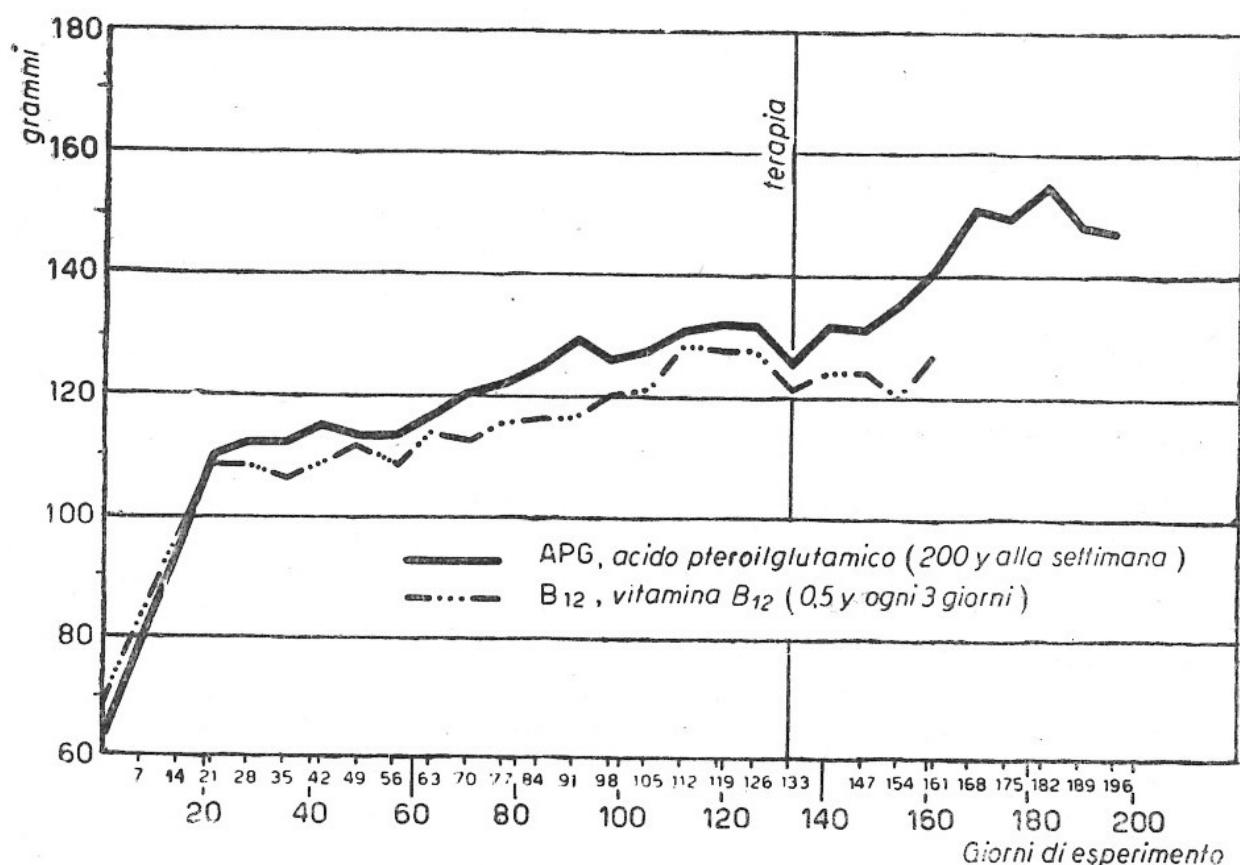


Fig. 1

curva è in rapporto, per la massima parte, con la nota azione antitiroidea esercitata dal prodotto solfonamidico somministrato (21-22-23-24-25); anche in questo caso si nota una leggera ripresa dell'accrescimento in coincidenza dell'inizio del trattamento terapeutico. Ci sembra quindi di poter concludere che il criterio del peso non può essere considerato come indicativo del grado di carenza raggiunto e della attività curativa delle varie sostanze esaminate.

D'altra parte non ci sembra che i dati ematologici fino ad ora presi in considerazione dalla maggior parte degli AA. che si sono occupati dell'argomento, siano sufficienti a caratterizzare completamente il tipo di anemia

legato alla carenza del fattore in questione. Per queste ragioni nel corso del nostro esperimento sono stati seguiti settimanalmente il numero dei globuli rossi e dei globuli bianchi per mm^3 , il tasso emoglobinico, ed è stato

RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA II-CURVE DI CRESCITA

LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI

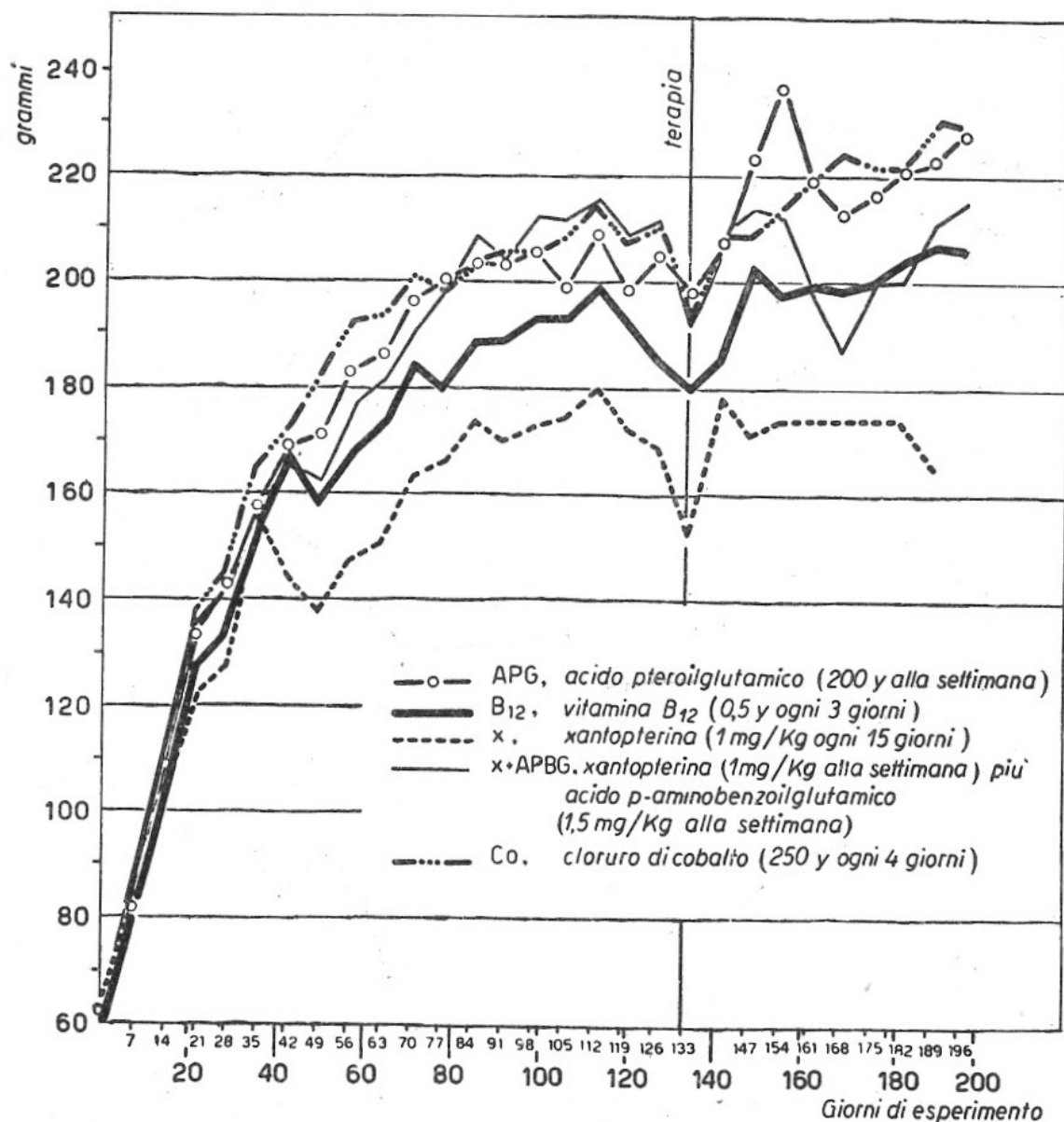
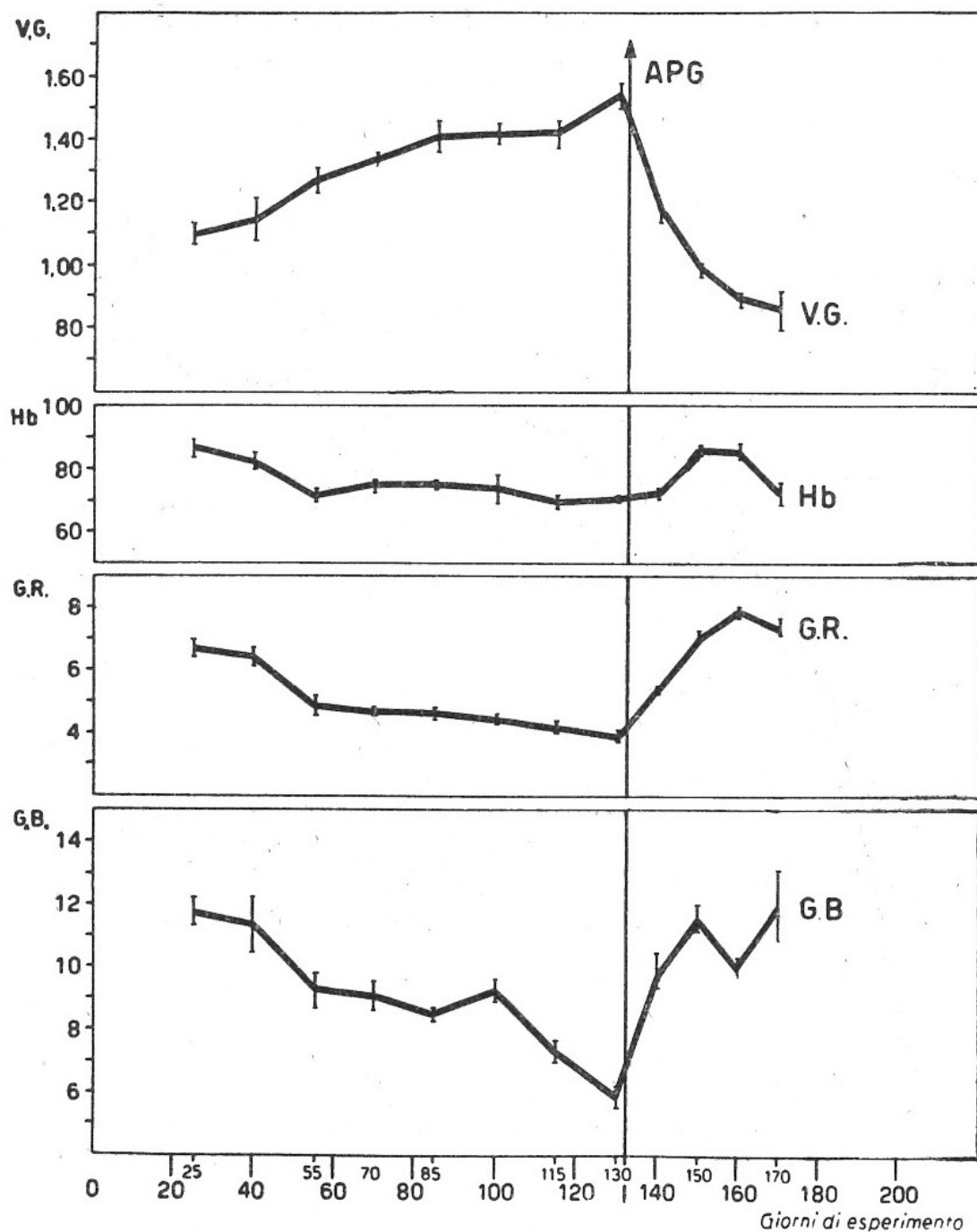


Fig. 2

calcolato il valore globulare, allestendo contemporaneamente strisci di sangue periferico per misurare il diametro delle emazie e costruire le curve di Price Jones (vedi figura 10); è stato infine studiato il mielogramma dei ratti normali del nostro allevamento e quello dei ratti carenti, periodicamente durante il corso della carenza fino a carenza inoltrata, nonché du-

RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA I-RISULTATI DELLA TERAPIA CON ACIDO PTEROILGLUTAMICO (200 y alla settimana)

LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI



G.R., globuli rossi (milioni per mm^3)

Hb, emoglobina % (Sahli)

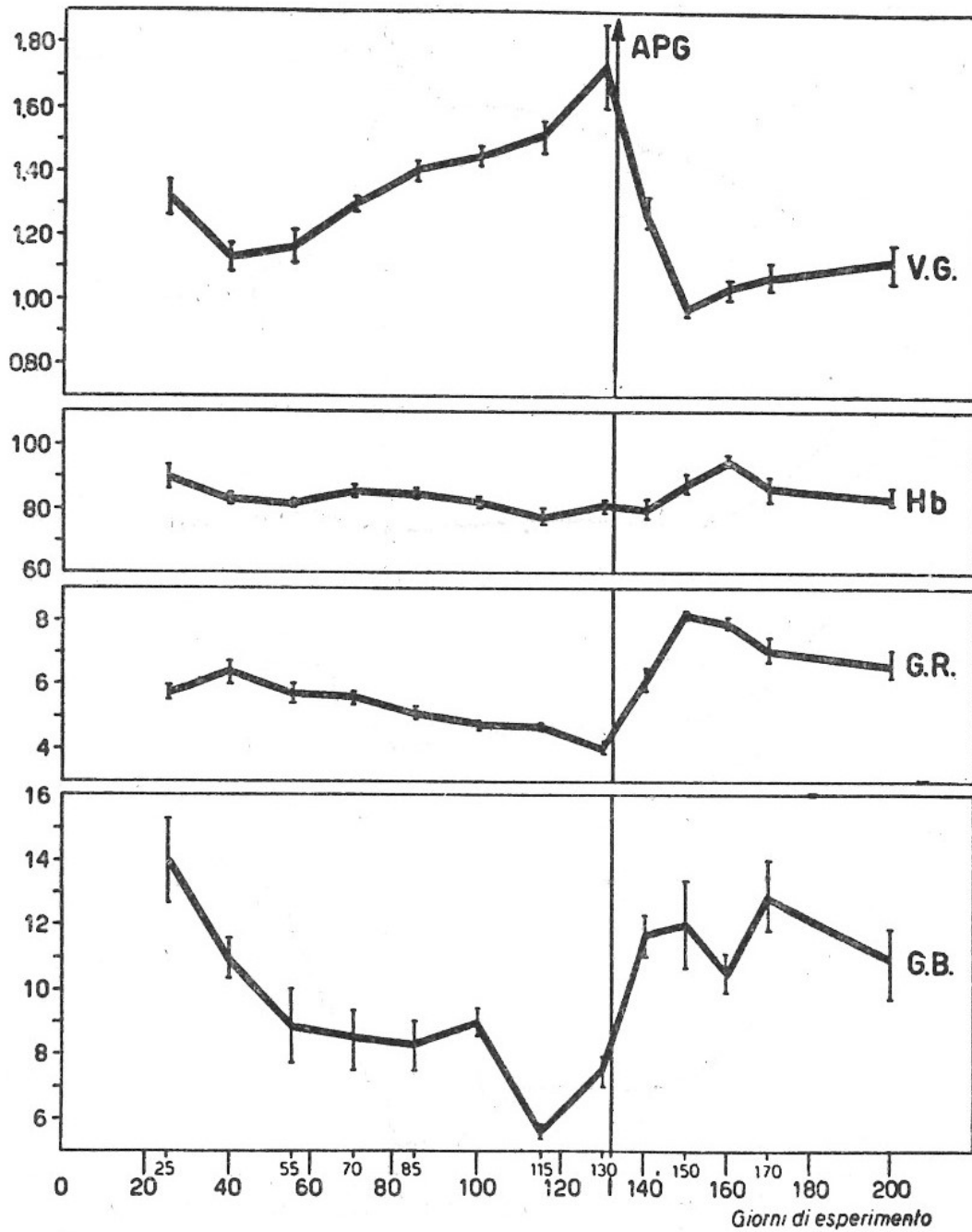
VG, valore globulare

GB, globuli bianchi (migliaia per mm^3)

Fig. 3

RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA II-RISULTATI DELLA TERAPIA CON ACIDO PTEROILGLUTAMICO (200 y alla settimana)

LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI

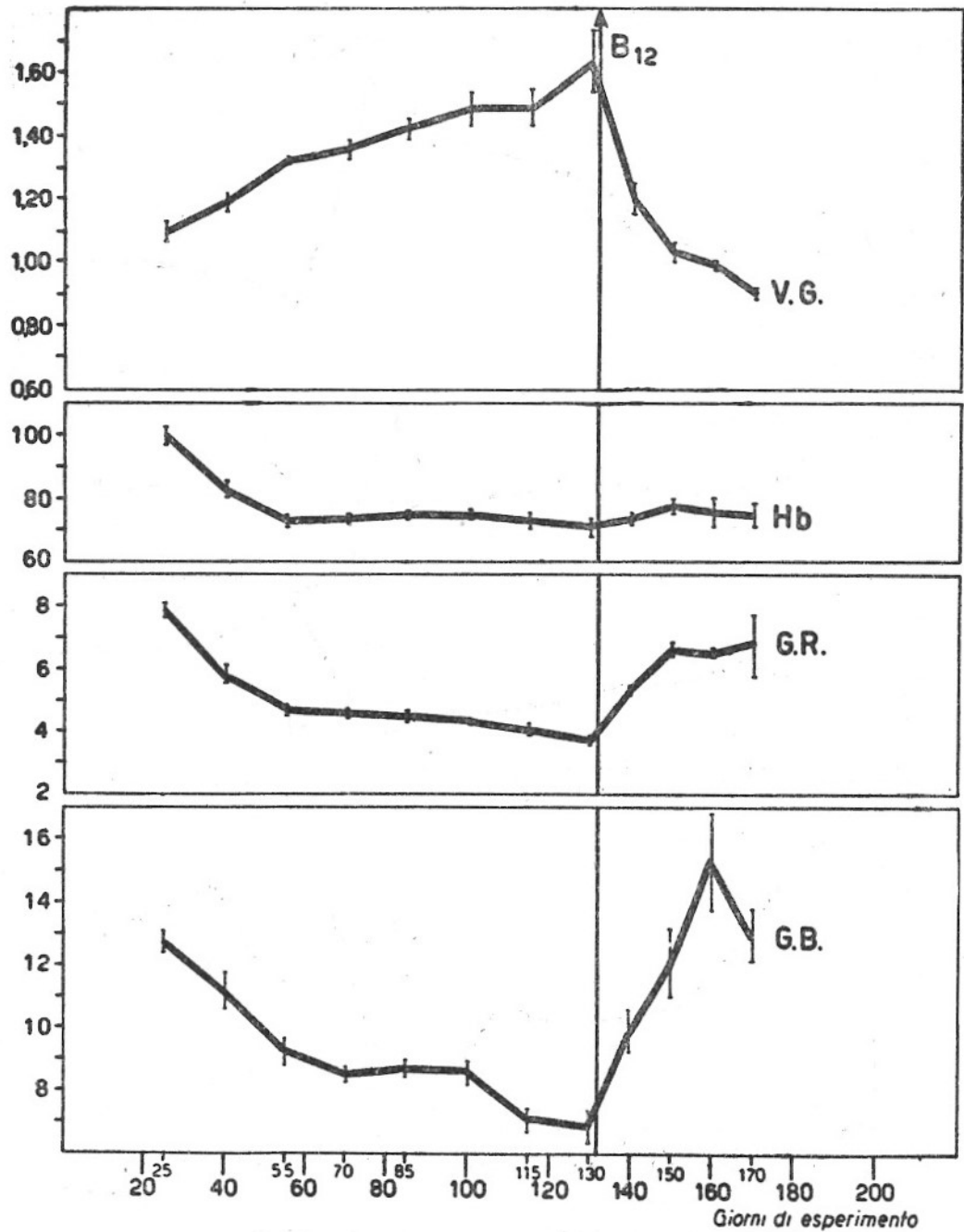


G.R., globuli rossi (milioni per mm^3)
Hb., emoglobina (Sahli)

V.G., valore globulare
G.B., globuli bianchi (migliaia per mm^3)

Fig. 4

RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA I-RISULTATI DELLA TERAPIA CON
VITAMINA B₁₂ (0,5 y ogni 3 giorni)
LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI



G.R., globuli rossi (milioni per mm³)
Hb, emoglobina (Sahli)

V.G., valore globulare
Gb, globuli bianchi (migliaia per mm³)

Fig. 5

rante il periodo di cura. L'allestimento dei preparati di sangue midollare veniva eseguito prelevando il midollo dal femore secondo la tecnica di CAMERON e WATSON (26).

I risultati ottenuti ci permettono di affermare che l'anemia che si sviluppa nel corso della carenza di acido folico nel ratto, ha i caratteri di una anemia ipercromica, macrocitica, con presenza di megaloblasti nel midollo osseo; fino ad ora invece da tutti gli AA. che hanno studiato tale carenza, è stata concordemente descritta, come caratteristica di essa, una anemia ipocromica, macrocitica; nei pochi lavori in cui è stato anche preso in considerazione il mielogramma, è stata in genere osservata una prevalenza di cellule più immature, ma sempre della serie normoblastica.

Dobbiamo subito premettere che, come è noto, nel ratto normale ad un valore medio di 8.500.000 globuli rossi per mm.³ corrisponde un tasso emoglobinico (calcolato con il metodo di Sahli) di 99-101 % (27), che è lo stesso che si trova nell'uomo normale per una concentrazione di 5.000.000 di globuli rossi per mm.³; è chiaro che, per calcolare il valore globulare nel ratto, occorre introdurre nella nota formula usata per il corrispondente dato nel-

l'uomo $VG. = \frac{Hb}{2 \text{ G.R.}}$, in cui Hb rappresenta il tasso emoglobinico e G.R.

il numero dei globuli rossi per mm.³ di sangue, un fattore di correzione K, che è stato calcolato uguale a 1,7 modificando la formula in questo senso

$VG. = K \frac{Hb}{2 \text{ G.R.}}$; solo con questo accorgimento si può ottenere un valore

globulare per il ratto normale uguale a 1, ed è possibile giudicare con esattezza della iper- o ipocromia presentata dagli animali in esperimento. Ciò posto il criterio di valutazione usato dai vari AA. per stabilire la ipocromia di cui essi parlano è inesatto perchè basato sullo studio unilaterale del tasso emoglobinico.

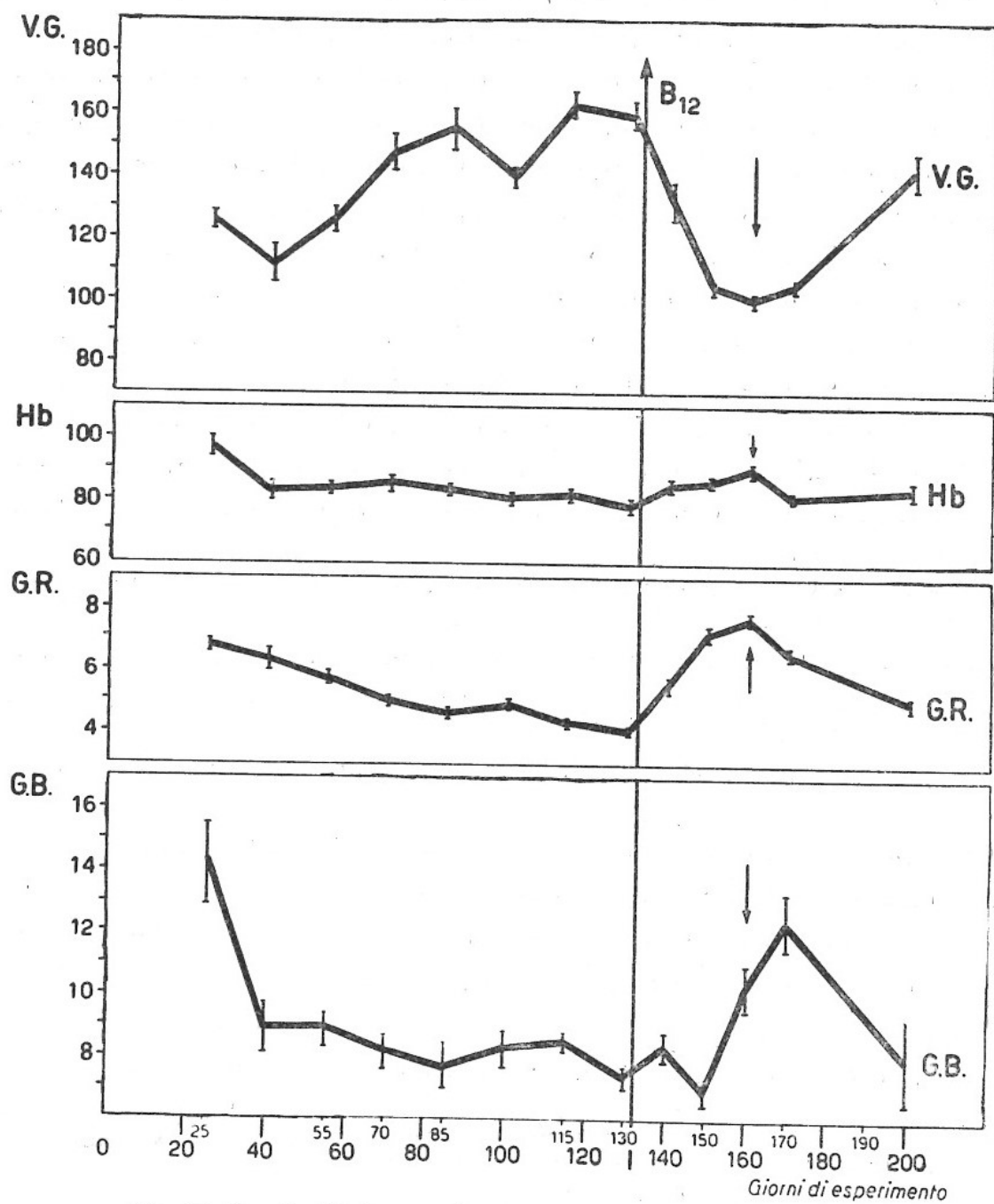
Per quanto riguarda la macrocitosi presentata dagli animali in carenza, le curve di Price Jones, costruite con i diametri dei globuli rossi misurati in strisci di sangue periferico, dimostrano un aumento del diametro medio di 1-2 micron rispetto agli animali normali.

Nella Tabella II viene riportato, un sommario dei dati ottenuti dallo studio dei mielogrammi dei ratti normali, in carenza e dopo trattamento con acido folico.

Le variazioni del numero dei globuli bianchi per mm.³ di sangue, che si osservano durante il periodo di carenza provocata nel ratto con la dieta I, nonchè la risposta degli stessi globuli bianchi al trattamento terapeutico, concordano con le variazioni riferite dagli altri AA.; analogo comporta-

RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA II-RISULTATI DELLA TERAPIA CON
LA VITAMINA B₁₂ (0,5 y ogni 3 giorni)

LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI



G.R. globuli rossi (milioni per mm³)
Hb emoglobina (Sahli)

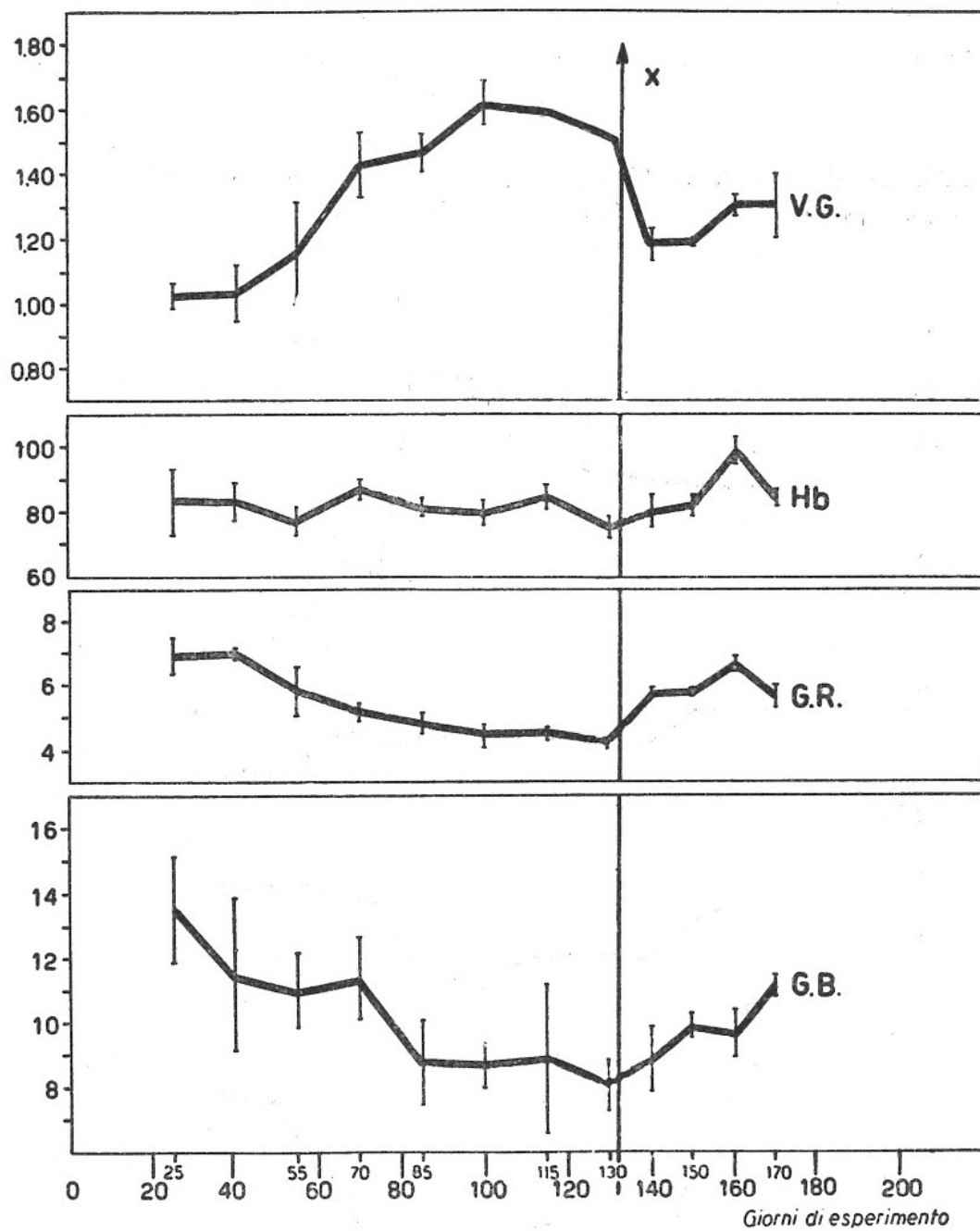
V.G. valore globulare
G.B. globuli bianchi (migliaia per mm³)

La seconda freccia indica la sospensione del trattamento.

Fig. 6

RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA II-RISULTATI DELLA TERAPIA CON XANTOPTERINA (1mg/Kg: ogni 15 giorni)

LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI



G.R., globuli rossi (milioni per mm^3)
Hb. emoglobina (Sahli)

V.G., valore globulare
Gb, globuli bianchi (migliaia per mm^3)

Fig. 7

mento dei globuli bianchi è stato osservato negli animali in cui la carenza era stata ottenuta con la dieta II; questo dato conferma l'opinione, ormai concorde, che la leucopenia non è in relazione con la influenza tossica che i prodotti solfonamidici esercitano sul midollo osseo.

3) *Attività terapeutica delle varie sostanze prese in esame.* — Per quello che riguarda l'acido folico, ci siamo attenuti alle dosi curative comunemente

**RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA II-RISULTATI DELLA TERAPIA CON XANTOPTERINA
(1 mg/Kg ogni settimana) + ACIDO P-AMINOBENZOILGLUTAMICO (1,5 mg/Kg ogni settimana)**

LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI

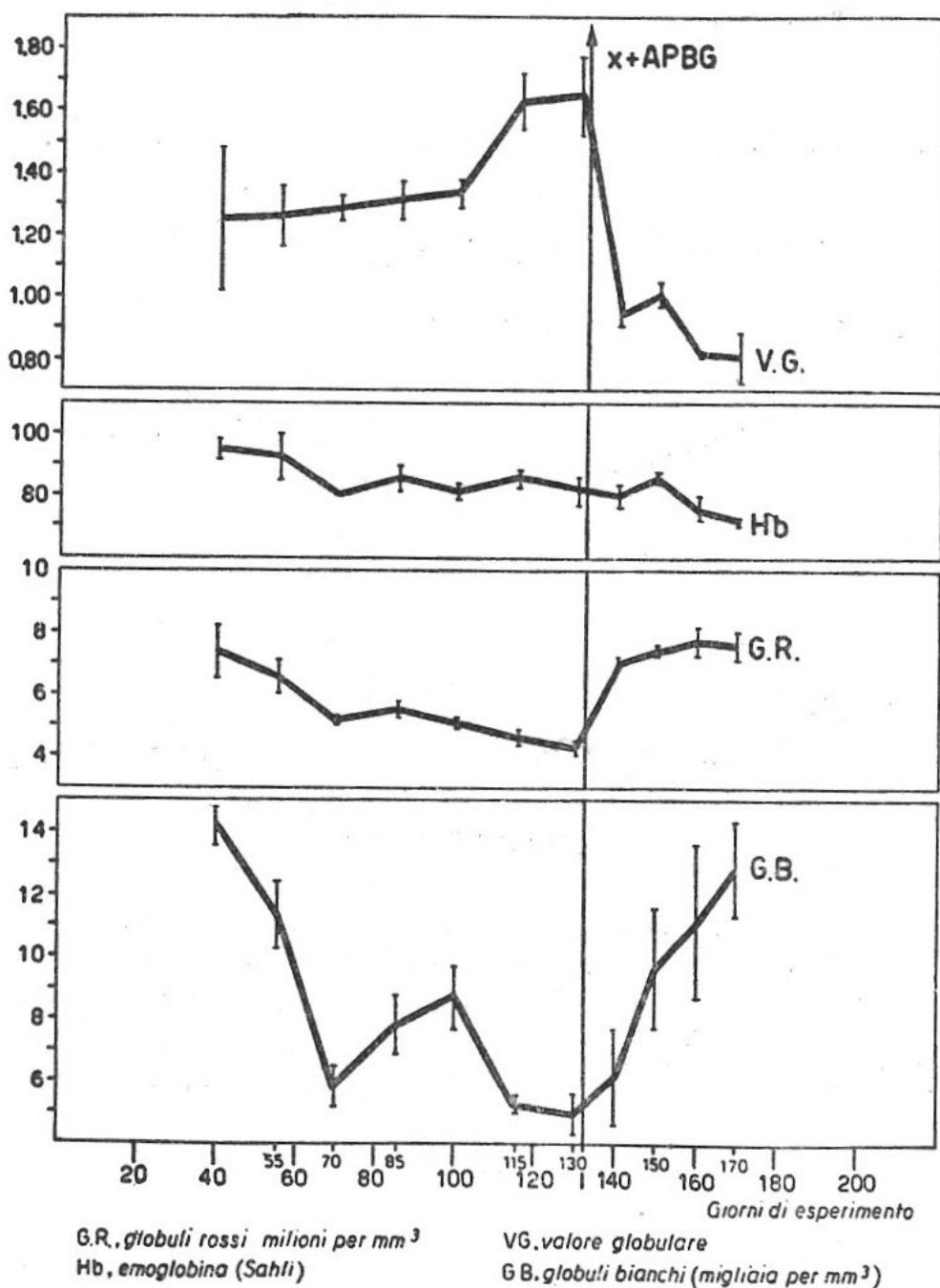
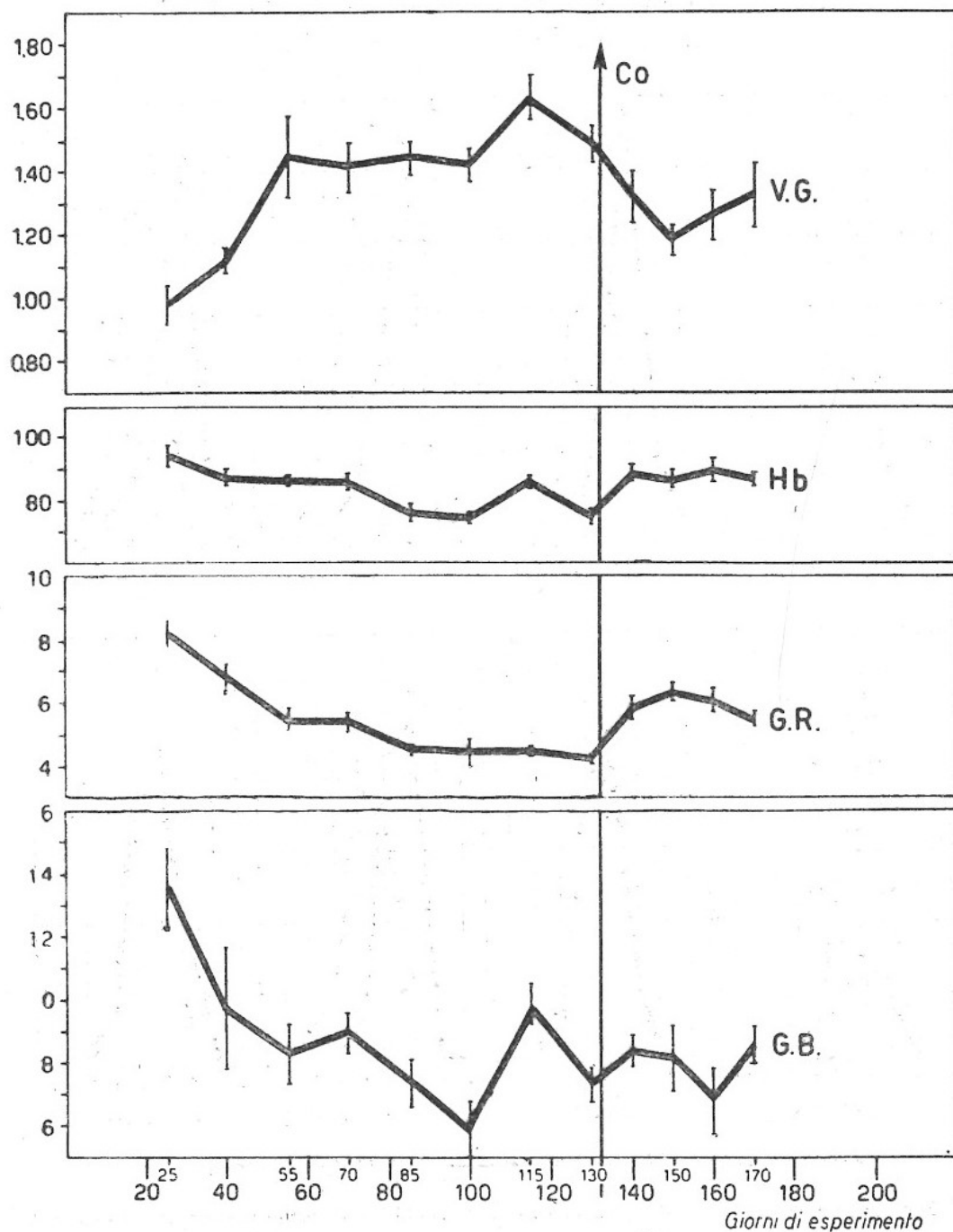


Fig. 8

usate dai vari AA. L'acido folico, somministrato per via parenterale, è capace di riportare prontamente e completamente alla norma i valori della concentrazione per mm^3 di sangue dei globuli rossi e dei globuli bianchi, del tasso emoglobinico e del valore globulare; anche il mielogramma si modi-

RATTI ALIMENTATI CON LA DIETA II-RISULTATI DELLA TERAPIA CON CLORURO DI COBALTO (250 y ogni 4 giorni)

LE CURVE SONO COSTRUITE SUI VALORI MEDI



G.R., globuli rossi (milioni per mm^3)
Hb, emoglobina (Sahli)

V.G., valore globulare
Gb, globuli bianchi (migliaia per mm^3)

Fig. 9

fica parallelamente sino a ritornare normale. Tale azione si esplica anche, e nella stessa misura, su animali che presentano un quadro carenziale grave, quale è stato ottenuto con la dieta contenente solfonamidoguanidina.

La vitamina B₁₂ della quale è stato somministrato parenteralmente un concentrato altamente purificato ottenuto da culture di *Streptomyces griseus*, dimostra un attività terapeutica anche essa completa, che però, se comparata con quella dell'acido folico, è leggermente inferiore soprattutto per quello

CURVE DI PRICE E JONES COSTRUITE SUI VALORI MEDI DEI DIAMETRI DEI GLOBULI ROSSI

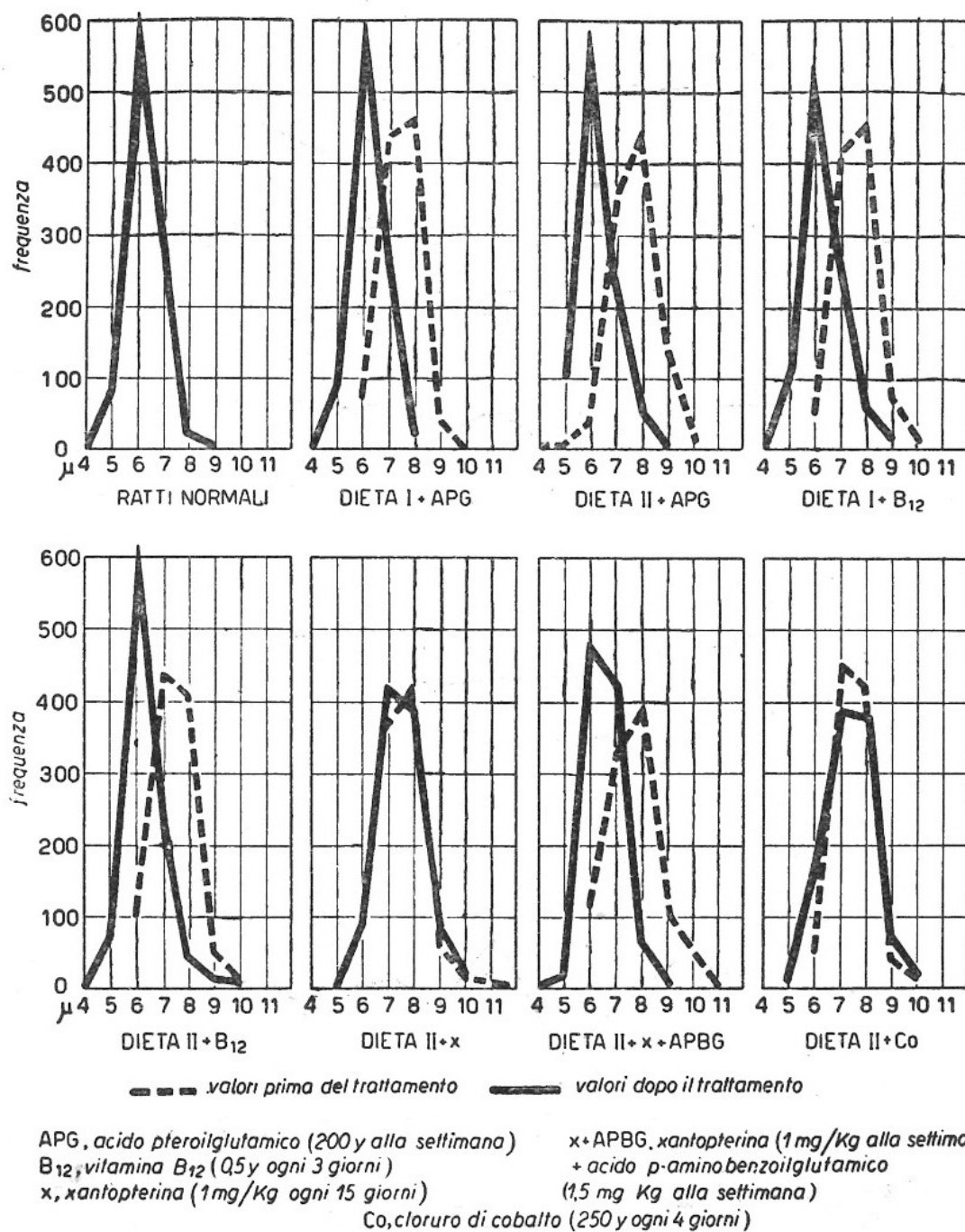


Fig. 10

che riguarda il tempo necessario per riportare alla norma i dati ematologici presi in considerazione. Tale differenza rispetto alla attività dell'acido folico è più evidente nel caso in cui si inizi la terapia essendosi stabilito un quadro carenziale più grave come quello che si instaura negli animali che ricevevano la solfonamidoguanidina quale inibitore della flora intestinale (dieta I). Questi dati confermerebbero quanto è stato osservato in campo clinico sulla attività della vitamina B₁₂ nelle anemie macrocitiche da carenza alimentare.

La xantopterina, anche se somministrata anzichè in una dose unica come riportato nei lavori di NORRIS e MAJNARICH (²⁸⁻²⁹), in due dosi alla distanza di 15 giorni l'una dall'altra, non ha dimostrato attività curativa sui sintomi carenziali; il lieve aumento del numero dei globuli rossi che si osserva negli animali alimentati con la dieta contenente streptomycina e che presentano una carenza meno grave, conferma l'attività policitemica, che, come è noto (³⁰⁻³¹⁻³²) la sostanza esercitata nel ratto normale; d'altra parte il valore globulare, pur cadendo lievemente, resta sempre su valori molto al di sopra dei normali. Questa azione d'altronde è nulla negli animali che presentano una carenza molto grave.

Dagli studi sul metabolismo batterico è noto che i microrganismi i quali hanno bisogno di alcune vitamine come fattori di crescita, possono talvolta essere capaci di sintetizzare il fattore necessario qualora si aggiungano nel terreno sintetico di cultura le due parti fondamentali della molecola del fattore stesso, o anche una sola di esse. Abbiamo perciò voluto sperimentare l'attività di una miscela di xantopterina e di acido p-aminobenzoilglutamico somministrata in soluzione per via parentale, essendo i due costituenti in rapporto equimolecolare rispetto alla molecola dell'acido folico. I risultati ottenuti dimostrano che l'animale, quando è in uno stato di carenza grave come quello ottenuto alimentandolo con la dieta I, non è capace di utilizzare le sostanze da noi sperimentate le quali non hanno praticamente alcuna influenza sul suo stato carenziale; iniziando invece il trattamento terapeutico in animali che presentano un grado di carenza meno pronunciato, come è il caso di quelli alimentati con la dieta II, si ottiene una risposta normalizzatrice dei valori ematologici la cui prontezza e la cui completezza è paragonabile a quella ottenuta nell'analogo gruppo di animali trattati con la vitamina B₁₂. Possiamo quindi affermare che in questo caso gli animali dimostrano una certa capacità di utilizzare, per la formazione del principio di cui sono carenti, le sostanze che della molecola di esso sono componenti.

Il cobalto somministrato per via parentale in animali che presentano una carenza non grave, produce, come è noto per gli animali normali, (³³⁻³⁴⁻

³⁵⁻³⁶⁻³⁷), un lieve aumento del numero dei globuli rossi e dell'emoglobina; tale variazione di questi valori non modifica però in alcun modo il quadro ipercromico con presenza di megaloblasti nel midollo osseo che è caratteristico, come è stato più sopra detto, della carenza di acido folico; d'altra parte anche la leucopenia non viene sensibilmente modificata.

CONCLUSIONI

Il presente esperimento ha anzitutto rivelato che i ratti alimentati con la dieta contenente l'1 per mille di streptomycina, presentano una carenza conclamata di acido folico nel 55% dei casi. Tale carenza insorge dopo un periodo di tempo pressochè uguale a quello necessario perchè si manifesti nei ratti alimentati con dieta contenente solfonamidoguanidina, ma i sintomi ematologici sono meno gravi.

In secondo luogo è evidente che l'anemia che si manifesta nei ratti alimentati con diete purificate carenti di acido folico è di tipo ipercromico e macrocitico; il quadro midollare è caratterizzato da una iperplasia eritroide e dalla presenza di megaloblasti. Questa anemia potrebbe pertanto essere compresa nel gruppo delle anemie alimentari che sono state descritte nella scimmia (³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰⁻⁴¹⁻²⁻⁶) nel maiale (⁴²⁻⁴³⁻⁴⁴⁻⁴⁵⁻⁴⁶⁻⁴⁷⁻⁴⁸) e nel topolino (⁴⁵⁻²⁻⁶); e dimostra delle analogie con varie anemie alimentari dell'uomo che sono legate alla carenza di acido folico e come tali rispondono prontamente alla terapia con tale fattore (⁴⁷⁻⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵²⁻⁵³⁻⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁶⁻⁵⁷⁻⁵⁸⁻⁵⁹⁻⁶⁰⁻⁶¹⁻⁶²⁻⁶³⁻⁶⁴).

La vitamina B₁₂ ha dimostrato una attività terapeutica meno pronta e completa; tuttavia tutti gli animali trattati sono guariti dopo un periodo di tempo un pò più lungo. Tale attività è analoga a quella dimostrata da questa vitamina nelle anemie alimentari dell'uomo (⁶⁴⁻⁶⁵⁻⁶⁶⁻⁶⁷⁻⁶⁸⁻⁶⁹⁻⁷⁰⁻⁷¹) e costituisce una conferma dei dati riportati da Cameron e collaboratori per il ratto (⁷²).

Questa azione esplicata dalla vitamina B₁₂ in animali carenti di acido folico potrebbe essere un elemento importante nello studio delle relazioni tra i due fattori. Ulteriori chiarimenti potrebbero ottenersi con lo studio della attività dell'acido folico in animali che presentano una carenza doppia di vitamina B₁₂ e di acido folico.

I risultati curativi ottenuti con la somministrazione contemporanea di xantoptina e di acido p-aminobenzoilglutamico appaiono molto interessanti e meritevoli di ulteriore studio anche con altre sostanze che possano fornire all'animale carente gruppi costituenti della molecola dell'acido folico.

Da quando è stata accertata la presenza del cobalto nella molecola della vitamina B₁₂, sono stati ripresi gli studi sulle anemie da deficienza di co-

balto e sulla policitemia provocata da questo elemento somministrato in dosi non tossiche agli animali normali; i nostri esperimenti sulla attività curativa del cobalto nel ratto carente di acido folico hanno dimostrato che questa attività è assolutamente aspecifica e non modifica in alcun modo il quadro carenziale.

Roma. Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BLACK, J., MC KIBBIN, J. M., ELVEHJEM, C. A. - Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 47, 308 (1941).
- (²) PFIFFNER, J. J., HOGAN, A. G. - Vitamins and Hormones, IV, 30-58 (1945).
- (³) MILLER, A. K. - J. Nutrition, 29, 143 (1945).
- (⁴) BERRY, L. J., SPIES, T. D. - Blood 1, 271 (1946).
- (⁵) Annals N. Y. Acad. Sc. 48/5, 255-350 (1946).
- (⁶) HUTCHINGS, B. L., MOWAT, J. H. - Vitamins and Hormones, VI, 1-22 (1948).
- (⁷) TENTORI, L., VIVALDI, G. - Questi Rendiconti, XI, 531 (1948).
- (⁸) FRANKLIN, A. L., STOKSTAD, E. L. R., BELT, M., JUKES, T. H. - J. Biol. Chem., 169, 527 (1947).
- (⁹) CARTWRIGHT, G. E., WINTROBE, M. N. - Ann. Rev. Physiol., XI, 341 (1949).
- (¹⁰) MESSERSCHMIDT - Rev. d'Hematol., 4/2, 194 (1949).
- (¹¹) PHILIPS, F. S., TIERSCH, J. B. - J. Pharmacol. Exp. Ther., 95/3, 303 (1949).
- (¹²) SWENSEID, M. E., YITTLE, E. L., MOERSH, G. W., BIRD, O. D. BROWN, A. A. - J. Biol. Chem., 179, 1175 (1949).
- (¹³) FERGUSON, F. C., TIERSCH, J. B., PHILIPS, F. S. - J. Pharmacol. Exp. Ther. - 98/3, 293 (1950).
- (¹⁴) CAMERON, D. G., CALLENDER, S. T. E., WATSON, G. M., WITTS, L. J. - Lancet, 2, 404 (1948).
- (¹⁵) GROSS, AXELROD, BOSSE - Am. J. Med. Sc., 208, 642 (1944).
- (¹⁶) ENDICOTT, DAFT, OTT - Arch. Path., 40, 364 (1945).
- (¹⁷) FRANKLIN, A. L., STOKSTAD, E. L. R., BELT, M., JUKES, T. H. - J. Biol. Chem., 169, 427 (1947).
- (¹⁸) LECOCQ, R. - Bull. Soc. Chim. Biol., 30, 280 (1948).
- (¹⁹) SPICER, S. S., DAFT, F. S., SEBRELL, W. H., ASHBURN, L. L. - Pub. Healt. Repts., 57 1559 (1942).
- (²⁰) AXELROD, A. E., BOSSE, M. D., GROSS, P., GREGG, H. - Arch. Biochem., 7, 91 (1945).
- (²¹) MACKENZIE, J. B., MACKENZIE, C. B., Mac COLLUM, E. V. - Science, 9, 518 (1941).
- (²²) MACKENZIE, C. G., MACKENZIE J. B. - Endocrinology, 32, 185 (1943).
- (²³) ASTWOOD, E. B., SULLIVAN, J., BISSEL, A., TISLOWYTZ, R. - Endocrinology, 32; 210 (1943).
- (²⁴) HUGHES, A. M. - Endocrinology, 34, 69 (1944).
- (²⁵) SEEGAR JONES, G. E., DELFS, E., FOOTE, E. S. - Endocrinology, 38, 337 (1946).

- (26) CAMERON, D. G., WATSON, G. M. - Blood, 3, 292 (1948).
- (27) GRIFFITH, J. Q. jr., FARRIS, E. - The rat. Ed. Lippincott Co., Philadelphia, p. 355 (1942).
- (28) NORRIS, E. R., MAJNARICH, J. J. - Am. J. Physiol., 152, 179 (1948).
- (29) NORRIS, E. R., MAJNARICH, J. J. - Am. J. Physiol., 153, 133 (1948).
- (30) TSCHESCHE, R., WOLF, H. J. - Z. Physiol. Chem., 244, I (1936).
- (31) TOTTER, J. J. R., DAY, P. L. - J. Biol. Chem., 147, 257 (1943).
- (32) PRITCHARD, J. A. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69, 221 (1948).
- (33) MYRS, V. C., BEARD, H. H., BARNES, B. O. - J. Biol. Chem., 94, 117 (1931-32).
- (34) ORTEN, J. M., UNDERHILL, F. A., MUGRAGE, E. R., LEWIS, R. C. - J. Biol. Chem. 96, 11 (1932).
- (35) STARE, F. J., ELVEHJEM, C. A. - J. Biol. Chem., 99, 473 (1932-33).
- (36) UNDERWOOD, E. J., ELVEHJEM, C. A. - J. Biol. Chem., 124, 419 (1938).
- (37) CUTHBERTSON - 1st. Int. Congress of Biochem. Repts., p. 82 (1949).
- (38) WILLS, L., BILIMORIA, H. S. - Indian J. Med. Research, 20, 391 (1932).
- (39) WILLS, L., STEWART, A. - Brit. J. Exp. Path., 16, 444 (1935).
- (40) BUSSABARGER, R. A., IVY, A. C., WIGODSKY, H. S., GUNN, F. D. - Ann. Int. Med., 13, 1028 (1939).
- (41) TOTTER, J. R. - Ann. N. Y. Acad. Sc., 48, 309 (1946).
- (42) HEINLE, R. W., WELCH, A. D., GEORGE, W. L., EPSTEIN, M., PRITCHARD, J. A. - J. Lab. Clin. Med., 32, 1398 (1947).
- (43) HEINLE, R. W., WELCH, A. D., GEORGE, W. L., EPSTEIN, M., PRITCHARD, J. A. - Proc. Central Soc. Clin. Research, 20, 7 (1947).
- (44) WELCH, A. D., HEINLE, R. W., SHARPE, G., GEORGE, W. L., EPSTEIN, M. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 65, 364 (1947).
- (45) WEIR, D. R., HEINLE, R. W., WELCH, A. D. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69, 211 (1948).
- (46) CARTWRIGHT, G. E., WINTROBE, M. M. - Ann. Rev. Physiol., 11, 339 (1949).
- (47) CARTWRIGHT, G. E., FAY, J., TATTING, B., WINTROBE, M. M. - J. Lab. Clin. Med., 33, 937 (1948).
- (48) CARTWRIGHT, G. E., TATTING, B., ASHENBRUCKER, H., WINTROBE, M. M. - Blood, IV, 301 (1949).
- (49) DARBY, W. J. - Vitamins and Hormones, 119 (1947).
- (50) DAVIDSON, L. S. P., GIRWOOD, R. H., INNES, E. M. - Lancet, 1, 511 (1947).
- (51) KEMP, T. A. - Lancet, 2, 350 (1947).
- (52) MORGANS, M. E., REMINGTON, C., WHITTAKER, M. - Lancet, 2, 128 (1947).
- (53) WALDENSTROM, J. - Blood, 2, 426 (1947).
- (54) ZWELZER, W. W. - J.A.M.A., 134, 998 (1947).
- (55) DAMESHEK, W. - Blood, 3, 699 (1948).
- (56) DAVIDSON, L. S. P. - Blood, 3, 107 (1948).
- (57) DAVIDSON, L. S. P., GIRWOOD, R. H., CLARK, J. R. - Brit. Med. J., 1, 819 (1948).
- (58) GOODALL, J. W., GOODALL, H. I., BANNERJEE, D. - Lancet 1, 20 (1948).
- (59) SPIES, T. D., LOPEZ, G. G., MILANES, F., STONE R., E., TOKA, R. L., ARAMBURU, T. - Lancet, 1, 239 (1948).
- (60) VON BONSDORFF, B. - Blood, 3, 91 (1948).
- (61) WILKINSON, J. F. - Brit. Med. J., 1, 771 (1948).
- (62) WILLS, L. - Blood, 3, 36 (1948).
- (63) SEBRELL, W. H. - Fed. Proc. June, 569 (1949).
- (64) UNGLEY, C. C. - 1st. Int. Congress of Biochem. Repts., p. 76 (1949).

- (⁶⁵) BETHELL, F. H., MEYERS, M. C., NELIGH, R. B. - J. Lab. Clin. Med., 33, 1477 (1948).
- (⁶⁶) SPIES, T. D., STONE, R. E., ARAMBURU, T. - South M. J., 41, 522 (1948).
- (⁶⁷) STONE, R. E., SPIES, T. D. - J. Lab. Clin. Med., 33, 1019 (1948).
- (⁶⁸) DAMESHEK, W. - Blood, 4, 76 (1949).
- (⁶⁹) SPIES, T. D., SUAREZ, R. M., GARCIA LOPEZ, G., MILANES, F., STONE, R. E., LOPEZ TOCA, R., ARAMBURU, T., KARTUS, S. - J.A.M.A., 139, 521 (1949).
- (⁷⁰) STURGIS, C. C. - Postgraduate Med., 5, 300 (1949).
- (⁷¹) SPIES, T. D., STONE, R. E., GARCIA LOPEZ, G., MILANES, F., LOPEZ TOCA, R., ARAMBURU, T. - Lancet, 2, 454 (1949).
- (⁷²) CAMERON, D. G., CALLENDER, S. T. E., WATSON, G. M., WITTS, L. J. - Nature, 164, 4161 (1949).
-