

### 38. Leonardo TENTORI e Girolamo VIVALDI. — L'acido pteroil-glutamico ed i suoi coniugati.

**Riassunto.** — Gli AA. espongono in una rivista critico sintetica le attuali conoscenze sull'isolamento e sulle proprietà fisiche, chimiche e biologiche dell'acido pteroil-glutamico, dei suoi coniugati e delle sostanze che hanno analogia con l'attività di essi.

**Résumé.** Les AA. exposent, par une revue de critique synthétique, nos connaissances actuelles sur l'isolement et les propriétés physiques, chimiques et biologiques de l'acide ptéroyl-glutamique, de ses conjugués et des substances ayant une analogie avec leur activité.

**Summary.** — The AA. set forth, in a critico-synthetical review, our present knowledge about the separation and the physical, chemical and biological properties of pteroylglutamic acid, of its conjugated compounds and of substances showing some analogy with their activity.

**Zusammenfassung.** — Die Verfasser legen in einer kritisch-synthetischen Übersicht die gegenwärtigen Kenntnisse über die Isolierung und über die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der Pteroilglutaminsäure, sowie ihrer Konjugate und jener Substanzen dar, welche eine Analogie mit ihrer Aktivität haben.

Ricerche eseguite durante il periodo bellico soprattutto dagli autori anglo-sassoni, hanno portato alla scoperta di un gruppo di nuovi principi attivi del complesso B, che presentano spiccata analogia nella loro azione biologica, e dei quali il più comunemente noto venne denominato acido folico per essere stato per la prima volta estratto dalle foglie di spinacio, ed attualmente, a seguito della identificazione della sua struttura molecolare, viene designato con il nome di acido pteroil-glutamico.

Fin dal 1932 era noto per opera di Wills e Bilimoria (<sup>1</sup>), che nelle scimmie alimentate con una dieta simile a quella abituale di certi indigeni dell'India (riso brillato, pane bianco e « chapatti »), si sviluppava una

(<sup>1</sup>) Indian J. M. Research, 20, 391 (1932).

sindrome anemica con leucopenia e granulocitopenia relativa accompagnata da una iperplasia megaloblastica del midollo osseo e da diarrea che veniva a guarigione in seguito alla somministrazione di estratti di lievito; questa sindrome venne attribuita da Day, Langston e Darby (<sup>2</sup>) ad una deficienza di « vitamina M » (monkey = scimmia) nuovo fattore del complesso B.

Di importanza fondamentale, però, per le ulteriori conoscenze su questo gruppo di nuovi fattori vitaminici furono gli studi sulla capacità di alcuni principi attivi di provocare lo sviluppo delle culture di bacilli dell'acido lattico, compiuti nel 1936 da Orla, Jensen e coll. (<sup>3</sup>) i quali resero noto che tali bacilli avevano bisogno, per una crescita normale, che ai terreni di cultura fossero aggiunti acido pantotenico e lattoflavina. Compiendo appunto delle ricerche su questi « fattori di crescita per i batteri », Snell e Peterson (<sup>4</sup>) nel 1940 resero noto che alcuni batteri dell'acido lattico avevano bisogno per il loro sviluppo di estratti di piante o di organi di animali. In tali esperienze venne usato, come test, il *Lactobacillus casei* e Freudenreich, e si dimostrarono assai ricche dei fattori di crescita frazioni solubili di fegato ed estratti di lievito tra i quali il più attivo apparve un fattore ottenuto per eluizione delle predette sorgenti dopo adsorbimento di esse su norite. Subito si iniziarono ricerche intese a far luce sulle proprietà chimiche e sui metodi di purificazione di questi nuovi fattori. Hutchings, Bohonos e Peterson (<sup>5</sup>) ne dimostrarono la natura acida e la presenza nella molecola di un gruppo aminico, e Stokstad (<sup>6</sup>) isolò il fattore necessario alla crescita del *L. casei* dal fegato solubilizzato mediante adsorbimento su norite e successiva eluizione con una soluzione 0,5 N di idrato di ammonio in alcool metilico al 70%; sulla base di studi sulla idrolisi di esso, l'autore concluse che questo fattore conteneva una purina ed un nucleotide pirimidinico.

Nel 1941 Mitchell, Snell e Williams (<sup>7</sup>) ottennero dagli spinaci un fattore di crescita assai concentrato per lo *Streptococcus lactis R*, e sug-

(<sup>2</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 38, 860 (1938).

(<sup>3</sup>) Zbl. f. Bakt., 94, 434 (1936).

(<sup>4</sup>) J. Bact., 39, 273 (1940).

(<sup>5</sup>) J. Biol. Chem., 144, 521 (1941).

(<sup>6</sup>) J. Biol. Chem., 139, 475 (1941).

(<sup>7</sup>) J. Am. Chem. Soc., 63, 2284 (1941).

gerirono per esso il nome di «acido folico» in relazione al materiale dal quale esso veniva estratto; tale fattore stimolava anche la crescita del *L. casei* ed era contenuto nel fegato, nel lievito ed in altre sostanze; gli stessi autori (<sup>8</sup>) ne descrissero successivamente un saggio biologico di attività sullo *s. Lactis R*, mentre Landy e Dicken (<sup>9</sup>) mettevano a punto un altro test per l'acido folico ed altri principi attivi del complesso B usando il *L. casei*. Ancora Mitchell, Snell e Williams (<sup>10-11-12-13</sup>) pubblicarono nel 1944 una serie di quattro lavori sull'isolamento e sulle proprietà dell'acido folico, nei quali credettero di poter stabilire per esso la formula bruta  $C_{15}H_{15}O_8N_5$ , e di poter supporre, sulla base di ricerche spettrografiche, la presenza nella sua molecola di una struttura simile a quella della xantopterina.

Nel frattempo però Keresztesy, Rickes e Stokes (<sup>14</sup>) paragonando le quantità di acido folico e di fattore di eluizione contenute in vari tipi di estratti e di preparati di fegato, trovarono che qualcuna delle sostanze sperimentate era più attiva per lo *s. lactis R* che per il *L. casei*, fatto che stava in contrasto con quanto si sapeva sull'estratto dagli spinaci, che aveva la stessa attività per tutti e due i microrganismi; e riuscirono ad isolare e titolare biologicamente una sostanza che rimpiazzava l'acido folico per lo *s. lactis R*, ed era invece inattiva per il *L. casei*.

D'altra parte Stokstad (<sup>15</sup>) era riuscito ad isolare dal fegato e dal lievito delle preparazioni cristalline che dimostravano uguale attività per il *L. casei* e che avevano uguali proprietà fisiche; paragonando però l'attività dei due prodotti sui due microrganismi, usando come standard la frazione B del fegato di Mitchell e Snell, osservò che il preparato dal fegato aveva all'incirca attività uguale per ambedue essi, mentre quello dal lievito aveva una attività maggiore per il *L. casei*. Era quindi chiaro

(<sup>8</sup>) MITCHELL e SNELL, U. of Tex. Pub., 4137, 36 (1941).

(<sup>9</sup>) J. Lab. Clin. Med., 27, 1086 (1942).

(<sup>10</sup>) J. Am. Chem. Soc., 66, 267 (1944).

(<sup>11</sup>) FRIEDEN, MITCHELL e WILLIAMS, J. Am. Chem. Soc., 66, 269 (1944).

(<sup>12</sup>) MITCHELL e WILLIAMS, J. Am. Chem. Soc., 66, 271 (1944).

(<sup>13</sup>) MITCHELL, J. Am. Chem. Soc., 66, 274 (1944).

(<sup>14</sup>) Science, 97, 465 (1943).

(<sup>15</sup>) J. Biol. Chem., 149, 573 (1943).

che le due frazioni, diverse fra loro, erano differenti dal fattore di crescita isolato da Keresztesy e coll.

Successive ricerche di Stokes, Keresztesy e Foster (<sup>16</sup>) su questo argomento, misero in evidenza che, pur non avendo il loro fattore alcuna attività stimolante la crescita del *L. casei*, sperimentando su questo il liquido sovrastante una cultura di 24 ore di *s. lactis R.* contenente 100 volte la quantità del loro fattore necessaria per una crescita ottimale, si riusciva a provocare la crescita ottimale anche del *L. casei*. Si metteva così in evidenza che il fattore *s. lactis R.* poteva venire convertito dagli streptococchi in una forma attiva per il *L. casei*. Successivamente Stokes e Larsen (<sup>17</sup>) analizzarono accuratamente l'attività di vari stipiti di entrococchi nell'operare questa conversione. Riprendendo questi studi Mims, Totter e Day (<sup>18</sup>) dimostrarono che non solo le cellule viventi possiedono questa proprietà, riuscendo a produrre dal fegato di ratto un preparato enzimatico capace di produrre da materiale inattivo il fattore attivo; successive indagini di Laskowsky Mims e Day (<sup>19</sup>) sulla distribuzione di questi enzimi in natura, ne dimostrarono una grandissima diffusione in organi e tessuti animali tra cui particolarmente ricchi sono cervello, pancreas, osso, mucosa intestinale, rene e milza di ratto; di questo enzima fu stabilita una unità e se ne ottennero preparazioni parzialmente purificate. Sembrò quindi esistere un acido folico in forma potenziale convertibile in forma attiva per mezzo dell'enzima.

Data l'incertezza che regnava in questo campo, dovuta alla pluralità dei fattori messi in evidenza e all'oscurità delle loro relazioni, si sviluppò un altro gruppo di ricerche intese ad eliminare i possibili errori commessi nel corso di questi esperimenti. Così Luckey, Tepley ed Elvehjem (<sup>20</sup>) cercarono di stabilire un metodo costante per la determinazione biologica della attività dei preparati; Luckey, Briggs ed Elvehjem (<sup>21</sup>) proposero una composizione uniforme dei mezzi di cultura e Sherwood e

(<sup>16</sup>) Science, 100, 522 (1944).

(<sup>17</sup>) J. Bact., 50, 219 (1945).

(<sup>18</sup>) J. Biol. Chem., 155, 401 (1944).

(<sup>19</sup>) J. Biol. Chem., 157, 731 (1945).

(<sup>20</sup>) Science, 100, 201 (1944).

(<sup>21</sup>) J. Biol. Chem., 152, 157 (1944).

Singer (<sup>22</sup>) elaborarono un metodo per liberare il cotone grezzo, usato comunemente per tappare le provette, dalle tracce di acido folico che normalmente contiene.

Altre osservazioni di importanza teorica e pratica sono state fatte da Snell e Mitchell (<sup>23</sup>); Stokstad (<sup>24</sup>); Mitchell, Snell e Williams (<sup>10</sup>) ed altri autori sulle possibilità di sostituire l'acido folico con certe basi piridiniche e puriniche.

Nel mentre si svolgeva questo importantissimo gruppo di ricerche, il problema veniva aggredito da altri punti di partenza e con le tecniche usuali per lo studio della carenza negli animali da esperimento.

Riprendendo le ricerche di Wills e Bilimoria (<sup>1</sup>) e di Day, Langston e Shukers (<sup>25</sup>) sulle scimmie, Langston, Darby, Shukers e Day (<sup>26</sup>), sulla base di ulteriori ricerche su questi animali, conclusero che la sindrome carenziale ottenuta non poteva essere guarita dal cloridrato di tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), dalla riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) e dalla niacina (vitamina PP), né separatamente né somministrate insieme; gli animali venivano invece protetti dalla somministrazione di 10 g di lievito di birra secco, oppure di 2 g di estratto di fegato (frazione G di Cohn) al giorno. Wilson, Doan, Saslaw e Schwab (<sup>27</sup>) dimostrarono che iniezioni intramuscolari di concentrato di acido folico correggevano questa sindrome citopenica che insorgeva in scimmie a dieta carente di complesso B; e Saslaw, Schwab, Woolpert e Wilson (<sup>28</sup>) misero in evidenza che queste scimmie carenti presentavano una diminuzione nella resistenza alle infezioni spontanee. Ancora Saslaw, Wilson, Doan e Schwab (<sup>29</sup>) produssero una carenza di vitamina M aggiungendo alla dieta priva di complesso B tutti i fattori noti, ed ottennero non costantemente anemia, ma sempre leucopenia che veniva curata con la somministrazione di acido folico. Waisman, Rasmus-

(<sup>22</sup>) J. Biol. Chem., 155, 361 (1944).

(<sup>23</sup>) Proc. Nat. Acad. Sc., 27, 1 (1941).

(<sup>24</sup>) J. Biol. Chem., 149, 573 (1943).

(<sup>25</sup>) J. Nutrition, 9, 637 (1935).

(<sup>26</sup>) J. Exper. Med., 68, 923 (1938).

(<sup>27</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 50, 341 (1942).

(<sup>28</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 51, 391 (1942).

(<sup>29</sup>) Science, 97, 514 (1943).

sen, Elvehjem e Clark (<sup>30</sup>) confermarono l'efficacia del fegato e dell'estratto di lievito; e Waisman ed Elvehjem (<sup>31</sup>) osservarono la guarigione con una frazione di fegato eluita da norite che conteneva acido folico.

Altri autori (<sup>32-33</sup>) indagarono sulla attività biologica della xantopterina nella sindrome anemico-leucopenica da carenza di vitamina M nelle scimmie, ottenendo risultati incostanti e non dimostrativi, e giungendo alla conclusione che da sola la xantopterina non ha la azione completa della vitamina M, che soltanto è capace di ritardare l'insorgenza della sindrome. Totter, Mims e Day (<sup>34</sup>), paragonando il contenuto di acido folico con l'attività antianemica di alcune sostanze nella scimmia, si accorsero che la quantità di acido folico misurata secondo il test s. lactis R., rendeva conto solo in parte della attività di queste sostanze, mentre i dati si facevano più concordanti qualora tali sostanze venissero incubate con fegato fresco di ratto prima di essere saggiate con s. lactis R. Day, Mims, Totter, Stokstad, Hutchings e Sloan (<sup>35</sup>) ottennero la guarigione della sindrome anemico-leucopenica della scimmia con la somministrazione di fattore l. casei assai purificato. Questi risultati furono confermati da Day, Mims e Totter (<sup>36</sup>).

Un altro degli animali che servì per le ricerche in questo campo è il pulcino. Studiando il fabbisogno alimentare di questo animale, Stockstad e Manning (<sup>37</sup>) dimostrarono fin dal 1938 che per il normale accrescimento di esso, oltre i fattori fino allora conosciuti, era necessario un principio contenuto nel lievito, nell'alfalfa e nella cuticola del grano, a cui essi assegnarono il nome di fattore U. Successivamente Hogan e Parrot (<sup>38-39</sup>) determinarono nel pulcino una anemia ipercromica macrocitica associata ad un ritardo dello sviluppo corporeo e che veniva prevenuta e

(<sup>30</sup>) J. Nutrition, 26, 205 (1943).

(<sup>31</sup>) J. Nutrition, 26, 361 (1943).

(<sup>32</sup>) TOTTER, SHUKERS, KOLSON, MIMS e DAY, Fed. Proc., 2, 72 (1943).

(<sup>33</sup>) TOTTER, SHUKERS, KOLSON, MIMS e DAY, J. Biol. Chem., 152, 147 (1944).

(<sup>34</sup>) Science, 100, 223 (1944).

(<sup>35</sup>) J. Biol. Chem., 157, 423 (1945).

(<sup>36</sup>) J. Biol. Chem., 161, 45 (1945).

(<sup>37</sup>) J. Biol. Chem., 125, 687 (1938).

(<sup>38</sup>) J. Biol. Chem., 128, Ivi (1939).

(<sup>39</sup>) J. Biol. Chem., 132, 507 (1940).

guarita con la somministrazione di un estratto di fegato idrosolubile che essi ritenevano contenere un principio attivo al quale diedero il nome di vitamina Bc dall'iniziale del nome inglese dell'animale sperimentato (chick = pulcino); Stokstad, Manning e Rogers (<sup>40</sup>), e Schumacher, Heuser e Norris (<sup>41</sup>) dimostrarono, per il normale sviluppo del pulcino, l'efficacia anche degli estratti di lievito.

Nel 1941, finalmente, Hutchings, Bohonos, Hegsted, Elvehjem e Peterson (<sup>42</sup>) prepararono un concentrato ad alta attività per il l. casei che si dimostrò efficace per prevenire e curare questa forma di avitaminosi del pulcino; l'identità della vitamina Bc e del fattore l. casei fu ulteriormente dimostrata da Mills, Briggs, Elvehjem e Hart (<sup>43</sup>).

O'Dell e Hogan (<sup>44</sup>) studiarono la composizione delle diete e misero in evidenza la necessità di moderare in esse i quantitativi di piridossina che ritenevano favorire la sintesi intestinale batterica del principio attivo; nel loro lavoro misero in evidenza che la vitamina Bc può essere immagazzinata nell'uovo se le galline vengono nutriti con dieta ricca di essa, e riconobbero ad essa alcune proprietà chimiche strettamente simili a quelle trovate per i vari fattori di crescita. Ulteriori ricerche dal punto di vista fisico furono compiute da Pfiffner, Binkley, Bloom, Brown, Bird, Emmett, Hogan e O'Dell (<sup>45</sup>) su di un prodotto cristallino isolato dal fegato del quale avevano sperimentato l'efficacia come vitamina Bc, e del quale stabilirono l'identità con il fattore di eluizione di Peterson (<sup>4</sup>) e con l'acido folico di Williams (<sup>7</sup>); conclusioni che furono confermate da Campbell, Brown, Raymond ed Emmett (<sup>46</sup>) e da Bloom, Van den Belt, Binkley, O'Dell e Pfiffner (<sup>47</sup>) sulla scorta di più approfondite indagini chimico fisiche e biologiche.

Binkley, Bird, Bloom, Brown, Calkins, Campbell, Emmett e Pfiffner (<sup>48</sup>) stabilirono che anche gli estratti di lievito avevano una grande

(<sup>40</sup>) J. Biol. Chem., 132, 463 (1940).

(<sup>41</sup>) J. Biol. Chem., 135, 313 (1940).

(<sup>42</sup>) J. Biol. Chem., 140, 681 (1941).

(<sup>43</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 49, 186 (1942).

(<sup>44</sup>) J. Biol. Chem., 149, 323 (1943).

(<sup>45</sup>) Science, 97, 404 (1943).

(<sup>46</sup>) J. Biol. Chem., 152, 483 (1944).

(<sup>47</sup>) Science, 100, 295 (1944).

(<sup>48</sup>) Science, 100, 36 (1944).

attività come vitamina Bc, senonchè il potere stimolante la crescita dei batteri non corrispondeva che al 2-5% di questa attività. Il potere stimolante la crescita dei batteri veniva acquistato integralmente da questi estratti quando essi erano sottoposti a digestione enzimatica. Cristallizzando questo prodotto di digestione si otteneva un composto ugualmente attivo per il *L. casei* e per lo *S. lactis* R e che presentava caratteri fisici chimici e biologici del tutto simili alla vitamina Bc ottenuta per cristallizzazione dagli estratti epatici; tali osservazioni suggerirono agli autori che l'attività della vitamina Bc dell'estratto del lievito fosse dovuta ad una sostanza relativamente semplice, non proteica, coniugata della vitamina. Su questo prodotto cristallino le ricerche furono riprese da Pfiffner, Calkins, O'Dell, Bloom, Campbell e Bird (<sup>49</sup>) che paragonarono le proprietà fisiche della vitamina Bc cristallina e del suo coniugato estratto dal lievito e che riuscirono ad isolare dal rene di maiale un enzima che chiamarono coniugase della vitamina Bc, capace di trasformare il coniugato nella forma attiva. Ulteriori interessanti ricerche su questa azione enzimatica furono compiute da Bird, Binkley, Bloom, Emmet e Pfiffner (<sup>50</sup>) e da Bird, Bressler, Brown, Campbell ed Emmett (<sup>51</sup>).

Successivamente nel 1944 Hutchings, Stokstad, Bohonos e Slobodkin (<sup>52</sup>) isolarono in forma cristallina con la purificazione del filtrato di colture di *Corynebacterium Hoffmann* in fermentazione aerobica, un nuovo composto attivo per il *L. casei*, meno per lo *S. lactis*, avente anche attività di vitamina Bc, e sulla scorta di dati spettrografici conclusero che tale composto era differente dall'acido folico di Mitchell e Williams, e lo denominarono «fattore di fermentazione». Così pure furono trovati nel fegato da Briggs, Luckey, Elvehjem ed Hart (<sup>53</sup>) due fattori necessari per la crescita del pulcino di cui uno necessario per la crescita del piu-maggio, l'altro per il suo accrescimento, che furono designati vitamina B<sub>10</sub> e B<sub>11</sub> e che, saggiati con i tests microbiologici, apparvero differenti dall'acido folico.

(<sup>49</sup>) Science, 102, 228 (1945).

(<sup>50</sup>) J. Biol. Chem., 157, 413 (1945).

(<sup>51</sup>) J. Biol. Chem., 159, 631 (1945).

(<sup>52</sup>) Science, 99, 371 (1944).

(<sup>53</sup>) J. Biol. Chem., 148, 163 (1943).

Hill, Norris ed Heuser (<sup>54</sup>) confermarono d'altra parte le precedenti ricerche di Schumacher, Heuser e Norris (<sup>41</sup>) sulla esistenza di due fattori di crescita del pulcino R ed S estratti dal lievito. Sulla identità di questi con la vitamina B<sub>10</sub> e B<sub>11</sub> non si è avuta conferma.

Alla fine del 1945 Angier ed un folto gruppo di collaboratori (<sup>55</sup>), ottennero sinteticamente un composto ugualmente attivo per lo *s. lactis* R e per il *l. casei*, che era efficace nel promuovere la crescita e la formazione di emoglobina nel pulcino, che gli autori ritenevano identico al fattore *l. casei* cristallino precedentemente isolato dal fegato; questo lavoro è di fondamentale importanza perchè è il primo che, sia pure in forma non completamente sicura, fa luce sulla struttura molecolare di questi nuovi fattori.

Da tutte queste ricerche risulta chiaro che per il normale sviluppo ematico e somatico del pulcino è necessario più di un fattore. Questo è stato confermato da recenti ricerche di Scott e coll. (<sup>56-57</sup>) i quali, dopo aver notato che l' $\alpha$ -piracina o il suo isomero  $\beta$ -piracina promuovevano la crescita e combattevano l'anemia del pulcino, osservarono che aggiungendo ad una dieta carente il solo fattore *l. casei* si aveva miglioramento ematologico ma persistenza di una anemia normocitica ipocromica, mentre, con la sola  $\beta$ -piracina, persisteva una anemia a tipo macrocitico normocromico. Ulteriori ricerche di Scott, Norris ed Heuser (<sup>58</sup>) provarono che le piracine hanno azione soprattutto sulla produzione di emoglobina.

Per quello che riguarda il ratto si hanno le prime notizie nel 1933 ad opera di Parsons e coll. (<sup>59</sup>), i quali osservarono una forma di anemia ipocromica a seguito di una dieta lattea, guaribile con somministrazione di lievito. Altre ricerche eseguite da György, Goldblatt, Miller e Fulton (<sup>60</sup>) nel 1937 dimostrarono che la trombocitopenia, agranulocitosi e

(<sup>54</sup>) *J. Nutrition*, 28, 175 (1944).

(<sup>55</sup>) ANGIER, BOOTHE, HUTCHINGS, MOWAT, SEMB, STOKSTAD, SUBBAROW, WALLER, COSULICH, FAHRENBACH, HULTQUIST KUK, NORTHEY, SUGAR, SICKELS, SMITH, *Science*, 102, 227 (1945).

(<sup>56</sup>) SCOTT, NORRIS, HEUSER, COOVER, BELLAMY, GUNSAULUS, *J. Biol. Chem.* 154, 713 (1934).

(<sup>57</sup>) SCOTT, NORRIS, HEUSER, BRUCE, *J. Biol. Chem.*, 158, 291 (1945).

(<sup>58</sup>) *Science*, 103, 33 (1946).

(<sup>59</sup>) *Arch. Dis. Child.*, 8, 95 (1933).

(<sup>60</sup>) *J. Exper. Med.*, 66, 579 (1937).

anemia che si sviluppavano nei ratti a dieta carente di vitamina B<sub>6</sub>, non erano modificabili dall'apporto di questo fattore, ma avevano bisogno della sostanza eluita di Peter; ed altre ancora della stessa epoca di Tschesche e Wolf (<sup>61</sup>) dimostrarono che la xantopterina e altre pterine avevano una azione antianemica in ratti con anemia da latte di capra. Studiando la carenza da acido pantotenico Unna, Richards e Sampson (<sup>62</sup>) trovarono che ratti a dieta carente di esso, di biotina e di acido folico, presentavano acromotrichia, ritardo della crescita, infiammazione del naso ed emorragie surrenali; questi risultati furono confermati da Martin (<sup>63</sup>) che, aggiungendo alla dieta 1-2% di sulfaguanidina, notò che l'acido pantotenico impediva l'insorgenza di questi sintomi, ma che fegato e lievito erano più efficaci. Sempre a proposito di questo argomento Nielson ed Elvehjem (<sup>64</sup>), osservarono che la biotina da sola dava scarsa crescita, mentre il concentrato di acido folico provocava risultati definitivi. Welch e Wright (<sup>65-66</sup>) confermarono in ratti alimentati con le stesse diete purificate e addizionate con tutti i fattori dietetici conosciuti, ai quali si somministrava contemporaneamente succinilsulfatiazolo, la inibizione della crescita, riferendo inoltre che si produceva un aumento del tempo di coagulazione: questi sintomi venivano curati con l'aggiunta di acido folico e biotina.

Lo sviluppo di agranulocitosi, leucopenia ed ipoplasia del midollo osseo, fu osservato in ratti nutriti con diete purificate addizionate di sulfaguanidina o sulfasuccidina, da Spicer, Daft, Sebrell e Ashburn (<sup>67</sup>) che ottennero una remissione dei sintomi con estratti di fegato. Kornberg, Daft e Sebrell (<sup>68</sup>) ottenevano la guarigione con certe frazioni di fegato nelle quali si sapeva esser contenuto il fattore I. casei, mentre Daft e Sebrell (<sup>69</sup>) ebbero degli insuccessi con la xantopterina e dei successi con

(<sup>61</sup>) Ztschr. f. Physiol. Chem., 248, 34 (1937).

(<sup>62</sup>) J. Nutrition, 22, 553 (1941).

(<sup>63</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 51, 353 (1942).

(<sup>64</sup>) J. Biol. Chem., 145, 713 (1942).

(<sup>65</sup>) J. Nutrition, 25, 555 (1943).

(<sup>66</sup>) WRIGHT e WELCH, Science, 97, 426 (1943).

(<sup>67</sup>) Pub. Health Rep., 57, 1559 (1942).

(<sup>68</sup>) Science, 98, 20 (1943).

(<sup>69</sup>) Pub. Health, Rep., 58, 1542 (1942).

acido folico. Axelrod, Gross, Bosse e Swingle (<sup>70</sup>) saggiarono con esito positivo sia il fattore eluito da norite che il fegato intero, e Ransone e Elvehjem (<sup>71</sup>) dimostrarono l'efficacia dell'acido folico e del concentrato di fegato nonché della biotina se somministrata insieme a quantità sia pure minime di concentrato e di estratto di fegato; la xantopterina, invece, non dimostrava attività.

Mallory, Mims, Totter e Day (<sup>72</sup>), sperimentando estratti e concentrati di lievito, osservarono che non esisteva una relazione tra la loro efficacia sulla sindrome da carenza del ratto e la loro attività come fattore s. lactis R, ma che, quando l'attività nei ratti era espressa come « valore potenziale » di fattore s. lactis R, si otteneva una stretta concordanza: questo fatto dimostrava l'esistenza di una stretta affinità tra vitamina M e fattore antagonista all'effetto della sulfonamide nel ratto, per l'analogia tra i risultati di questo lavoro e quelli, già ricordati, del lavoro di Totter, Mims e Day (<sup>34</sup>). Contemporaneamente Wright e Welch (<sup>73</sup>), studiando il contenuto di biotina e di acido folico negli organi di ratti carenti, osservarono che questi erano molto più poveri delle sostanze in esame che non quelli dei ratti a dieta normale e notarono che la diminuzione era molto più evidente quando alla dieta carente si aggiungeva succinilsulfatiazolo, mentre la somministrazione di biotina e concentrati di acido folico riportavano l'ammontare di questi fattori, e così pure dell'acido pantotenico, anche del quale si era osservata una diminuzione, a valori normali. Gli stessi autori (<sup>74-75-76</sup>), in successive osservazioni, notarono che la somministrazione di quantità più elevate di sulfamidici non induceva segni di carenza, ma chiarirono in seguito che la ragione di questa apparente contraddizione consisteva nel fatto che il latte contiene notevoli quantità di acido folico potenziale. Altri autori: Endicott, Kornberg e Daft (<sup>77</sup>), e

(<sup>70</sup>) J. Biol. Chem., 148, 721 (1943).

(<sup>71</sup>) J. Biol. Chem., 151, 109 (1943).

(<sup>72</sup>) J. Biol. Chem., 156, 317 (1944).

(<sup>73</sup>) J. Nutrition, 27, 55 (1944).

(<sup>74</sup>) WELCH e WRIGHT, Science, 100, 153 (1944).

(<sup>75</sup>) WRIGHT, SKEGGS, WELCH, SPRAGUE, MATTIS, J. Nutrition, 29, 289 (1945).

(<sup>76</sup>) WRIGHT, SKEGGS, WELCH, Arch. Biochem., 6, 15 (1945).

(<sup>77</sup>) Pub. Health. Rep., 59, 49 (1944).

Gross, Axelrod e Bosse (<sup>78</sup>) verificarono la sindrome da dieta carente con aggiunta di sulfamide, trovando sempre lesioni nel midollo osseo e nel sangue periferico; e Kornberg, Daft e Sebrell (<sup>79</sup>) poterono sperimentalmente dimostrare infondata la supposizione che i sulfamidici intervenissero con la loro tossicità nella produzione della sindrome da carenza di acido folico nel ratto. Kornberg, Tabor e Sebrell (<sup>80</sup>), e Higgins (<sup>81</sup>) studiarono morfologicamente nel sangue le alterazioni da carenza; mentre Carter, Mac Farlane, O'Brien, Robb-Smith e Amos (<sup>82</sup>), dopo aver descritto una anemia di origine alimentare nel ratto, che si differenzia morfologicamente da quella successiva a carenza di acido pantotenico e si produce anche somministrando questa vitamina, credettero di poter concludere che questa anemia fosse dovuta a carenza di acido folico.

Wintrobe, Samter e Lisco (<sup>83</sup>) dimostrarono fin dal 1939 nei giovani maiali l'insorgenza di una grave anemia con una dieta purificata contenente tutti i fattori allora conosciuti del complesso B, che guariva con la somministrazione di lievito.

Anche nella cavia ad opera di Woolley (<sup>84</sup>), e di Woolley e Sprin-  
ce (<sup>85-86</sup>); e nel topolino albino ad opera di Nielson e Black (<sup>87</sup>), sono state descritte sindromi riferibili alla carenza di acido folico.

Interessante, per gli ulteriori sviluppi che potrebbero avere queste ricerche, il lavoro di Leuchtenberger R., Leuchtenberger C., Laszlo e Lewisohn (<sup>88</sup>) sulla regressione del cancro spontaneo della mammella nel topolino, in seguito a somministrazione di fattore I. casei, sebbene ulteriori ricerche degli stessi autori (<sup>89</sup>) abbiano messo in evidenza l'inattività

(<sup>78</sup>) Am. J. M. Sc., 208, 642 (1944).

(<sup>79</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 58, 46 (1945).

(<sup>80</sup>) Am. J. Physiol., 142, 604 (1944).

(<sup>81</sup>) Proc. Staff Meet. Mayo Clin., , 19 (1944).

(<sup>82</sup>) Biochem. J., 39, 339 (1945).

(<sup>83</sup>) Bull. John Hopkins Hosp., 64, 399 (1939).

(<sup>84</sup>) J. Biol. Chem., 143, 679 (1942).

(<sup>85</sup>) J. Biol. Chem., 153, 687 (1944).

(<sup>86</sup>) J. Biol. Chem., 157, 447 (1945).

(<sup>87</sup>) J. Nutrition, 28, 203 (1944).

(<sup>88</sup>) Science, 101, 46 (1945).

(<sup>89</sup>) LEWISOHN, LEUCHTENBERGER C., LEUCHTENBERGER R., KÈRÈSZTÉSY, Science, 104, 463 (1946).

dell'acido pteroil-glutamico sintetico. Pure interessante il lavoro di Hertz e Sebrell (<sup>90</sup>) sui rapporti tra fattore l. casei e stilbestrolo, che mettono in evidenza che un adeguato apporto del fattore è necessario per il normale metabolismo dello stibestrolo nel pulcino.

Krehl ed Elvehjem (<sup>91</sup>) ottennero una carenza probabilmente di acido folico anche nel cane; e d'altra parte Michaud, Maas, Ruegamer ed Elvehjem (<sup>92</sup>), dimostrarono che in questo animale i sulfamidici non hanno nessuna azione nel provocare una carenza di acido folico.

Anche nel campo degli invertebrati è stata dimostrata l'importanza dell'acido folico come fattore di crescita, ad opera di Tatum (<sup>93</sup>) per le larve di *Drosophila melanogaster*; di Golberg, De Meillon e Lavoipierre (<sup>94</sup>) per le larve di *Aedes aegypti* L; e di Kidder (<sup>95</sup>) e di Kidder e Dewey (<sup>96</sup>) per le larve di *Tetrahymena geleii* W.

Per quello che riguarda l'efficacia terapeutica di questo gruppo di principi nel campo della patologia umana, ricordiamo che fin dal 1931 Wills (<sup>97</sup>) dimostrò l'attività curativa di un estratto di lievito nell'anemia macrocritica gravidica, che si verifica comunemente in India; e lo stesso Wills ed Evans (<sup>98</sup>), essendo occorsi alla loro osservazione dei casi di anemia macrocritica tropicale che non rispondevano alla terapia con estratti epatici assai purificati, ne dedussero essere probabile l'esistenza di un nuovo fattore emopoietico contenuto nel fegato bruto e negli estratti autolisati di lievito, che non era possibile identificare con i fattori già noti del complesso B essendo presente nel filtrato di lievito su terra di folleni. Questa induzione fu confermata da diversi autori (<sup>99-100-101</sup>) che riconobbero nell'anemia gravidica l'efficacia di estratti di lievito e di fegato in-

(<sup>90</sup>) Science, 100, 293 (1944).

(<sup>91</sup>) J. Biol. Chem., 158, 173 (1945).

(<sup>92</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 56, 148 (1944).

(<sup>93</sup>) Proc. Nat. Acad. Sc. Wash., 27, 193 (1941).

(<sup>94</sup>) J. Exper. Biol., 21, 90 (1945).

(<sup>95</sup>) Arch. Biochem., 9, 51 (1946).

(<sup>96</sup>) Proc. Nat. Acad. Sc., 33, 95 (1947).

(<sup>97</sup>) Brit. M. J., 1, 1059 (1931).

(<sup>98</sup>) Lancet, 2, 416 (1938).

(<sup>99</sup>) MILLER e STUDDERT, Lancet, 2, 332 (1942).

(<sup>100</sup>) DAVIDSON, DAVIS, INNES, Brit. M. J., 2, 31 (1942).

(<sup>101</sup>) FULLERTON, Brit. M. J., 1, 158 (1943).

tero, mentre estratti di fegato altamente purificati spesso non erano sufficienti a riportare alla norma il quadro ematico.

Watson e Castle (<sup>102</sup>) osservarono a questo proposito, in tre casi di anemia ipercromica macrocitica da carenza alimentare, l'efficacia di estratti epatici somministrati oralmente, dopo l'insuccesso della somministrazione di essi per via parenterale, ciò che dimostrava sicuramente in queste forme la carenza di una sostanza differente da quella efficace per l'anemia perniciosa.

Era logico che, sulla base delle osservazioni sopradescritte e dei risultati sperimentali ottenuti con la somministrazione di acido folico in diverse specie di animali che presentavano quadri di anemia ipercromica e di leucopenia, queste sostanze venissero provate in soggetti umani affetti da manifestazioni ematologiche simili. Così Sharp, Vonder-Heide e Wolters (<sup>103</sup>) ottennero dei risultati non del tutto probanti studiando l'azione antianemica della cosiddetta vitamina Bc in soggetti che non rispondevano ai comuni preparati antianemici, e Berry, Spies e Doan (<sup>104</sup>) ottennero un transitorio miglioramento nella leucopenia da carenze multiple del complesso B, che si osserva negli stati del Sud degli Stati Uniti, analoga alla deficienza in vitamina M delle scimmie, con acido folico e con fattore *l. casei* sintetico; questi risultati furono confermati da Watson, Sebrell, Mc Kelvey, Daft e Hawkinson (<sup>105</sup>) in casi di leucopenia consecutiva ad applicazione dei raggi Roentgen.

Successivi studi di Spies e coll. (<sup>106</sup>) su vari materiali aventi attività di acido folico, dimostrarono finalmente l'efficacia terapeutica del fattore *l. casei* sintetico in casi di anemia macrocitica alimentare, perniciosa e di tipo indeterminato. Moore, Bierbaum, Welch e Wright (<sup>107</sup>) confermarono questi risultati in un lavoro importante perchè in esso riferirono il buon risultato del trattamento con fattore *l. casei* sintetico in un caso di sprue non tropicale. Ulteriori studi sulla sprue non tropicale furono com-

(<sup>102</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 58, 84 (1946).

(<sup>103</sup>) J. A. M. A., 124, 734 (1944).

(<sup>104</sup>) South. M. J., 38, 590 (1945).

(<sup>105</sup>) Am. J. M. Sc., 210, 463 (1945).

(<sup>106</sup>) J. A. M. A., 130, 474 (1946).

(<sup>107</sup>) J. Lab. et Clin. Med., 30, 1056 (1945).

piuti su un numero limitato di casi da Darby e Jones (<sup>108</sup>) e da Darby, Jones e Johnson (<sup>109</sup>) che ottennero anche essi probanti risultati con la somministrazione di fattore l. casei sintetico.

Per quello che riguarda la sprue tropicale Spies, Lopez, Menendez, Minnich e Koch (<sup>110</sup>) dimostrarono l'attività in questa sindrome dell'acido folico sintetico; e successivamente Spies (<sup>111-112</sup>) in due esaurienti pubblicazioni stabilì l'efficacia terapeutica del fattore l. casei sintetico in vari tipi di anemia macrocitica: alimentare; perniciosa Addisoniana; sprue; della gravidanza; associata ad alcoolismo cronico, cirrosi epatica e neurite; da carcinoma gastrico e ad etiologia indeterminata.

Le successive ricerche furono eseguite sperimentando con il fattore sintetico isolato da Angier e coll. (<sup>113</sup>) al quale, dopo il riconoscimento della sua struttura chimica, era stato assegnato il nome di acido pteroileglutamico. A questo è stata concordemente riconosciuta una azione normalizzatrice sulla maturazione degli elementi della serie mieloide, e quindi la sua efficacia nelle malattie nelle quali viene usato il trattamento con gli estratti epatici; mentre invece in alcune anemie macrocistiche secondarie (a nefrite cronica e a tumori maligni), come pure nelle anemie normoblastiche normocitiche e in quelle ferriprive la sua azione è nulla.

Granulocitopenia e agranulocitosi sono influenzate dalla somministrazione di acido folico solo se di origine carenziale (<sup>114</sup>).

Numerose ricerche (<sup>115-116-117</sup>) hanno dimostrato che i coniugati del-

(<sup>108</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 60, 259 (1945).

(<sup>109</sup>) Science, 103, 108 (1946).

(<sup>110</sup>) South. M. J., 39, 30 (1946).

(<sup>111</sup>) Lancet, 1, 225 (1946).

(<sup>112</sup>) J. A. M. A., 130, 474 (1946).

(<sup>113</sup>) ANGIER, BOOTHE, HUTCHINGS, MOWATT, SEMB, STOKSTAD, SUBBAROW, WALLER, COSULICH, FAHRENBACH, HULTQUIST, KUK, NORHEY, SEEGER, SICKELS, SMITH, Science, 103, 667 (1947).

(<sup>114</sup>) DOAN, Am. J. Med. Sc., 212, 257 (1946).

(<sup>115</sup>) WELCH, HINLE, NELSON E. M., NELSON H. V., J. Biol. Chem., 164, 787 (1946).

(<sup>116</sup>) SUAREZ, WELCH, HEINLE, SUAREZ JR., NELSON, J. Lab. et Clin. Med. 31, 1294 (1946).

(<sup>117</sup>) BETHELL, MEYERS, ANDREWS, SWENDSEID, BIRD, BROWN, J. Lab. et Clin. Med., 32, 3 (1947).

l'acido pteroil-glutamico non hanno alcuna efficacia nel trattamento della sprue tropicale. Per quello che riguarda l'anemia perniciosa, la via di somministrazione dell'acido pteroil-glutamico è indifferentemente quella orale e quella parenterale, le dosi si aggirano dai 10 ai 20 mg al giorno per via parenterale e da 15 a 20 mg al dì per via orale (<sup>112-117-119-120-121-122-123-124-126-127-128</sup>). Con queste dosi, che vanno continue fino alla normalizzazione del quadro ematico, e poi sostituite con dosi di mantenimento di 100-200 mg ogni 7-21 giorni, si ottiene un decorso parallelo a quello che segue il trattamento epatico per ciò che riguarda le condizioni generali, il quadro ematico periferico, l'aspetto dello striscio midollare, la glossite, la diarrea se presente, i sintomi cutanei e la concentrazione nel sangue dei pigmenti derivanti dal ricambio emoglobinico (<sup>112</sup>), mentre l'achilia non viene modificata (<sup>119</sup>), e i sintomi neurologici, se presenti, non risentono alcun miglioramento (<sup>126-129</sup>).

Senonchè una analisi più approfondita dei risultati ottenuti con il trattamento con acido pteroil-glutamico, mette in evidenza che, pur ottenendosi una normale crisi reticolocitaria, la risposta ad esso non è mai ottimale (<sup>130</sup>) e raramente si riesce a portare il numero dei globuli rossi al di sopra dei quattro milioni ed il valore globulare alla unità. Risultati completi si ottengono invece con la somministrazione contemporanea di acido pteroil-glutamico e di dosi subliminali di estratto epatico (<sup>130</sup>); questo

(<sup>118</sup>) WELCH, Science, 98, 179 (1943).

(<sup>119</sup>) WILKINSON, ISRAEL, FLETCHER, Lancet, 2, 156 (1946).

(<sup>120</sup>) SPIES, VILTER, KOCH, CALDWELL, Sout. Med. J., 38, 707 (1945).

(<sup>121</sup>) MOORE, BIERBAUM, WELCH, WRIGHT, J. Lab. et Clin. Med., 30, 1056 (1945).

(<sup>122</sup>) SPIES, Lancet, 1, 225 (1946).

(<sup>123</sup>) SPIES, J. A. M. A., 130, 474 (1946).

(<sup>124</sup>) BETHELL, SWENDSEID, BIRD, MAYERS, ANDREWS, BROWN, Univ. Hosp. Bull. Ann. Arbor, 12, 42 (1946).

(<sup>125</sup>) Arch. Biochem., 12, 310 (1947).

(<sup>126</sup>) MOORE, Comunicazione alla riunione annuale della Soc. di Medicina del WISCONSIN. Citato in STEFANINI, Clinica Nuova, 4, 25 (1947).

(<sup>127</sup>) KRACKE e RISER, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 64, 179 (1947).

(<sup>128</sup>) GOLDSMITH, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 64, 115 (1947).

(<sup>129</sup>) VILTER C. F., VILTER R. W., SPIES, Proc. Cent. Clin. Research, 19, 26 (1946).

(<sup>130</sup>) MEYER, Blood, 2, 50 (1947).

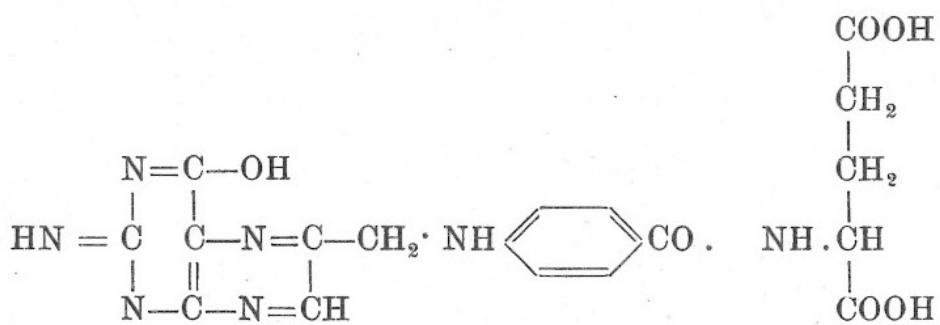
tipo di trattamento viene particolarmente consigliato per i soggetti diventati allergici all'estratto epatico.

L'efficacia dell'acido pteroil-glutamico è stata anche dimostrata in altre forme di anemia, come quella da resezione di tratti del tubo digerente (<sup>124-130</sup>); in una particolare anemia macrocitica degli infanti di probabile origine carenzziale (<sup>131-132</sup>); e nel morbo celiaco dei bambini (<sup>133-134</sup>), ed è stata inoltre sperimentata in casi di diarrea cronica e di sensibilizzazione da allergeni alimentari.

Come risulta dalla precedente esposizione, il problema è molto complesso, sia per il numero delle sostanze attive che sono state volta a volta sperimentate, sia per la difficoltà di stabilire dei rapporti ben definiti fra di esse; a questo proposito ci sembra utile riportare la tabella I, che è stata compilata da Berry e Spies (<sup>135</sup>) come tentativo di coordinamento delle conoscenze sui vari fattori vitaminici antianemici conosciuti all'epoca della loro pubblicazione, ma è chiaro che solo la identificazione della struttura chimica e la sintesi di queste sostanze possono chiarire definitivamente il complesso problema.

Recentemente sono stati isolati e caratterizzati chimicamente tre fattori che possiedono le proprietà assegnate a questo gruppo di sostanze.

Il fattore l. casei del fegato di Stokstad (15), del quale in un precedente lavoro era stata realizzata la sintesi da Angier e coll. (55), è stato dagli stessi autori (113) identificato strutturalmente come acido N 4 (2 amino-4 idrossi-6 pteridil) metil amino benzoil glutamico o, più brevemente, acido pteroil-glutamico. La formula di struttura sarebbe la seguente:



<sup>(131)</sup> ZUELZER e OGDEN, Am. J. Dis. Child., 71, 211 (1946).

(<sup>132</sup>) ZUELZER, J. A. M. A., 131, 7 (1946).

<sup>(133)</sup> BRODY e GORE, Lancet, II, 618 (1946).

<sup>(134)</sup> DALTON e Coll., Lancet, II, 652 (1946).

(<sup>135</sup>) Blood, I, 271 (1946).

TABELLA I.

I numeri alla voce "riferimento", si riferiscono alla bibliografia riportata nel presente lavoro.

| Nome                                | Sorgente          | Attività biologica  | Natura chimica                                    | Riferimento |
|-------------------------------------|-------------------|---|---|-------------|
| Fattore eluito da norite            | Fegato e lievito  | Fattore di crescita per il <i>L.casei</i> e per lo <i>s.lactis</i>  | Basica, simile alle purine                        | 4           |
| Fattore eluito da norite            | Fegato solubiliz. | Come sopra  | Acida; non un nucleotide                          | 5           |
| Fattore eluito da norite            | Fegato solubiliz. | Come sopra  | Presenza di purina e pirimidina                   | 6           |
| Acido folico                        |                   |   | Non un nucleotide                                 | 7           |
| Fattore <i>s.lactis</i>             | Spinaci           | Come sopra  | Etere metilico del principio attivo               | 14          |
| Fattore <i>L.casei</i> -crystallino | Non stabilita     | Attivo per lo <i>s.lactis</i> . Inattivo per il <i>L.casei</i>  | 15  |             |
| Acido folico                        | Fegato e lievito  | Fattore del fegato attivo per i due microrganismi; fattore del lievito attivo a metà per lo <i>s.lactis</i> | Struttura xantopterino-simile                     | 10,11       |
|                                     | Spinaci           | Come l'acido fonico di sopra  |   | 12,13       |
| Marmite                             | Lievito           | Cura l'anemia alimentare delle scimmie  |   | 1           |
| Vitamina M                          | Fegato e lievito  | Cura la citopenia alimentare delle scimmie  |   | 2,26        |
| Xantopterina                        | Sintetica         | Cura parzialmente la citopenia delle scimmie, cura l'anemia della trota                                     |   | 32,33       |
| Vitamina Bc                         | Fegato            | Cura l'anemia del pulcino   |   | 153         |
| Fattori R ed S                      | Lievito           | Necessari nella nutrizione del pulcino  |   | 39          |
| Vitamina Bc cri-                    | Fegato            | Attiva per il pulcino, il <i>L.casei</i> , lo <i>s.lactis</i>   |   | 41          |
| stallina                            | Lievito digerito  |   | Acida, simile alle flavine, allosozine, e pterine | 45,47       |
| Vitamina Bc cri-                    | Lievito           | Come sopra  | Come sopra  | 48          |
| stallina                            |                   |   |   |             |
| Vitamina Bc cri-                    | Lievito           | Attiva nel pulcino, attività 2-5% per <i>L.ca-</i>  | Come sopra. Molecola 2,8 più grande               | 48,49       |
| stallina coniug.                    |                   | <i>se</i> e <i>s.lactis</i>   |   |             |
| Fattore <i>L.casei</i> cri-         | Non specificata   | Attivo per il <i>L.casei</i> . Inattivo per lo <i>s.lactis</i>  | Spettro di assorbimento uguale al-                | 52          |
| stallino                            |                   |   | l'acido folico                                    |             |
| Vitamina $B_{10}$ e $B_{11}$        | Fegato            | Attiva per il pulcino, inattiva per i batteri   | Pirimidina  | 53,154      |
| Timina                              | Sintetica         | Attiva per lo <i>s.lactis</i>   |   | 155,29      |
| Fattore <i>L.casei</i> cri-         | Sintetica         | Attivo per il pulcino, ratto, scimmia batteri   |   | 55          |
| stallino                            |                   |   |   |             |
| $\alpha$ e $\beta$ -priracina       | Sintetica         | Sintesi dell'emoglobina nel pulcino   |   | 56,57       |
|                                     |                   |   |   | 58          |

che corrisponde alla formula bruta  $C_{19}H_{19}O_6N_7$ ; più recenti studi di degradazione eseguiti da Wittle e coll. (<sup>136</sup>) sembrano essere meglio in accordo con una formula bruta  $C_{21}H_{20}O_6N_8$ . Il fattore l. casei del lievito di Stokstad (<sup>15</sup>), che l'autore riteneva essere differente da quello del fegato, e la vitamina Bc hanno proprietà chimiche, fisiche e biologiche uguali a quelle dell'acido pteroil-glutamico sintetico. Rimane il problema dell'identità dell'acido pteroil glutamico con l'acido folico che Mitchell, Snell e Williams (<sup>10-11</sup>) estraevano dagli spinaci. Sebbene le preparazioni di questi autori abbiano molte proprietà in comune con l'acido pteroil-glutamico, sembra a Pfiffner, Binkley, Bloom e O'Dell (<sup>137</sup>), che nelle piante verdi debbano esistere almeno due fattori di crescita per i batteri, che hanno attività antianemica per il pulcino e che quindi l'acido folico non sia completamente identificabile con l'acido pteroil-glutamico.

Il colore del composto essiccato varia dal giallo limone pallido all'arancione, mentre i cristallini aghiformi isolati sono di colore giallo pallido. Il composto non ha punto di fusione, imbrunisce e carbonizza interno a  $250^\circ$ ; è assai poco solubile in acqua fredda, ma solubile per circa il 0,1% in acqua bollente; poco solubile in alcool metilico, meno ancora in alcool etilico e butilico; insolubile in acetone e cloroformio e relativamente in acido acetico, fenolo e piridina. La sua facile solubilità in acqua con aggiunta di idrato di sodio, ammonio e bario, testimonia della sua natura acida, mentre la natura basica è indicata dalla sua solubilità per aggiunta di acidi minerali. Le soluzioni del prodotto cristallino hanno una debole fluorescenza alla luce ultravioletta (<sup>137</sup>). Secondo ricerche compiute da Stokstad, Fordham e De Grunigen (<sup>138</sup>) viene rapidamente inattivato dalla luce con liberazione di acido para-aminobenzoil-glutamico, privo di azione biologica.

L'azione microbiologica dell'acido pteroil-glutamico si esercita sullo sviluppo delle culture di *lactobacillus casei*, *streptococcus lactis R*, *lactobacillus delbruckii*, *propionebacterium pentosaceum*, *clostridium tetani*, con leggere differenze di intensità e di attività; l'azione biologica riassume quella dei principi attivi che sono stati con esso identificati: stimola

(<sup>136</sup>) Citato in (<sup>137</sup>).

(<sup>137</sup>) J. Am. Chem. Soc., 69, 1476 (1947)

(<sup>138</sup>) J. Biol. Chem., 167, 877 (1947).

la crescita del pulcino e ne previene l'anemia leucotrombocitopenica e la caduta del piumaggio alla dose di 40-100 γ pro die; previene il quadro di avitaminosi M delle scimmie alla dose di 4-5 mg pro die.

Nello stesso lavoro nel quale Angier e coll. (<sup>113</sup>) pubblicavano la sintesi e la struttura chimica dell'acido pteroil-glutamico, veniva annunciato l'isolamento di un composto, il «fattore di fermentazione del *Lactobacillus casei*» di Hutchings e coll. (<sup>52</sup>), che, sottoposto a debole idrolisi alcalina in anaerobiosi, rendeva acido pteroil-glutamico e due equivalenti dell'acido glutamico; composto che in seguito veniva identificato da Lampen e Jones (<sup>139</sup>) come un acido pteroil-diglutamil-glutamico la cui molecola consiste in un nucleo pteroil-glutamico in legame peptidico con una catena peptidica di due residui l(+)acido glutamico. Questo composto fino ad ora è stato identificato solamente con il fattore di fermentazione del *L. casei*. Microbiologicamente stimola lo sviluppo del *L. casei* con una attività pari all'88-90% di quella dell'acido pteroil-glutamico, e dello *S. faecalis R* ma con una attività pari soltanto al 6% dell'acido pteroil-glutamico; biologicamente stimola la normale crescita del pulcino, ma possiederebbe soltanto una limitata attività antianemica nel pulcino e nella scimmia, pure essendo la sua attività biologica assai aumentata dalla digestione enzimatica (<sup>140</sup>). Senonchè studi più recenti di Hutchings, Oleson e Stokstad (<sup>141</sup>) e di Jukes e Stokstad (<sup>142</sup>) hanno dimostrato che l'acido pteroil-diglutamil-glutamico, promuove nei pulcini una normale emopoiesi ugualmente bene che l'acido pteroil-glutamico purchè venga somministrato in quantità equimolecolare.

Il coniugato della vitamina Bc isolato dal lievito allo stato cristallino di Pfiffner e coll. (<sup>62-63</sup>) è stato identificato come acido pteroil-esaglutamil-glutamico da Pfiffner, Calkins, Bloom e O'Dell (<sup>143</sup>), i quali hanno proposto per esso la formula bruta  $C_{49}H_{61}O_{24}N_{13}$  ritenendolo consistere della vitamina in legame peptidico con una catena peptidica di sei residui l(+)acido glutamico. Questo composto si identifica con il fattore U di Stokstad e Manning (<sup>37</sup>) e con la vitamina M. Il pulcino lo può utilizzare al-

(<sup>139</sup>) *J. Biol. Chem.*, **164**, 485 (1946).

(<sup>140</sup>) SCOTT, NORRIS, HEUSER, BRUCE, *J. Biol. Chem.*, **158**, 291 (1945).

(<sup>141</sup>) *J. Biol. Chem.*, **163**, 447 (1946).

(<sup>142</sup>) *J. Biol. Chem.*, **168**, 553 (1947).

(<sup>143</sup>) *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1392 (1946).

trettanto bene che l'acido pteroil-glutamico, il quale viene liberato da esso per azione della coniugase.

Di recente Pfiffner, Binkley, Bloom e O'Dell (<sup>137</sup>) hanno concentrato dal fegato, senza però riuscire ad identificarlo, un composto che possiede le proprietà biologiche della vitamina Bc e che differisce chimicamente da essa, soprattutto per essere labile agli acidi e per la maggiore solubilità dei suoi sali di zinco.

Per il dosaggio dell'acido pteroil-glutamico venivano fino a poco tempo fa usati i metodi microbiologici sul *L. casei* e sullo *S. fecalis R* e ne veniva seggiata l'attività biologicamente sul pulcino. Recentemente Hutchings, Stokstad, Boothe, Mowat, Waller, Angier, Semb e Subbarow (<sup>144</sup>) hanno descritto un metodo chimico per il dosaggio dell'acido pteroil-glutamico.

Nel 1946 Martin, Moss e Avakian (<sup>145</sup>) compiendo ricerche sui fattori contrastanti l'azione biologica dell'acido pteroil-glutamico, prepararono un composto della struttura: acido N 4-4 chinazolin-benzoil-glutamico per condensazione della 4 clorochinazolina con l'acido para-amino-benzoil-glutamico chc, saggiato secondo il test di Mitchell e Snell, dimostrò una attività come fattore di crescita per il *L. casei* pari a 0,1-0,01 di quella dell'acido folico. E' anche noto che, se l'acido pteroil-glutamico viene privato dell'acido 1 (+) glutamico, conserva il potere stimolante la crescita dello *S. lactis*, ma perde la sua attività sul *L. casei* e antianemica sul pulcino. Questo dimostra che ogni alterazione della molecola dell'acido pteroil-glutamico provoca una modificazione profonda nella sua attività, fino alla soppressione completa di essa come avviene per la sua trasformazione in acido para-amino-benzoil-glutamico per azione della luce. Che poi alcuni di questi composti conservino ancora una certa attività sulla crescita dei microrganismi, può essere spiegato con la capacità di questi ad operare una resintesi dell'acido pteroil-glutamico dai composti da esso derivati: questo fatto sarebbe in accordo con la osservazione che per provocare una sindrome da carenza di acido folico nel ratto, è necessario aggiungere alla dieta carente una adeguata dose di un prodotto sulfamidico che, come è noto (<sup>146</sup>), provoca una sterilizzazione del tratto gastro inte-

(<sup>144</sup>) J. Biol. Chem., 168, 705 (1947).

(<sup>145</sup>) J. Biol. Chem., 167, 737 (1947).

(<sup>146</sup>) MARSHALL, BRATTON, WHITE, LICHTFIELD, Bull. John Hopkins, 67, 163 (1947).

stinale di questi animali, rendendo quindi impossibile la sintesi o la liberazione dai coniugati del principio antianemico ad opera dei batteri (<sup>147</sup>).

In relazione alla utilizzazione nella pratica terapeutica dell'acido pteroil-glutamico, Harned, Cunningham, Smith e Clark (<sup>148</sup>) hanno indagato sulla sua tossicità negli animali, giungendo alla conclusione che la sua tossicità acuta e cronica sono trascurabili; l'esperienza clinica ha del resto confermato l'assoluta innocuità del preparato (<sup>112-126-149</sup>) e la sua incapacità a provocare sensibilizzazione (<sup>112</sup>).

Le sorgenti naturali dell'acido pteroil glutamico e dei composti coniugati sono principalmente i vegetali freschi; le foglie verdi tra cui specialmente ricche lo spinacio e l'alfalfa; il lievito. Anche le carni ne contengono una notevole quantità: Schweigert, Pollard ed Elvehjem (<sup>150</sup>) determinandone la quantità in γ per 100 di peso, ne hanno trovati da 14 a 33 nel muscolo di vitello e di bue, da 7 a 14 in quello di agnello e maiale, da 39 a 150 nel fegato di agnello, bue e maiale, da 30 a 43 nel rene di vitello e di bue, da 11 a 13 nel cuore di vitello e nel cervello di bue.

Cheldelin, Woods e Williams (<sup>151</sup>) hanno stabilito che la conservazione delle carni in ghiacciaia a —4° non distrugge l'attività dell'acido pteroil-glutamico, mentre la cottura, tranne che nel fegato, ne provoca la distruzione, cosicchè rimane inattivato dal 46 al 95%. Nella distribuzione di questi fattori in natura vi è una prevalenza dei più complessi, soprattutto dell'acido pteroil-esaglutamil-glutamico e degli altri coniugati, mentre l'acido pteroil-diglutamil-glutamico è scarsamente distribuito (<sup>152</sup>).

Poichè è noto che nell'uomo l'acido pteroil-esaglutamil-glutamico è inefficace nel trattamento dell'anemia perniciosa (<sup>115</sup>), è evidente che nell'organismo questo composto debba subire una scissione in modo che la vitamina attiva venga liberata. Nei lavori sopra citati (<sup>152-115</sup>), si dimostrò che l'incubazione in vitro di coniugati con succo gastrico di uomo sano

(<sup>147</sup>) MITCHELL e ISBELL, Univ. Tex. Public., 125, 4237 (1942).

(<sup>148</sup>) N. Y. Acad. Sc., 29 maggio 1946, citato in (<sup>126</sup>).

(<sup>149</sup>) Citato in (<sup>123</sup>).

(<sup>150</sup>) Arch. Biochem., 10, 107 (1946).

(<sup>151</sup>) J. Nutrition, 26, 477 (1943).

(<sup>152</sup>) SWENDSEID, BIRD, BROWN, BETHELL, J. Lab. et Clin. Med., 140, 679 (1941).

(<sup>153</sup>) SIMMONS e NORRIS, J. Biol. Chem., 140, 679 (1941).

(<sup>154</sup>) BRIGGS, LUCKEY, ELVEHYEM, HART, J. Biol. Chem., 140, 679 (1941).

non determina liberazione di acido pteroil-glutamico, e poichè, come dimostra la sua efficacia nella sprue, il coniugato viene assorbito regolarmente anche in condizioni di transito accelerato nel tubo digerente, tutto lascia pensare che l'assorbimento dei coniugati avvenga attraverso la parete intestinale senza che essi vengano modificati dai succhi digerenti. Probabilmente la liberazione dell'acido pteroil-glutamico dai suoi coniugati avviene a livello dei tessuti. Fin dal 1945 Laskowsky, Mims e Day (<sup>19</sup>) hanno descritto un enzima capace di liberare il fattore stimolante la crescita dello *s. lactis* R da un suo precursore nel fegato, enzima che ha una distribuzione assai generalizzata negli organi e nei tessuti di vari animali, ed al quale è stato assegnato il nome di coniugase della vitamina Bc per la sua proprietà di liberare questa vitamina dal suo coniugato (<sup>50</sup>). Fegato, rene ed intestino di maiale e pancreas di pollo sono tra gli organi più ricchi dell'enzima (<sup>18-19</sup>).

Dai risultati dei lavori pubblicati sembrerebbe dimostrata l'esistenza di almeno due coniugase, una di queste, studiata da Mims e Laskowsky (<sup>156-157</sup>) che ne hanno stabilito anche l'unità di attività, è stata ottenuta in forma assai purificata dal pancreas di pollo, ha una attività ottimale a Ph 7 e viene attivata dal CaCl<sub>2</sub>; l'altra, studiata da Bird, Binkley, Bloom e Pfiffner (<sup>50</sup>), si ottiene soprattutto dal rene di maiale e da mandorle e patate, ma in forma assai meno purificata, ha una attività ottimale a Ph 4,5 e non viene attivata dal CaCl<sub>2</sub>. Dato che l'azione di questi enzimi sembra limitarsi alla rottura del legame peptidico senza una successiva idrolisi dell'estere metilico dell'acido pteroil-esaglutamil-glutamico, essi dovrebbero essere classificati tra le carbossipeptidasie.

Come avviene generalmente per tutte le vitamine idrosolubili, gli acidi pteroilglutaminici vengono scarsamente immagazzinati nei vari organi; per quanto riguarda il pulcino, Moore, Lepp, Luckey, Elvehjem e Hart (<sup>158</sup>) hanno trovato che il fegato ne è il più ricco, vengono poi rene, pancreas, testicoli, milza, cervello, cuore, polmone, muscolo e cute.

Vari autori hanno studiato l'eliminazione dell'acido pteroil-glutamico e dei suoi coniugati: il 10% della quantità complessiva introdotta

(<sup>155</sup>) Stokes, J. Bact., 48, 201 (1944).

(<sup>156</sup>) Fed. Proc., 4, 99 (1945).

(<sup>157</sup>) J. Biol. Chem., 160, 493 (1945).

(<sup>158</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 64, 316 (1946).

viene eliminata come coniugato nelle feci (<sup>159</sup>); una piccolissima quantità con il sudore (<sup>160</sup>). Della parte residua due terzi vengono utilizzati dall'organismo e un terzo circa viene eliminato con le urine sotto forma di acido pteroil-glutamico (<sup>115-116-118-152</sup>), cosa che dà una ulteriore dimostrazione dell'avvenuta scissione dei coniugati ad opera dell'enzima specifico. In un interessante lavoro di Swenseid, Bird, Brown e Bethell (<sup>152</sup>) vengono riportati i valori medi della eliminazione urinaria di acido pteroil-glutamico in soggetti normali sotto carico di coniugati di esso, dimostrandosi che nelle urine si ritrova sempre e solo acido pteroil-glutamico in quantità assai aumentata.

Recentemente Martin, Tolman e Moss (<sup>125</sup>) hanno preparato un prodotto sintetico da essi denominato acido metilfolico, il quale presenta una attività « rimovente » (displacing) quella dell'acido folico, contrastando esso l'azione stimolante la crescita dello *s. lactis R*. Contemporaneamente Franklin, Stokstad, Belt e Jukes (<sup>161</sup>), usando un prodotto simile, sperimentavano sullo *s. lactis R*, sul *l. casei* e sui ratti, ottenendo una azione antagonista alla crescita dei microbi e, nel ratto, una sindrome simile, se pur più acuta e più grave a quella da carenza di acido folico ottenuta con dieta purificata aggiunta di succinilsulfatiazolo. Franklin, Stokstad e Jukes (<sup>162</sup>) ottennero con lo stesso composto una sindrome simile a quella da carenza di acido pteroil-glutamico nel topolino e nel pulcino; e Welch, Heinle, Sharpe, George e Epstein (<sup>163</sup>) usarono questo antagonista chimico nel maiale provocando un arresto nella crescita e inibizione nella formazione degli eritrociti e granulociti, cui veniva posto rimedio con la somministrazione di una sorgente di fattore estrinseco, essenzialmente priva di acido pteroil-glutamico, assieme a succo gastrico di uomo normale.

Fin dai primi studi su questo gruppo di vitamine antianemiche, molto si è discusso sulle relazioni che queste hanno con il principio antianemico di Castle, giungendosi alla conclusione, soprattutto in base a dati clinici, che quelle non possono essere identificate con questo: per-

(<sup>159</sup>) DENCO, GRUNDY, PORTER, BERRYMAN, FREIDEMANN, YOUNANS, Arch. Biochem., 10, 33 (1946).

(<sup>160</sup>) JOHNSON, HAMILTON, MITCHELL, J. Biol. Chem., 159, 425 (1945).

(<sup>161</sup>) J. Biol. Chem., 169, 427 (1947).

(<sup>162</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. et Med., 65, 368 (1947).

(<sup>163</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. et Med., 65, 364 (1947).

chè ugualmente attive per via orale e parenterale nei pazienti di anemia perniciosa, perchè non contenute che in quantità subliminali negli estratti epatici, perchè incapaci di generare sensibilizzazione.

In un suo lavoro sintetico critico sull'anemia perniciosa Torrioli<sup>(164)</sup> enunciava a questo proposito le seguenti tre ipotesi di lavoro:

1) « l'acido folico è identificabile con il fattore esogeno, o lo contiene, o lo sintetizza nell'organismo »; questa ipotesi viene esclusa dai risultati ottenuti nell'anemia perniciosa vera;

2) « l'acido folico è identificabile con il principio antianemico, o ne provoca la formazione nell'organismo per scissione o per sintesi »; la seconda parte di questa ipotesi è ritenuta dall'autore molto verosimile;

3) « l'acido folico ha una azione antianemica parallela a quella del principio antianemico con un processo sostanzialmente differente »; questa ipotesi sembra poco probabile all'autore.

Partendo dalla osservazione che l'anemico pernicioso non utilizza i coniugati, ed essendo provato che l'acloridria di questi pazienti non è responsabile della mancata utilizzazione di essi, sono stati eseguiti esperimenti che hanno dimostrato che nell'anemico pernicioso esiste un difetto nella scissione tissulare dei coniugati ad opera della coniugase<sup>(115)</sup>. Se ne potrebbe facilmente dedurre che la sindrome anemica sia dovuta ad una insufficienza di sistemi enzimatici legati alla utilizzazione dei coniugati, senonchè in alcuni casi è stata osservata<sup>(124)</sup> una certa efficacia terapeutica dei coniugati sintetici.

Ulteriore luce su questo problema è stata fatta con le ricerche di Ratner, Blanchard e Green<sup>(165)</sup> che hanno isolato dal lievito un composto assai complesso che contiene nella sua molecola tutti gli elementi dell'acido pteroil-glutamico, meno il gruppo pteridico, il quale composto sembra inibire la attività coniugasica avendo una affinità per l'enzima assai maggiore di quella dei coniugati<sup>(166)</sup>. Questi autori ritengono che gli anemici perniciosi non siano capaci di neutralizzare, a livello dei tessuti, l'inibitore che è presente negli alimenti; questa neutralizzazione sarebbe dovuta, nel soggetto normale, alla azione del principio antianemico del

<sup>(164)</sup> Clinica Nuova, 3, 305 (1945).

<sup>(165)</sup> J. Biol. Chem., 164, 691 (1946).

<sup>(166)</sup> TOTTER, comunicazione personale, citato in<sup>(126)</sup>.

fegato. Infatti trattando un anemico pernicioso con coniugati e con dosi subliminali di estratto epatico si ha immediata eliminazione urinaria di acido pteroil-glutamico, indice sicuro della utilizzazione dei coniugati, che può essere dovuta, o ad un ristabilimento della attività coniugasica provocato dalla azione del principio antianemico del fegato, o alla neutralizzazione, da parte di questo, degli inibitori (<sup>116-124</sup>). Anche ricerche in vitro hanno confermato questi risultati (<sup>15</sup>). Ammesso quindi che il principio antianemico eserciti una azione di diretta importanza nella utilizzazione dell'acido pteroil-glutamico resta da chiarire il meccanismo di azione e l'ulteriore utilizzazione dell'acido pteroil-glutamico.

A questo proposito Hays (<sup>167</sup>) studiando in vitro una sospensione di cellule midollari, ha osservato che il siero di uomo e di ratto normale, e l'estratto di fegato stimolano la produzione dei reticolociti, mentre invece l'acido pteroil-glutamico e il siero di anemico pernicioso sono completamente inattivi. Risulterebbe da queste esperienze che l'acido pteroil-glutamico non solo non rappresenta il principio antianemico, ma non ha nemmeno azione di stimolo sulla maturazione. Tornando alla ipotesi di Torrioli, l'acido pteroil-glutamico potrebbe essere un elemento dal quale l'organismo è capace di sintetizzare il principio antianemico.

Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia. 19 settembre 1947.

(<sup>167</sup>) Proc. Soc. Exper. Biol. et Med., 63, 558 (1946).

---