

18. L. TENTORI e G. VIVALDI. — Principio antianemico pernicioso, estratti bruti di fegato e timina. Studio della loro attività nella anemia macrocitica sperimentale del ratto. (\*)

**Riassunto.** — E' stata studiata la attività di estratti epatici grezzi e di estratti epatici molto purificati somministrati per via parenterale, e di timina somministrata per via orale ad alte dosi, nella anemia macrocitica sperimentale ottenuta nel ratto con diete carenti di acido folico. Come è noto questa anemia presenta grandi affinità con altre anemie sperimentali provocate analogamente nella scimmia, nel topino e nel maiale e con le anemie macrocittiche nutrizionali dell'uomo, affinità confermata da una risposta assai simile alle varie sostanze che sono state volta a volta sperimentate.

Un estratto epatico grezzo contenente frazioni antianemiche, alla dose di cc. 0,1 pro die, ha provocato una risposta ematologica comparabile a quella ottenuta con l'iniezione di 250 µg di acido folico; la somministrazione di g. 0,02 al giorno di timina per 15 giorni ha indotto un definito miglioramento del quadro anemico senza però riportare alla norma i valori ematologici; nessuna azione si è ottenuta iniettando un estratto di fegato altamente purificato alla dose di 1 unità antianemica U.S.P. pro die.

I risultati ottenuti somministrando la timina si accordano con quanto è stato osservato nella anemia perniciosa umana, e possono costituire una conferma delle ipotesi sul difetto biochimico dell'anemico pernicioso elaborate in base alle conoscenze sulle funzioni metaboliche dell'acido folico e della vitamina B-12 e sulle relazioni fra questi fattori e il metabolismo delle purine e pirimidine nei sistemi batterici. La differenza di attività fra l'estratto epatico grezzo e quello purificato si spiega con la presenza negli estratti grezzi di un complesso di sostanze (ad es. acido folico, aminoacidi, nucleosidi, ecc.) che vengono rimosse durante il processo di purificazione.

**Résumé.** — Les auteurs ont étudié l'activité d'extraits hépatiques bruts et d'extraits hépatiques très purifiés, administrés par injection, et de thymine administrée par voie orale à hautes doses, dans l'anémie macrocytique expérimentale obtenue chez le rat par des diètes carents d'a-

---

(\*) Comunicazione presentata al II Congresso Internazionale di Biochimica di Parigi (21-27 luglio 1952).

cide folique. Comme on le sait, cette anémie présente des caractères très semblables aux autres anémies expérimentales provoquées, d'une façon analogue, chez le singe, la souris et le porc et avec les anémies macrocytiques de nutrition chez l'homme, ressemblance qui est confirmée par une réaction très semblable aux diverses substances qui ont été l'une après l'autre expérimentées.

Un extrait hépatique brut contenant des fractions anti-anémiques, à la dose de 0,1 cc. par jour, a provoqué une réaction hématologique comparable à celle obtenue par l'injection de 250  $\mu$ g d'acide folique; l'administration de 0,02 g., par jour pendant 15 jours, de thymine a provoqué une amélioration importante dans le cadre anémique sans cependant reporter les valeurs hématologiques à la normalité; on n'a obtenu aucun résultat par l'injection d'un extrait de foie très purifié à la dose de 1 unité anti-anémique U.S.P. par jour. Les résultats obtenus en administrant la thymine s'accordent avec ce qui a été observé dans l'anémie perniciose humaine et peuvent être considérés comme une confirmation des hypothèses sur le défaut biochimique du sujet atteint d'anémie perniciose, élaborées sur la base des connaissances des fonctions métaboliques de l'acide folique et de la vitamine B12, et des relations entre ces facteurs et le métabolisme des purines et pyrimidines dans les systèmes bactériens. La différence d'activité entre l'extrait hépatique brut et celui qui a été purifié s'explique par la présence dans les extraits bruts d'un ensemble de substances (par exemple: acide folique, aminoacides, nucleosides, etc.) qui sont éliminées pendant le processus de purification.

**Summary.** — The Authors have studied the therapeutic effect of parenteral administration of crude and highly purified liver extracts and of oral administration of high doses of thymine in the experimental macrocytic anemia obtained feeding rats with a folic acid deficient diet. Such anemia shows the same characters of other experimental anemias induced in monkeys, mice and pigs with the same technic and of the nutritional macrocytic anemias of man.

The parenteral administration of a crude liver extract containing antianemic fractions at the dose of ml 0,1 pro die during 15 days caused an hematological response comparable to that obtained with the injection of 250  $\mu$ g of folic acid; however the administration, with the same technic, of highly purified liver extract at the dose of 1 antianemic Unit U.S.P. pro die, did not show any effect.

Thymine, administered orally at the dose of 20 mg daily during 15 days, has brought about a definite improvement of the anemic picture without however bringing back to normal the hematological data. The

results obtained with thymine can be related with the observations in human pernicious anemia. The difference in activity of the two liver extracts may be explained by the presence in crude extracts of a complex of substances (folic acid, aminoacids, nucleosides etc.) which are removed during the purifying process.

**Zusammenfassung.** — Die Verfasser haben die Wirkung von Rohleberextrakten und hochgradig gereinigten Leberextrakten, die auf dem Injektionswege verabfolgt wurden, und von Thymin, das in starken Do-ähnliche Züge auf wie andere experimentelle Anämien, die auf die gleiche Weise beim Affen, bei der Maus und beim Schwein hervorgerufen werden, sowie mit den makrozytären Ernährungsanämien beim Menschen; diese Aehnlichkeit wird bestätigt durch eine sehr ähnliche Reaktion auf die verschiedenen Substanzen, die nacheinander durchexperimentiert wurden.

Ein Leberextrakt, das Anti-anämische Wirkungseinheiten von einer Dosis von 0,1 cc. täglich enthielt, hat eine hämatologische Reaktion hervorgerufen, die der entspricht, die durch die Injektion von 250 µg Folsäure erzielt wird. Die zwei Wochen lang durchgeführte Verabreichung von täglich 0,02 g. Thymin hat eine wesentliche Besserung im anämischen Bild bewirkt, ohne jedoch die hämatologischen Werte wieder zur Normalität zu bringen; bei der Injektion eines hochgradig gereinigten Leberextrakts unter Dosierung von einer anti-anämischen Einheit U. S. P. täglich ist kein Ergebnis erzielt worden. Die bei der Verabreichung des Thymins erzielten Ergebnisse stimmen mit dem überein, was bei der Biermerschen Anämie des Menschen beobachtet wurde und lassen sich auffassen als Bestätigung der Hypothesen über den biochemischen Defekt des an Biermerscher Anämie Erkrankten, die auf Grund der Kenntnisse der metabolischen Funktionen der Folsäure und des Vitamins B<sub>12</sub> sowie der Beziehungen zwischen diesem Faktor und dem Purin- und Pyrimidinmetabolismus in den Bakteriensystemen ausgearbeitet wurden. Der Wirkungsunterschied zwischen dem Rohleberextrakt und dem gereinigten Präparat erklärt sich durch die Anwesenheit eines Komplexes von Substanzen (z. B. Folsäure, Aminosäuren, Nucleoside usw.) in dem Rohextrakt, die beim Reinigungsprozess ausgeschieden werden.

---

Proseguendo le nostre ricerche sulla anemia macrocitica sperimentale da carenza di acido folico nel ratto (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>, <sup>3</sup>) nel presente lavoro abbiamo preso in esame l'attività della timina, di estratti epatici grezzi e di estratti epatici altamente purificati contenenti il principio antianemico pernicioso.

Un lotto di ratti albini in accrescimento del peso di circa 50 grammi è stato alimentato con la dieta carente di acido folico ed addizionata dell'1 per mille di streptomycina già usata nel corso delle precedenti esperienze. Anche per le modalità sperimentali rimandiamo alla tecnica già descritta. Dopo circa 180 giorni dall'inizio dell'esperimento il 60% degli animali ha presentato chiari segni ematologici periferici di carenza di acido folico e cioè leucopenia ed anemia macrocitica ipercromica. Sono stati allora selezionati 32 animali i quali sono stati distribuiti per sorteggio in quattro gruppi di 8 animali ciascuno.

Il primo gruppo è stato trattato con acido folico alla dose terapeutica di 250  $\mu$ g alla settimana per via intramuscolare.

Il secondo gruppo ha ricevuto giornalmente timina alla dose di 20 mg somministrata per via orale.

Al terzo gruppo è stato somministrato per via intramuscolare un estratto di fegato grezzo vitaminizzato contenente frazioni antianemiche alla dose di cc. 0,4 pro die \*.

Il quarto gruppo infine è stato trattato con un estratto di fegato altamente purificato contenente 15 unità antianemiche U.S.P. di principio antianemico pernicioso alla dose di 4 Unità pro die per via parenterale \*\*.

La durata dell'esperimento è stata di 15 giorni durante i quali gli animali sono stati seguiti dal punto di vista ematologico prendendo in considerazione i seguenti dati: numero dei globuli rossi per  $\text{mm}^3$ , numero dei globuli bianchi per  $\text{mm}^3$ , emoglobina % (Sahli), reticolociti per 100 cellule; da questi dati veniva inoltre calcolato il valore globulare.

I risultati ottenuti sono sintetizzati nei grafici e nella tabella riportati. Come è evidente dall'esame dei risultati l'estratto epatico grezzo ha provocato una risposta ematologica comparabile a quella ottenuta con l'iniezione di 250  $\mu$ g di acido folico. Tale azione è certamente dovuta alla presenza negli estratti grezzi di un complesso di sostanze tra

---

(1) L. TENTORI, G. VIVALDI: Rendiconti Istituto Sup. Sanità XIV, 194 (1951).

(2) L. TENTORI, G. VIVALDI: Rendiconti Istituto Sup. Sanità XIV, 768 (1951).

(3) L. TENTORI, G. VIVALDI: Compt. rend. III Congr. Soc. Int. Europ. Hémat. pag. 515. Rome oct. 1951.

\* B-complexo con estratto epatico Squibb.

\*\* Estratto epatico Squibb.

Fig. 4

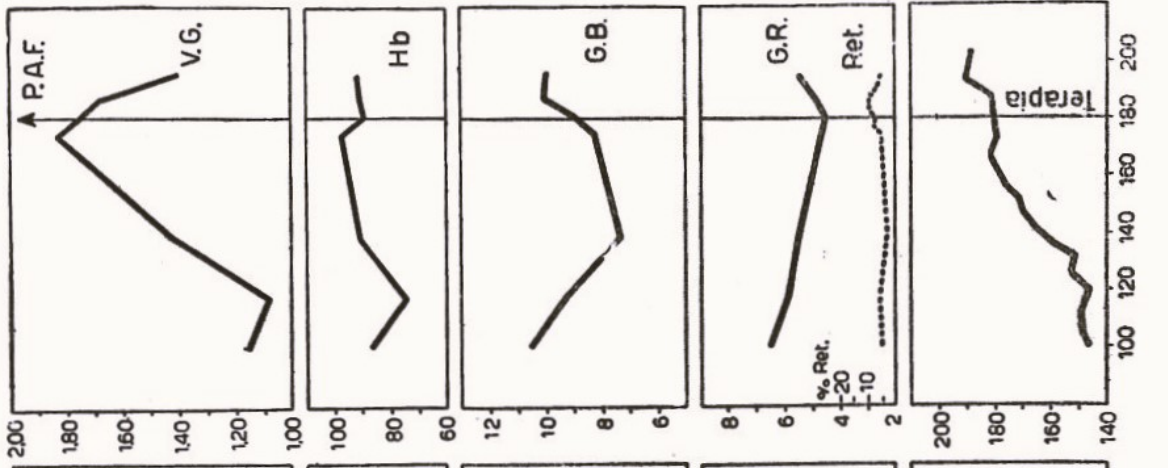


Fig. 3

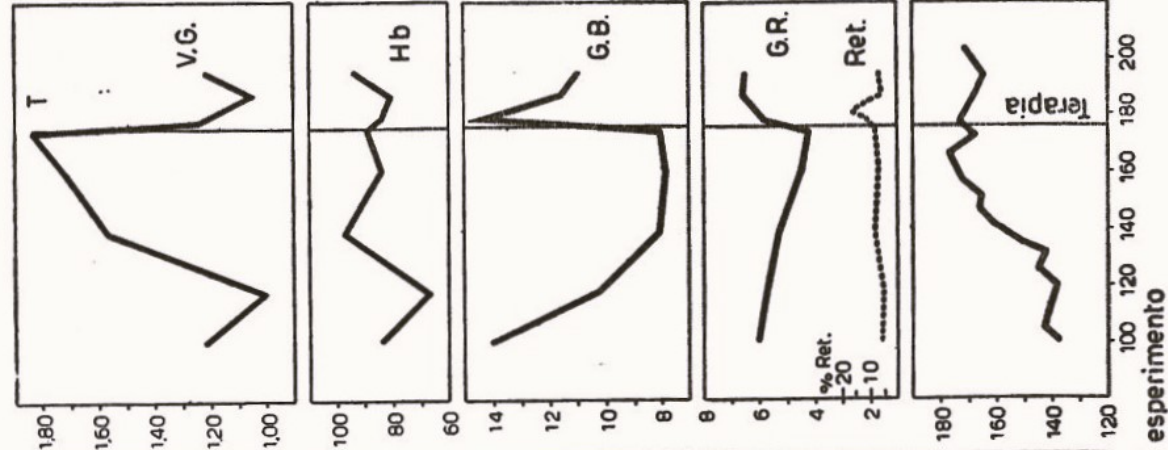


Fig. 2

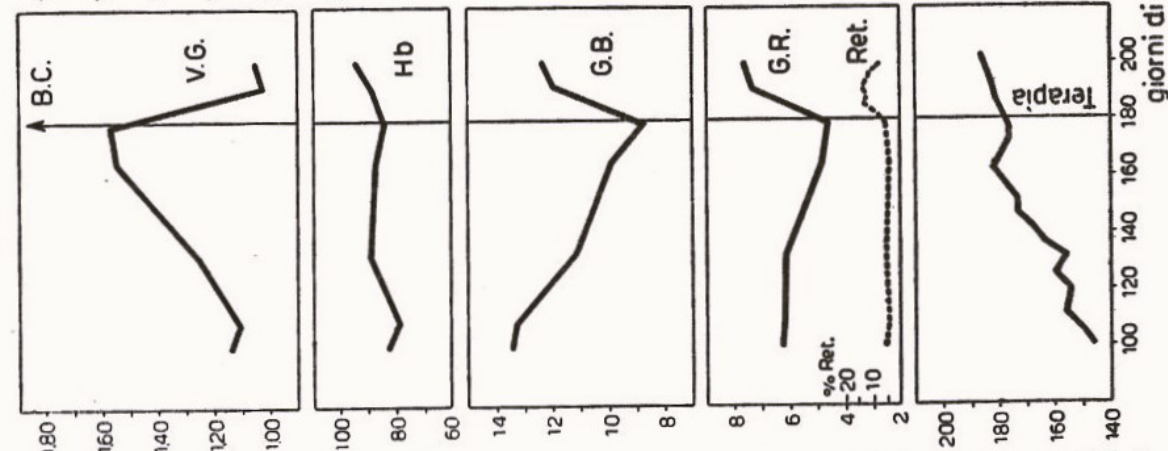
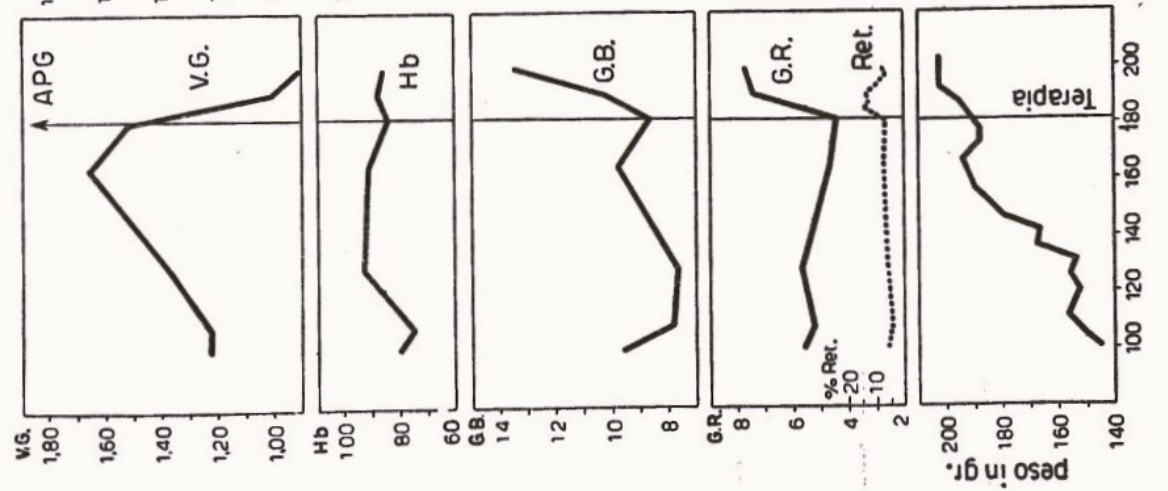


Fig. 1



GB = globuli bianchi x 10<sup>3</sup>/mme.

VG = valore globulare

GR = globuli rossi x 10<sup>6</sup>/mme.

Hb = emoglobina % (Sahli)

APG = acido pteroilglutamico (250 µg. alla settimana)

BC = estratto bruto di fegato (cc. 0,1 ogni 3 giorni)

T = timina (20 mg. al giorno per via orale)

PAF = principio antianemico del fegato (1 unità USP ogni tre giorni)

TABELLA II

GRUPPI	MASSIMA CARENZA				DOPO TRATTAMENTO			
	GR	GB	Hb% sahli	VG	GR	GB	Hb% sahli	VG
I	4.4 ± 0.42	8.5 ± 1.07	83 ± 9.0	1.52 ± 0.02	7.8 ± 0.22	13.6 ± 1.80	82 ± 2.0	0.90 ± 0.01
II	4.5 ± 0.26	8.7 ± 0.89	84 ± 4.44	1.58 ± 0.1	7.7 ± 0.72	12.5 ± 1.41	95 ± 4.49	1.05 ± 0.5
III	4.1 ± 0.25	8.0 ± 0.72	90 ± 1.35	1.85 ± 0.14	6.6 ± 0.17	11.5 ± 1.30	80 ± 7.74	1.04 ± 0.09
IV	4.3 ± 0.14	8.9 ± 1.53	89 ± 0.39	1.76 ± 0.29	5.5 ± 0.67	9.9 ± 1.21	91 ± 5.10	1.40 ± 0.95

GRUPPO I - TERAPIA : acido pteroilglutamico 250  $\mu$  alla settimana.

GRUPPO II - TERAPIA : fegato crudo Squibb cc 0,1 ogni terzo giorno i.m.

GRUPPO III - TERAPIA : timina g 0,02 pro die per os.

GRUPPO IV - TERAPIA : principio antianemico pernicioso del fegato 1 unità U.S.P. i.m. ogni terzo giorno.

GR = globuli rossi x 10<sup>6</sup>/mmc.

Hb = emoglobina % (Sahli)

GB = globuli bianchi x 10<sup>3</sup>/mmc.

VG = valore globulare

cui l'acido folico stesso ed altre diverse dal principio antianemicoper-  
nicioso, ma che hanno ugualmente attività nelle anemie da carenze ali-  
mentari. La somministrazione di un estratto epatico altamente purifi-  
cato contenente 15 unità antianemiche U.S.P. per cc. non ha dimostrato  
alcuna attività terapeutica in questo tipo di anemia macrocitica da ca-  
renza di acido folico nel ratto. Precedentemente altri ricercatori ave-  
vano osservato che estratti di fegato molto purificati ed attivi nella ane-  
mia perniciosa non dimostravano alcuna efficacia nelle anemie da ca-  
renza di acido folico provocate sperimentalmente nel pulcino (<sup>4</sup>, <sup>5</sup>), nel  
maiale (<sup>6</sup>, <sup>7</sup>), nell'ermellino e nella volpe (<sup>8</sup>).

Uguale risultato avevano ottenuto KODICEK e CARPENTER (<sup>9</sup>, <sup>10</sup>) nel  
ratto seguendo però una tecnica sperimentale differente da quella usata  
nel presente lavoro.

La differenza di attività fra l'estratto epatico grezzo e quello alta-  
mente purificato è del resto facilmente spiegabile tenendo presente che  
i complessi procedimenti di purificazione seguiti nella preparazione de-  
gli estratti ad alta concentrazione di principio antianemico pernicioso  
asportano la maggior parte di acido folico e delle altre sostanze ad at-  
tività antianemica di cui è stato detto più sopra. Si deve ancora os-  
servare che l'anemia provocata sperimentalmente nel ratto con diete  
carenti di acido folico presenta, insieme con le anemie provocate con  
tecniche sperimentali simili negli altri animali, notevoli analogie con  
le anemie megaloblastiche dell'uomo sensibili all'acido folico e refrat-  
tarie al principio antianemico pernicioso quali le anemie nutrizionale  
megaloblastica, megaloblastica della gravidanza ed acrestica.

La somministrazione di timina ha provocato un definito migliona-  
mento del quadro anemico; il trattamento ha riportato alla norma il  
valore globulare, il cui elevarsi è una delle principali caratteristiche di  
questa anemia carenziale, pur rimanendo i valori dei globuli rossi e  
dei globuli bianchi per mm<sup>3</sup> leggermente inferiori alla norma. Le dosi  
di timina somministrate agli animali nel presente esperimento sono state  
calcolate relativamente al peso corporeo in modo che corrispondessero  
alle dosi massive somministrate nella anemia perniciosa umana (<sup>11</sup>).

---

(4) O'DELL, B. L., HOGAN, A. G.: J. Biol. Chem. 149, 323 (1943).

(5) STOKSTAD, E. L. R., JUKES, T. H.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 62, 112 (1946).

(6) CARTWRIGHT, G. E., FAY, J., TATTING, B., WINTROBE M. M.: J. Lab. Clin. Med. 33, 397 (1948).

(7) CUHNA, T. J., COLBY, R. W., BUSTAD, L. K., BONE, J. F.: J. Nutrition 36, 215 (1948).

(8) TOVE, S. B., SCHAEFER, A. E., ELVEHJEM, C. A.: J. Nutrition 38, 469 (1949).

(9) KODICEK, E., CARPENTER, K. J.: Biochem. J. 43/1, i, (1948).

(10) KODICEK, E., CARPENTER, K. J.: Blood V, 540 (1950).

(11) VILTER, R. W., HERRIGAN, D., MUELLER, J. F., JARROLD, Th., VILTER, C. F.,  
HAWKINS, V., SEAMAN, A.: Blood V, 695 (1950).

Precedentemente PETERING e DELOR (<sup>12</sup>, <sup>13</sup>), usando una tecnica differente, somministrando il prodotto a dosi inferiori e per un periodo di tempo più breve e prendendo in considerazione le sole variazioni del numero dei globuli rossi per la valutazione dei risultati, non avevano osservato azione significativa della timina nel ratto carente di acido folico.

Contemporaneamente però le ricerche che venivano eseguite sui fattori di crescita per i microrganismi del gruppo dell'acido lattico avevano messo in evidenza che l'acido folico partecipa alla sintesi della timina. Altre ricerche eseguite somministrando la timina a dosi massive nell'uomo hanno dimostrato un'attività terapeutica nell'anemia perniciosa ed in altre anemie macrocitarie (<sup>11</sup>, <sup>14</sup>, <sup>15</sup>, <sup>16</sup>, <sup>17</sup>).

VILTER e collaboratori (<sup>11</sup>) allo scopo di interpretare i risultati da loro ottenuti nella anemia perniciosa umana e quelli ottenuti da numerosi altri ricercatori negli studi sul metabolismo batterico (<sup>18</sup>), hanno proposto una ipotesi di lavoro secondo la quale sia l'acido folico che la vitamina B<sub>12</sub> sarebbero implicati nella sintesi biologica dei nucleoproteidi. L'acido folico catalizzerebbe la sintesi della timina e di altre purine e pirimidine, la vitamina B<sub>12</sub> avrebbe importanza nella successiva sintesi della timidina e degli altri nucleosidi o desossiribosidi. Le più recenti vedute considerano infatti la cellula megaloblastica, comune alla anemia perniciosa ed alla maggior parte delle altre anemie macrocitarie, come un eritroblasto primitivo che presenta delle anomalie nel metabolismo dei nucleoproteidi in relazione con una carenza di acido folico o di vitamina B<sub>12</sub> o di altre sostanze. I risultati ottenuti nel presente esperimento si accordano con quanto è stato osservato nella anemia perniciosa umana e possono rientrare nel quadro della ipotesi enunciata da VILTER.

Roma — Istituto Superiore di Sanità — Laboratorio di Biologia.

---

(12) PETERING, H. G., DELOR, R. A.: Science 105, 547 (1947).

(13) PETERING, H. G., DELOR, R. A.: Science 110, 185 (1949).

(14) SPIES, FROMMEYER, LOPEZ TOCA, GWINNE: Lancet 1, 225 (1946).

(15) SPIES, STONE: Lancet 1/ Febbraio (1947).

(16) SPIES, FROMMEYER, VILTER, ENGLISH: Blood 1, 185 (1946).

(17) PETRIDES, P.: Deut. Arch. f. Klin. Med. 194, 661 (1949).

(18) JUKES, T. H., STOKSTAD, E. L. R.: Vitamins and Hormones IX, 1 (1951).