

42. R. ANGELICO, M. QUINTILIANI. — Ricerche sull'identità dei corticosteroidi sintetizzati "in vitro" dalla corteccia surrenale di ratto.

**Riassunto.** — Gli AA. riferiscono i risultati di un gruppo di esperienze volte alla identificazione dei corticosteroidi sintetizzati in vitro da ghiandole surrenali di ratti incubate in Krebs-Ringer-fosfato non contenente ACTH. In ogni recipiente erano posti i surreni di 10 ratti e lasciati incubare in aria a 37° per 5 ore. Negli estratti ottenuti dal mezzo di incubazione è stato trovato un contenuto medio di corticosteroidi riducenti il bleu di tetrazolio pari a 35,8 µg/100 mg di surrene; e all'analisi cromatografica si è rivelata costantemente soltanto la presenza di apprezzabili quantità di corticosterone.

**Résumé.** — Les auteurs donnent les résultats d'un groupe de recherches sur l'identification des corticostéroïdes synthétisés « in vitro » par la substance cortico-surrénale du rat, incubée en Krebs-Ringer-phosphate. Dans chaque récipient on avait mis les glandes surrénales de 10 rats les laissant incuber pendant 5 heures à 37°C. Dans les extraits obtenus du médium d'incubation on a trouvé un contenu moyen de corticostéroïdes réduisant le bleu de tetrazolium de 35,8 µg/100 mg de substance cortico-surrénale. L'analyse chromatographique a révélé constamment la seule présence de quantités appréciables de corticostérone.

**Summary.** — Experiments have been carried out to identify corticosteroids secreted by isolated rat adrenal glands, incubated in ACTH-free Krebs-Ringer-phosphate medium. Each vessel held the adrenals from ten rats and was incubated aerobically for 5 hours at 37°C. Extracts of the incubation medium contained an amount of bleu tetrazolium reducing corticosteroids of 35,8 µg per 100 mg of adrenal tissue. Chromatographic analysis showed constantly only corticosterone in appreciable amounts.

**Zusammenfassung.** — Die Verfasser berichten über die Ergebnisse einer Reihe von Versuchen welche die Erkennung der Kortikosteroide die von den Nebennieren der Ratte « in vitro » in Krebs-Ringer ACTH freien Phosphat dargestellt wurden. In jedem Behälter wurden die Nebennieren von 10 Ratten untergebracht und während 5 Stunden an der Luft bei 37° bebrütet. In den Extrakten des Brutmediums wurden im Durchschnitt 35,8 µg/100 mg Nebennieren entsprechende das Tetrazo-

liumblau reduzierende Kortikosteroide gefunden. Die chromatographische Analyse hat immer nur die Anwesenheit von beträchtlichen Mengen von Kortikosteron erwiesen.

---

Nel discutere i risultati ottenuti in un precedente ciclo di ricerche sui rapporti fra l'acido pantotenico e la funzione della corteccia surrenale (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>) ritenemmo che probabilmente elementi definitivi per la reale valutazione delle capacità funzionali del cortico-surrene avrebbero potuto essere ricavati con l'impiego di tecniche sperimentali atte a permetterne un apprezzamento diretto. Ci siamo pertanto dedicati allo studio della sintesi di corticosteroidi da parte di ghiandole surrenali di ratto isolate, secondo una tecnica proposta da SAFFRAN e coll. nel 1952 (<sup>3</sup>) ed in seguito perfezionata da vari AA. (<sup>4</sup>, <sup>5</sup>) fra i quali noi stessi (<sup>6</sup>). Potemmo così dimostrare che i surreni dei ratti carenti producevano in vitro quantità di corticoidi che non differivano significativamente da quelle prodotte dagli animali di controllo normali, valutando tale contenuto sul residuo dell'estratto cloroformico del mezzo di incubazione sia con misure dell'assorbimento nell'U.V., che mediante il dosaggio della formaldeide prodotta per ossidazione con acido periodico. Per contro se gli stessi surreni erano incubati in mezzo contenente ACTH, non apparivano in grado di reagire con un aumento nella produzione di corticoidi valutabili nell'U.V., come, nelle nostre condizioni sperimentali, potevamo ottenere dai surreni dei ratti normali. Pur non essendo possibile sovrapporre le condizioni della incubazione in vitro con quelle dell'organismo nel suo insieme, fummo indotti a pensare che le ghiandole dei ratti carenti funzionassero al limite delle loro possibilità e fossero pertanto incapaci di adattarsi ad una maggiore richiesta di ormoni.

Una difficoltà di sintesi di corticosteroidi da parte del surrene dell'animale carente non appariva pertanto rilevabile in condizioni di riposo, ma soltanto sotto lo stimolo dell'ACTH. Questi dati rappresentano, in ogni caso, a nostro avviso, una ulteriore e immediata conferma dell'importanza dell'acido pantotenico per l'integrità funzionale del cortico-surrene.

Le nostre ricerche sono state recentemente confermate da parte di EISENSTEIN (<sup>7</sup>), il quale misurando direttamente la capacità di sintesi steroidea di surreni isolati di ratto, sottoposti a stimoli di ACTH, ha potuto dimostrare, in condizioni sperimentali pressochè simili alle nostre, che la secrezione di ormoni corticali è diminuita nella carenza di acido pantotenico. Tale diminuzione è valutabile soltanto col procedimento spettrofo-

tometrico, da noi adottato, capace di svelare gli steroidi con un chetogruppo insaturo nell'anello A.

L'A. riproduce quasi perfettamente i nostri risultati, pur nell'ordine di valori assoluti più elevati (Angelico-Quintiliani: normali  $\mu\text{g}$  40/100 mg di surrene: EISENSTEIN  $\mu\text{g}$  62-67; carenti rispettivamente  $\mu\text{g}$  17 e 40 circa). Nessuna differenza fra normali e carenti riscontra però col metodo di PORTER e SILBER <sup>(8)</sup>, capace di dosare soltanto gli steroidi con un —OH in C<sub>17</sub>, che secondo l'A. costituirebbero un po' meno della metà del contenuto steroideo totale sintetizzato.

Siamo stati indotti a proseguire nella identificazione chimica e conseguentemente dell'attività biologica del materiale steroideo sintetizzato da due motivi. Il primo, di ordine teorico, è rappresentato dalla ipotesi formulata da HURLEY e MACKENZIE <sup>(9)</sup> e da noi già presa in considerazione, secondo la quale è possibile che avvenga normalmente nell'animale carente la sintesi di corticosteroidi nei primi stadi e che, in assenza di una adeguata quantità di coenzima A, si arresti a livello di composti non aventi la specifica azione biologica.

Il secondo, di ordine tecnico, consiste nel fatto che siano dimostrabili differenze significative nel comportamento dei surreni di ratti normali e carenti, sotto stimolo di ACTH, soltanto mediante l'indagine nell'U.V., e non, come nel nostro caso, mediante l'analisi colorimetrica dei corticosteroidi di formaldeidogenetici, ovvero, come nel caso di EISENSTEIN, mediante il metodo di PORTER e SILBER per gli steroidi idrossilati in C<sub>17</sub>.

Va inoltre rilevato che il riscontro di notevoli quantità di corticosteroidi dosabili col metodo di PORTER e SILBER ottenuto da EISENSTEIN, non coincide con i risultati di osservazioni comparative condotte su differenti specie animali e con tecniche diverse da PORTER (cit. da BUSCH), BUSCH <sup>(10)</sup>, HOFFMANN <sup>(11)</sup>, e altri, secondo le quali la secrezione corticosurrenale del ratto contiene apprezzabili quantità di corticosterone, ma insignificanti di steroidi idrossilati in C<sub>17</sub>. Tale difficoltà di alcuni roditori a idrossilare in C<sub>17</sub> gli steroidi a 21 atomi di carbonio porrebbe secondo HOFFMANN, un interessante problema di biochimica comparata. Alcune proprietà biochimiche sarebbero a giudizio di BUSCH caratteristiche di ciascuna specie e geneticamente determinate. Secondo EISENSTEIN vi sarebbero però notevoli differenze fra i risultati ottenibili « in vivo », come sul sangue refluo delle vene surrenali, e quelli ottenibili « in vitro », su ghiandole incubate, probabilmente in rapporto a diverse possibilità di reazioni enzimatiche, interferenti sul metabolismo degli ormoni corticali <sup>(12)</sup>.

E' nostra convinzione — come scrivemmo nelle osservazioni preliminari sulla tecnica <sup>(6)</sup> — che lo studio in vitro della sintesi di steroidi

da parte del surrene di ratto sia soggetto a numerose difficoltà di ordine puramente analitico: difficoltà di standardizzare le condizioni di scambio fra mezzo di incubazione e tessuto surrenale, di estrarre piccole quantità di corticosteroidi da un mezzo acquoso e di valutarle con sufficiente accuratezza, di eliminare i materiali interferenti etc. E' forse per questa ragione che tali metodi, pure utilizzando organi di ratto, l'animale meglio conosciuto fra quelli usati in laboratorio e fra i più facilmente ottenibili in ceppi puri, siano stati studiati e applicati da relativamente pochi ricercatori, pure in un periodo nel quale le ricerche sulla sintesi in vitro dei corticoidi sono quanto mai numerose in altre specie animali.

Nel presente lavoro riferiamo i risultati di un gruppo di esperienze volte alla identificazione dei corticosteroidi sintetizzati in vitro da ghiandole surrenali di ratti normali, incubate in assenza di ACTH. Sono inoltre riportati alcuni dati ottenuti con surreni di ratti carenti di acido pantotenico.

Ratti Wistar di sesso maschile, allevati nel nostro Istituto, sono stati posti dopo lo svezzamento ad una dieta purificata completa, riportata nel nostro precedente lavoro <sup>(1)</sup>. Per ottenere la carenza di acido pantotenico alcuni gruppi di ratti erano opportunamente privati della integrazione giornaliera di questa vitamina. Gli animali sono stati impiegati nelle varie esperienze da 30 a 50 giorni dopo l'inizio della somministrazione della dieta, su un peso medio corporeo di 180-200 g per i normali e di 90-120 g per i carenti. Facilmente rilevabili in questi ultimi, oltre all'arresto della crescita, i vari segni dello stato deficitario, da noi descritti in precedenti ricerche <sup>(13)</sup>. Prima di ogni prova i ratti erano mantenuti a digiuno per 12 ore; quindi uccisi per decapitazione. Si procedeva subito al prelevamento dei surreni, alla liberazione dai tessuti circostanti, al taglio in quattro segmenti, al peso su bilancia a torsione e alla introduzione degli organi in bevutine da 50 cm<sup>3</sup> mantenute in ghiaccio tritato, contenenti 20 cm<sup>3</sup> del mezzo di incubazione: Krebs-Ringer-fosfato con glucosio alla concentrazione del 2%. In ogni bevutina venivano posti i surreni di 10 ratti e quindi lasciati ad incubare in aria, con agitazione costante, in bagno a 37°C per la durata di 5 ore. Al termine di tale periodo si procedeva alla estrazione, purificazione, e analisi del materiale raccolto con le tecniche che appresso riportiamo.

L'estrazione diretta di tutto il materiale incubato con cloroformio o acetato di etile ha dato luogo ad un residuo contenente una notevole quantità di grassi che rendeva assai difficoltosa l'analisi successiva. Fra i vari sistemi di purificazione proposti abbiamo ritenuto più idoneo quello di Eisenstein consistente nelle seguenti fasi: precipitazione del materiale proteico con acetone; estrazione dei grassi mediante etere di pe-

trolio; evaporazione dell'acetone ed estrazione cloroformica del materiale steroideo. Non apparendo però il residuo ancora sufficientemente puro si è ricorso alla integrazione del metodo di Eisenstein con cromatografia di adsorbimento su florisil <sup>(14)</sup>. Ma anche con questa tecnica non siamo riusciti ad ottenere un materiale idoneo alla successiva analisi. Pertanto abbiamo preferito adottare il metodo di Busch <sup>(10)</sup>, della ripartizione alcool 70°/etere di petrolio con il quale abbiamo ottenuto i risultati più soddisfacenti.

Il materiale così purificato è stato sottoposto ai seguenti procedimenti analitici:

a) analisi spettrofotometrica nell'U.V. fra 220 e 260 mμ. Con questo metodo nelle precedenti ricerche, operando su piccole quantità di materiale raccolto dalle vaschette contenenti 4 o al massimo 8 surreni, avevamo ottenuto delle curve caratteristiche con un massimo di assorbimento a 240 mμ. Nel caso presente, probabilmente per la presenza di notevoli quantità di materiali interferenti, si sono ottenute delle curve assolutamente inadeguate per la valutazione del contenuto steroideo;

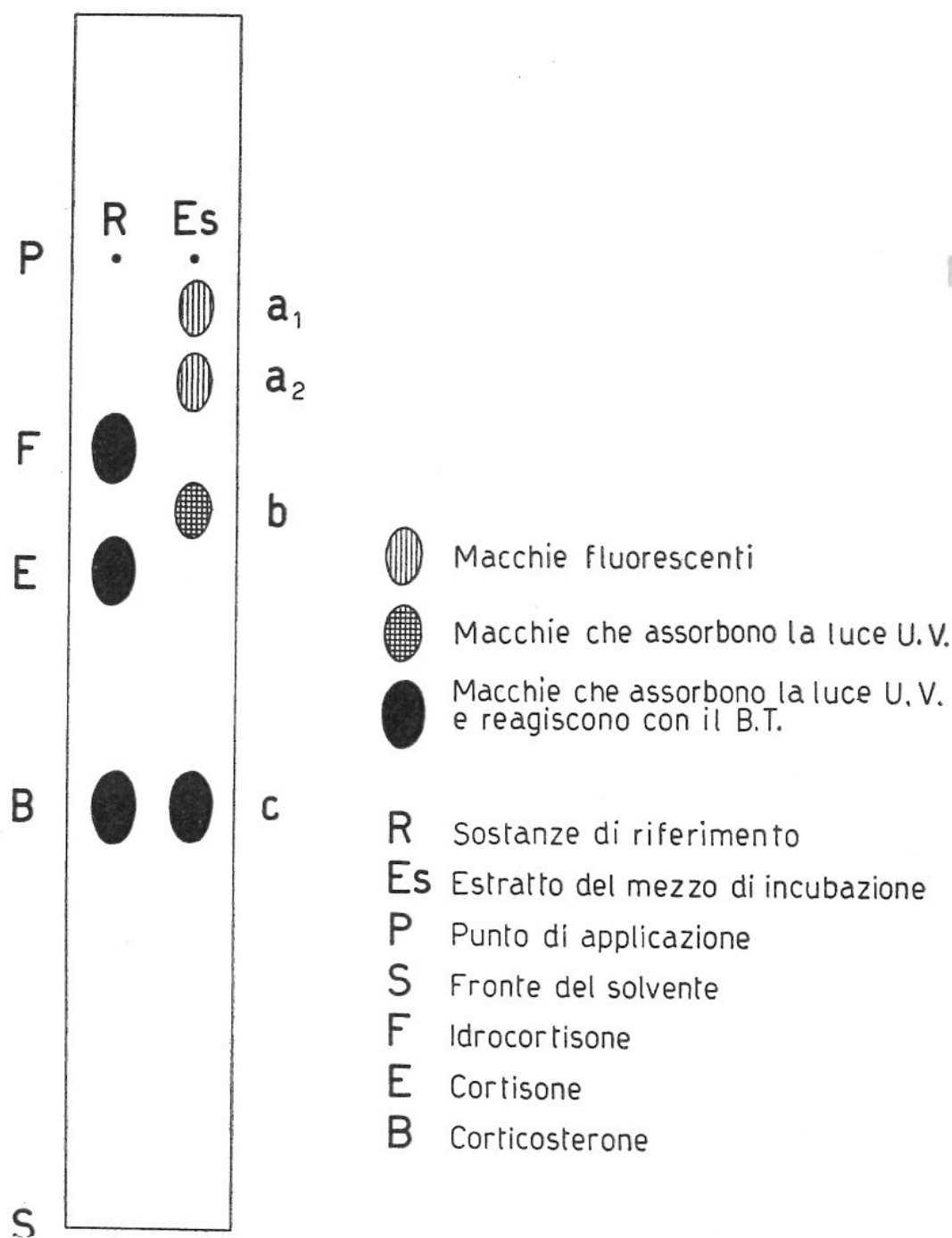
b) analisi colorimetrica con il metodo di CHEN <sup>(15)</sup> al bleu di tetrazolio. Ecco i valori riscontrati in un gruppo di esperienze:

| Gruppo | N. surreni | μg di corticoidi/100 mg surrene |
|--------|------------|---------------------------------|
| I      | 20         | 23,2                            |
| II     | 20         | 35,0                            |
| III    | 20         | 53,0                            |
| IV     | 18         | 32,0                            |
| V      | 20         | 35,8                            |

con un valore medio di 35,8 μg per 100 mg di surrene. In un gruppo di surreni di ratti carenti è stato riscontrato un valore di 19,2, che merita ulteriori conferme;

c) cromatografia su carta secondo il metodo di Busch <sup>(10)</sup>, usando il sistema di solventi costituito da toluolo, metanolo, acqua 4:3:1. Risultato pressochè costante dell'indagine cromatografica è, come risulta dallo schema riportato, il rilievo di una apprezzabile quantità di un prodotto con R<sub>f</sub> simile a quello del corticosterone, svelabile tanto alla osservazione diretta delle strisce alla luce ultravioletta, quanto al tratta-

mento delle strisce stesse con bleu di tetrazolio. Questo reperto coincide con quanto è possibile osservare nei quadri cromatografici riportati dalla maggior parte degli AA. (HOFFMANN, BUSCH e altri), rivelandosi il



Quadro cromatografico del materiale steroideo, sintetizzato « in vitro » della corteccia surrenale di ratto.

corticosterone il costituente forse esclusivo o principale della secrezione del surrene del ratto. Incostantemente può essere notata alla luce U.V. la presenza di un altro composto con Rf intermedio fra quello dell'idrocortisone e del cortisone, ed inoltre, una o due zone di fluorescenza con

Rf molto piccolo vicine al punto di partenza. Probabilmente la maggior parte del materiale è costituito da sostanze presenti in quantità troppo piccole, mentre appare abbastanza chiaramente rivelabile il costituente principale, nel nostro caso il corticosterone.

Analogo risultato si è ottenuto nel materiale elaborato da ratti carenti. Questo fatto confermerebbe dal punto di vista qualitativo quanto da noi osservato nelle precedenti ricerche sulla secrezione corticosurrenale in condizioni di riposo, cioè senza aggiunta di ACTH al mezzo di incubazione.

Non è improbabile che l'indagine cromatografica così condotta — mediante la quale abbiamo potuto soltanto confermare la presenza del corticosterone come il principale costituente della secrezione corticosurrenale del ratto normale — possa fornire un utile ausilio per la interpretazione delle contrastanti differenze, che si riscontrano con i diversi metodi, fra il materiale steroideo sintetizzato in vitro da surreni di ratti normali e quello elaborato da surreni di ratti carenti, quando vengano entrambi incubati in presenza di ACTH.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) ANGELICO R. e QUINTILIANI M. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 31: 1308 (1955).
  - (2) ANGELICO R. e QUINTILIANI M. - Rend. Istituto Sup. Sanità, 48: 1278 (1955).
  - (3) SAFFRAN M., GRAD B., BAYLISS M. I. - Endocrinology, 50: 388 (1952).
  - (4) ELLIOTT F. H. e coll. - Endocrinology, 53: 721 (1954).
  - (5) HOFFMANN F. G. e coll. - Endocrinology, 54: 580 (1954).
  - (6) ANGELICO R. e QUINTILIANI M. - Rend. Istituto Sup. Sanità, 48: 1261 (1955).
  - (7) EISENSTEIN A. B. - Endocrinology, 60: 298 (1957).
  - (8) PORTER C. C., SILBER R. H. - J. Biol. Chem., 185: 201 (1950).
  - (9) HURLEY L. S., MACKENZIE J. B. - J. Nutrition, 34: 403 (1954).
  - (10) BUSH S. E. - Endocrinology, 9: 95 (1953).
  - (11) HOFFMANN F. G. - Endocrinology, 59: 712 (1956).
  - (12) EISENSTEIN A. B. - Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 94: 637 (1956).
  - (13) ANGELICO R. e QUINTILIANI M. - Rend. Istituto Sup. Sanità, 45: 235 (1952).
  - (14) NELSON D. H. e coll. - J. Clin. Endocrinol., 12: 519 (1952).
  - (15) CHEN C., TERWELL H. E. Jr., WHEELER I. - J. Lab. and Clin. Med., 42: 749 (1953).
  - (16) SCHWARTZ I.: « L'exploration fonctionnelle de la cortico-surrénale par les stéroïdes ». - Marrou, Paris, 1953.
-