

98. P. PECORA, E. ZILLI, A. NATOLI, e G. CAVINA. — Osservazioni sulla determinazione cromatografica dei 17-chetosteroidi urinari negli individui normali.

Riassunto. — Gli AA. hanno studiato, usando una tecnica cromatografica da loro messa a punto, l'eliminazione urinaria degli steroidi del tipo 17-cheto in individui normali di ambo i sessi.

Con tale tecnica, che impiega la purificazione dell'estratto grezzo urinario con il reattivo T di Girard, i cromatogrammi presentano delle cuspidi (in genere 7), di cui 4, le più notevoli, ricorrono in ogni cromatogramma con costanza di disposizione cronologica e di intensità. La prima cuspidè risulta costituita da materiale steroideo alterato per opera dell'idrolisi estrattiva; la seconda dal deidroisoandrosterone; la terza dall'androsterone e la quarta dall'eticolanolone; le cuspidi minori, meno costanti e in genere modeste, sono costituite dagli 11-ossiderivati dell'androsterone e dell'eticolanolone.

Differenze alle volte notevoli esistono tra individuo e individuo nei riguardi della percentuale delle singole cuspidi.

Praticamente analogo è il comportamento del cromatogramma, sia per quanto riguarda l'andamento che la percentuale delle singole cuspidi, nell'uomo e nella donna.

Résumé. — Les Auteurs ont étudié, en employant une technique chromatographique mise au point par eux-même, l'élimination urinaire des stéroïdes du type 17-cétone chez des individus normaux des deux sexes.

Avec cette technique, qui emploie la purification de l'extrait urinaire brut par le réactif Girard, les chromatogrammes présentent des pointes (généralement 7) dont 4, les plus notables, se retrouvent dans chaque chromatogramme avec une disposition chronologique et une intensité constantes. La première pointe se révèle formée d'un matériel stéroïde altéré par l'hydrolyse d'extraction; la seconde de déhydroisoandrosterone; la troisième d'androsterone et la quatrième d'éthyocolanolone; les pointes mineures, moins constantes et en général modestes, sont constituées par les 11 oxydérivés de l'androsterone et de l'éthyocolanolone.

Des différences parfois notables existent entre les individus en ce qui concerne le pourcentage de chaque pointe.

Le comportement du chromatogramme est analogue en pratique tant pour la façon d'être que pour le pourcentage de chaque pointe, chez l'homme comme chez la femme.

Summary. — The urinary elimination of 17-ketosteroids in normal individuals of both sexes was studied by means of a chromatographic technique developed by the authors and involving the purification of the crude urinary extract with Girard's reagent T. The chromatograms generally showed 7 peaks of which the 4 most marked ones had a constant chronological position and intensity in every chromatogram. The first peak was given by steroids altered by the extraction hydrolysis; the second peak was given by dehydroisoandrosterone; the third peak by androsterone and the fourth peak by aetiocholanolone. The smaller peaks were less constant and generally of little importance and were given by 11-oxyderivatives of androsterone and aetiocholanolone.

Different percentage of the single peaks, sometimes remarkable, were found for different individuals.

Practically similar chromatograms were obtained for both sexes.

Zusammenfassung. — Die Verfasser haben eine eigene chromatographische Technik entwickelt und mit deren Hilfe die Ausscheidung der Steroide vom Typ 17-cheto im Urin gesunder Menschen beider Geschlechter studiert.

Bei der Anwendung dieser Technik, wobei der Rohextrakt des Urins mit dem Girard's Reagens T gereinigt wird, zeigen die Chromatogramme Spitzen (im Allgemeinen 7), deren hauptsächlichste 4 in allen Chromatogrammen in derselben chronologischen Folge und mit derselben Intensität vorkommen. Es zeigt sich, dass die erste Spitze von steroidischem Material gebildet wird, das in der Extrahierungs-Hydrolyse umgewandelt wurde; die zweite vom Dehydro-isoandrosteron; die dritte vom Androsteron und die vierte vom Etiocholanolon; die kleineren, weniger konstanten und im allgemeinen bescheidenen Spitzen, werden vom den 11-Oxy-Derivaten des Androsterons und des Etiocholanolons gebildet.

Oft bestehen bemerkenswerte Unterschiede von Individuum zu Individuum hinsichtlich des Prozentsatzes der einzelnen Spitzen.

Das Chromatogramm verläuft praktisch analog für Männer und Frauen, sowohl hinsichtlich seines Verlaufs als auch hinsichtlich des Prozentsatzes der einzelnen Spitzen.

In una nostra precedente pubblicazione (¹) abbiamo reso noto un metodo da noi messo a punto per l'analisi cromatografica degli steroidi urinari del tipo 17-cheto. Con l'impiego di tale metodica abbiamo studiato il comportamento del cromatogramma dei 17-chetosteroidi urinari in individui adulti normali di ambo i sessi.

Le nostre ricerche sono state eseguite sulle urine di dieci individui adulti normali (5 uomini e 5 donne) di età compresa tra 24 e 32 anni. In quattro uomini e tre donne l'analisi cromatografica è stata ripetuta in doppio sullo stesso campione di urine. I risultati, riportati nei grafici annessi, vengono qui di seguito riferiti per esteso.

n. 1 uomini: D. G. Luciano - anni 28 (grafico A).

Inviati su colonna mg 2,025 di 17-chetosteroidi, trovati dopo la cromatografia mg 2,0625 (+ 2,5%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso tra le frazioni	1 — 5	23,3 %
2° massimo, » » »	11 — 15	15,75%
3° massimo, » » »	18 — 27	26,2 %
4° massimo, » » »	27 — 38	24,7 %
altri massimi		10,05%

n. 2 uomini: Z. Ezio - anni 30 (grafico B).

Inviati su colonna mg 2,01 di 17-chetosteroidi, trovati dopo cromatografia mg 2,09 (+ 4,4%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso tra le frazioni	1 — 4	9,9 %
2° massimo, » » »	12 — 16	8,5 %
3° massimo, » » »	18 — 28	34,75%
4° massimo, » » »	29 — 40	35,10%
altri massimi		8,75%

n. 3 uomini: P. Paolo - anni 28 (grafico C).

Inviati su colonna mg 1,74 di 17-chetosteroidi, recuperati dopo la cromatografia mg 1,685 (93,3% del totale).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso fra le frazioni	1 — 4	18,63%
2° massimo, » » »	11 — 16	12,07%
3° massimo, » » »	18 — 25	30,17%
4° massimo, » » »	27 — 38	32,41%
altri massimi		6,72%

n. 4 uomini: G. Umberto - anni 25 (grafico D).

Inviati su colonna mg 2,0 di 17-chetosteroidi, recuperati dopo cromatografia mg 1,982 (99,1%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso fra le frazioni	1 — 5	21,09%
2° massimo, » » »	11 — 15	15,44%
3° massimo, » » »	17 — 24	31,68%
4° massimo, » » »	27 — 35	31,79%
altri massimi		0,0 %

n. 5 uomini: S. Enrico - anni 27 (grafico E).

Inviati su colonna mg 3,00 di 17-chetosteroidi, recuperati dopo cromatografia mg 3,069 (+ 2,3%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso fra le frazioni	1 — 4	13,95%
2° massimo, » » »	9 — 14	14,84%
3° massimo, » » »	15 — 23	21,57%
4° massimo, » » »	25 — 35	42,16%
altri massimi		3,45%

n. 1 donne: P. Paola - anni 24 (grafico A).

Inviati su colonna mg 3,00 di 17-chetosteroidi, trovati dopo cromatografia mg 3,039 (+ 1,2%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso fra le frazioni	1 — 4	16,32%
2° massimo, » » »	9 — 14	12,83%
3° massimo, » » »	15 — 22	23,27%
4° massimo, » » »	25 — 35	25,60%
altri massimi, compresi tra le frazioni	42 — 49	25,27%

n. 2 donne: S. Ada - anni 27 (grafico B).

Inviati su colonna mg 2,00 di 17-chetosteroidi, recuperati dopo cromatografia mg 1,697 (84,85%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso fra le frazioni	1 — 3	18,03%
2° massimo, » » »	11 — 15	23,69%
3° massimo, » » »	16 — 22	23,39%
4° massimo, » » »	23 — 32	34,88%
altri massimi		0,0 %

n. 3 donne: M. Teresa - anni 25 (grafico C).

Inviati su colonna mg 2,00 di 17-chetosteroidi, recuperati dopo cromatografia mg 1,909 (95,4%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso fra le frazioni	1 — 3	6,3 %
2° massimo, » » »	9 — 14	7,6 %
3° massimo, » » »	17 — 24	21,0 %
4° massimo, » » »	25 — 31	50,3 %
altri massimi		15,8 %

n. 4 donne: V. Maria Rosa - anni 30 (grafico D).

Inviati su colonna mg 1,485 di 17-chetosteroidi, recuperati dopo cromatografia mg 1,560 (+ 8,5%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso fra le frazioni	1 — 4	4,6 %
2° massimo, » » »	11 — 15	7,3 %
3° massimo, » » »	16 — 23	30,5 %
4° massimo, » » »	25 — 33	45,0 %
altri massimi		11,3 %

n. 5 donne: B. Paola - anni 25 (grafico E).

Inviati su colonna mg 1,972 di 17-chetosteroidi, recuperati dopo cromatografia mg. 1,891 (95,9%).

Composizione percentuale rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati:

1° massimo, compreso fra le frazioni	1 — 4	13,5 %
2° massimo, » » »	12 — 14	14,1 %
3° massimo, » » »	18 — 22	22,2 %
4° massimo, » » »	22 — 36	48,3 %
altri massimi		1,9 %

* * *

Dall'analisi di tali dati risulta che con la nostra metodica si isolano dalle urine di individuo normale numerose sostanze positive al reattivo di Zimmermann, le quali appaiono distribuite in maniera abbastanza costante in sette aggruppamenti, in genere compresi tra le seguenti frazioni:

1° massimo, compreso in media tra le frazioni	1 — 5
2° massimo, » » » » » »	11 — 15
3° massimo, » » » » » »	18 — 26
4° massimo, » » » » » »	27 — 37
5° massimo, » » » » » »	40 — 43
6° massimo, » » » » » »	44 — 46
7° massimo, » » » » » »	48 — 49

I massimi di maggiore entità sono in genere i primi quattro, e la loro composizione percentuale media (rispetto al totale dei 17-chetosteroidi recuperati), è la seguente:

a) nell'uomo:

1° massimo	17,37% (tra 9,9 % e 23,3 %)
2° massimo	13,71% (tra 8,5 % e 17,75%)
3° massimo	28,87% (tra 21,57% e 34,75%)
4° massimo	33,23% (tra 24,7 % e 42,16%)

b) nella donna:

1° massimo	11,75% (tra 4,6 % e 18,03%)
2° massimo	13,10% (tra 7,3 % e 23,69%)
3° massimo	24,07% (tra 21,0 % e 30,5 %)
4° massimo	40,81% (tra 25,60% e 50,0 %)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel nostro lavoro, già precedentemente citato, abbiamo spiegato i motivi che ci hanno indotto a modificare parzialmente la originaria metodica di DINGEMANSE e coll. ⁽²⁾, e ne abbiamo particolareggiatamente esaminato e discusso le reciproche differenze ed i reciproci pregi e difetti. In realtà tali differenze non sono sostanziali e riguardano essenzialmente i processi di idrolisi e di estrazione delle urine, che con la nostra metodica risultano notevolmente abbreviati, senza che peraltro si vengano a stabilire importanti modificazioni del cromatogramma. Infatti, se il nostro sistema di idrolisi e di estrazione comporta in genere la minore ampiezza o la scomparsa di alcuni massimi, quello dell'i-androstanolone e quelli degli 11-ossisteroidi, ricordiamo che:

a) l'i-androstanolone non sempre compare anche nei cromatogrammi di DINGEMANSE e coll. Gli stessi AA. poi, nel calcolo delle percentuali delle singole cuspidi, mettono l'i-androstanolone (i-androstene-6-olo-17-one) nel gruppo dei beta-17-chetosteroidi, dati gli intimi rapporti metabolici. Col nostro procedimento invece tale steroide verrebbe parzialmente trasformato in 3-cloro- Δ_5 -androstene-17-one e passerebbe nel primo massimo.

b) Anche con la tecnica di DINGEMANSE e coll., gli 11-ossisteroidi sono parzialmente trasformati nei Δ_5 -steroidi corrispondenti che passano nelle frazioni dell'androsterone e dell'etiocolanolone, ove vengono da loro dosati col reattivo di PINCUS al tricloruro di antimonio, e quindi calcolati indirettamente.

D'altra parte noi abbiamo introdotto la purificazione dell'estratto grezzo con il reattivo T di Girard, onde evitare molteplici letture a diverse lunghezze d'onda ed i conseguenti calcoli con una delle formule di correzione, procedimento quest'ultimo oggi considerato non esente da errori.

Come è dato di vedere osservando i grafici, tutti i nostri cromatogrammi presentano delle cuspidi (in genere 7), di cui 4, le più notevoli, ricorrono in ogni cromatogramma con costanza di disposizione cronologica e di intensità. Questi risultati concordano con i dati riportati da altri AA., pur avendo questi usato metodiche differenti.

Nei nostri cromatogrammi la prima cuspidè risulta costituita da materiale steroideo alterato ad opera dell'idrolisi estrattiva; la seconda da deidroisoandrosterone; la terza dall'androsterone e la quarta dall'etiocolanolone ^(2, 4, 5). Per controllo noi abbiamo determinato con metodi chimici (reazione di Pettenkofer) alcune proprietà degli steroidi costituenti

la seconda cuspide (¹), e con metodi biologici (modificazione del peso delle vescicole seminali del ratto castrato) quelle degli steroidi costituenti la terza e la quarta cuspide (⁶), sviluppando inoltre dei cromatogrammi di estratti urinari cui erano state aggiunte quantità note di deidroepiandrosterone e di androsterone (¹). Da tali controlli è risultato che: a) la reazione di Pettenkofer compare soltanto in corrispondenza del primo massimo (ove passano i prodotti di trasformazione idrolitica del deidroisoandrosterone) e del secondo massimo; b) le vescicole seminali del ratto castrato aumentano di peso in maniera modesta qualora si inetti l'estratto derivato dalle frazioni corrispondenti al secondo massimo, in maniera notevolmente più importante qualora si inietti l'estratto derivato dalle frazioni corrispondenti al terzo massimo, non si modificano in alcun modo qualora si inietti l'estratto derivato dalle frazioni corrispondenti ad altri massimi; c) l'aggiunta in vitro all'estratto urinario di composizione nota di deidroisoandrosterone e di androsterone determina un aumento esclusivo del secondo, rispettivamente del terzo massimo.

Le cuspidi minori, meno costanti e in genere modeste, sono costituite dagli 11-ossi derivati dell'androsterone e dell'etiocolanolone (⁴, ⁵). Queste cuspidi, poichè non ricorrono sempre in ciascuna determinazione, nè si comportano in maniera caratteristica, non possono essere considerate come paradigmatiche del cromatogramma normale, che rimane pertanto definito solo dalle quattro cuspidi principali sopra descritte.

La determinazione del valore delle singole cuspidi dei vari cromatogrammi ha messo in evidenza delle differenze alle volte notevoli tra individui diversi (spiccato aumento in alcuni casi della 2^o, 3^o, 4^o cuspide, in altri della cuspide 5^o, 6^o: cfr. casi 1-4 U.), differenze che vanno con tutta probabilità riferite a particolari situazioni metaboliche individuali, costituzionali o contingenti, in soggetti del resto, dal punto di vista clinico, apparentemente normali. E infatti, in una donna perfettamente normale, mentre era in stesura questo lavoro, abbiamo avuto occasione di osservare un cromatogramma in cui la cuspide dell'androsterone (3^o) era una prima volta del 48,61% e una seconda volta (a distanza di molti giorni) del 40,07%, valori invero notevolmente alti.

Non siamo riusciti a mettere in evidenza, tra uomini e donne, alcuna differenza sostanziale per ciò che concerne la percentuale delle singole cuspidi, compresa quella del deidroepiandrosterone, trovata percentualmente più bassa da alcuni AA. nelle donne (³): sembra solo che nelle donne sia in genere modestamente più bassa la terza cuspide (androsterone), e modestamente più alta la quarta (etiocolanolone), sempre riferendoci ai valori medi.

Riteniamo a questo punto opportuno far rilevare quanto segue: co-

munemente è in uso esprimere in grafico il risultato dell'analisi cromatografica, ponendo sulle ascisse il numero delle frazioni e sull'ordinata il valore, in microgrammi, della quantità di steroidi contenuta in ciascuna frazione. Ne risulta in genere una curva irregolare che presenta varie cuspidi o massimi, costituiti da una o da più frazioni messe insieme. Orbene,

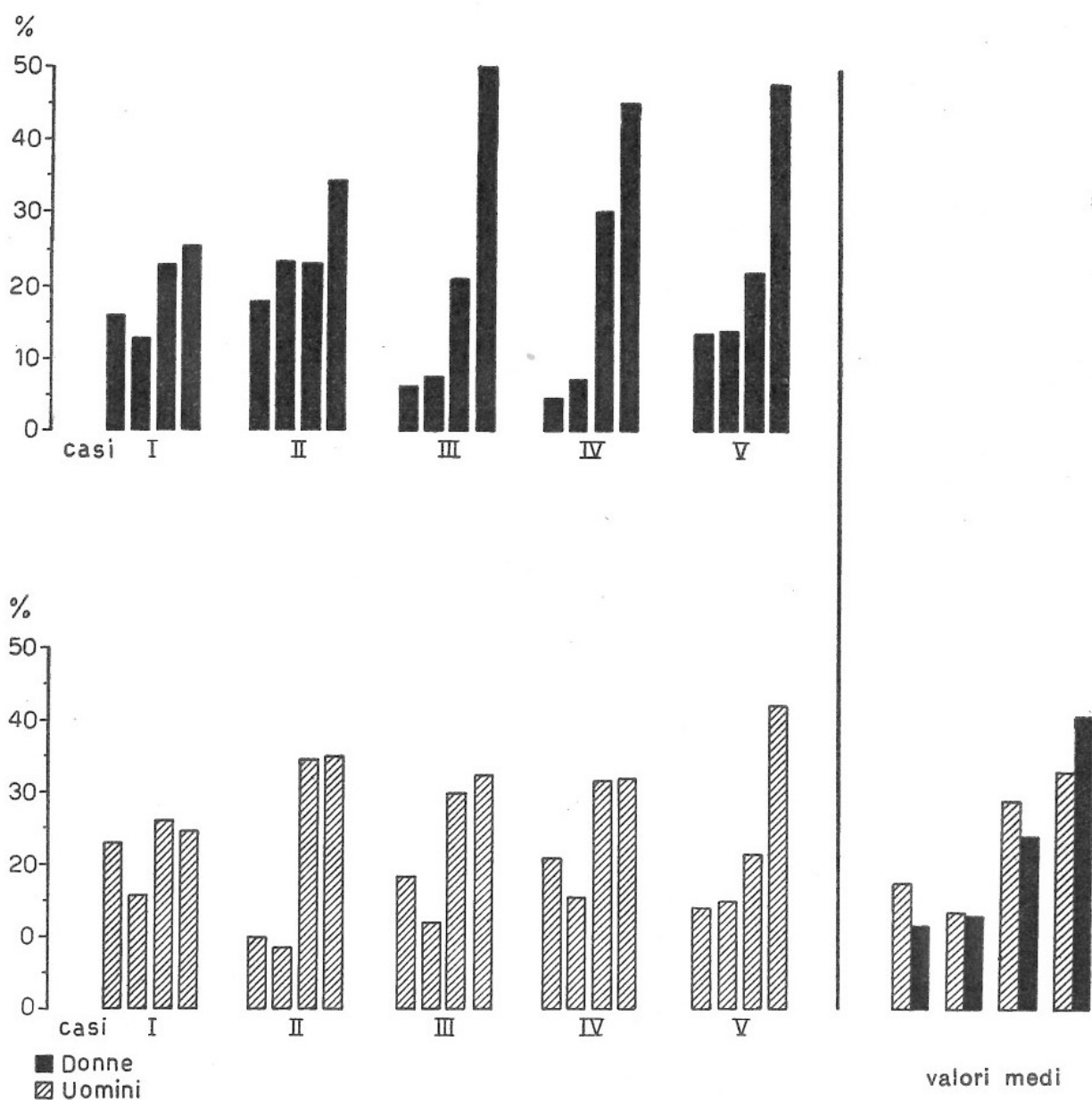


Fig. 3. - Rappresentazione grafica delle aree delle singole frazioni.

poichè ciascuna cuspidè o massimo non è costituita, nei vari cromatogrammi, dallo stesso numero di frazioni, e poichè ciascuna frazione non contiene sempre la stessa quantità di steroidi, ci sembra che il metodo attualmente in uso, per esprimere il risultato dell'analisi cromatografica, non sia interamente soddisfacente ai fini pratici, in quanto, se fornisce un immediato e preciso riferimento dell'altezza e della posizione delle

singole cuspidi, non procura peraltro un'analoga rappresentazione dei valori quantitativi degli steroidi che costituiscono le cuspidi stesse. L'analisi dei vari cromatogrammi alle volte, farebbe pensare che una cuspidi, solo perchè è più elevata di un'altra, contenga una maggiore quantità di steroidi; in effetti non sempre è così ed infatti il calcolo del valore percentuale, che è il più importante, dimostra spesso l'inverso, di qui, secondo noi, l'utilità di affiancare, o addirittura sostituire alla rappresentazione grafica comunemente in uso, la raffigurazione grafica del calcolo delle aree, o — ciò che è lo stesso — del valore percentuale delle singole cuspidi.

Concludendo quindi, ci sembra di poter affermare che:

a) il procedimento da noi proposto per l'indagine cromatografica degli steroidi urinari del tipo 17-cheto risponde appieno ai requisiti richiesti dalle metodiche che debbono servire per scopi clinici, sia per la relativa facilità di esecuzione, sia per la sufficiente precisione — messa in evidenza dalla esatta riproducibilità — sia perchè permette di separare chiaramente le varie frazioni in cui passano i vari aggruppamenti dei 17-chetosteroidi urinari;

b) differenze, alle volte notevoli, esistono tra individuo e individuo nei riguardi dell'ampiezza delle singole cuspidi;

c) praticamente analogo è il comportamento del cromatogramma, sia per quanto riguarda l'andamento che le percentuali delle singole cuspidi, nell'uomo e nella donna.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia e Istituto di Patologia medica e metodologia clinica dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) CAVINA G., NATOLI A., PECORA P. e ZILLI E. - Rend. Ist. Sup. di Sanità, 48: 766 (1953).
- (²) DINGEMANSE S., HUINS in't VELD L., HARTOG-KATZ S. L. - J. Clin. End. and Met. 42: 66 (1952).
- (³) ZYGMUNTOWICS A. S., WOOD M., CHRISTO E. e TALBOT N. B. - J. Clin. End. and Met., 41: 378 (1951).
- (⁴) LIEBERMANN S. e DOBRINER K. - J. Biol. Chem., 172: 241 (1948).
- (⁵) LIEBERMANN S. e DOBRINER K. - J. Biol. Chem., 172: 263 (1948).
- (⁶) LIEBERMANN S. e FUKUSHIMA D. K. - J. Biol. Chem., 182: 299 (1950).
- (⁷) ARATA L., DI GIROLAMO L., MAGLIOCCA R., NATOLI A. e ZILEI E. - Ormonologia (1955).