R. BIBLIOTECA MEDICA ROMA MISCELL. B 55 22

211915

RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.
Estratto dal vol. XXIII, serie 6ª, 1° sem., fasc. 3. - Roma, febbraio 1936-XIV

Fisiologia. — *Saggi biologici e chimici sul prodotto di irradiazione con raggi ultravioletti dell'ormone follicolare* [1]. Nota di M. LAPORTA e C. VACCA, presentata [2] dal Socio F. BOTTAZZI.

Le considerazioni teoriche che ci hanno indotto a intraprendere queste ricerche si basano su una serie di fatti venuti in luce dopo le ricerche di Butenandt, di Doisy, di Marrian e di Girard sulla natura chimica delle sostanze estrogene. Lo studio di queste sostanze dal punto di vista chimico ha fatto rilevare che la loro molecola contiene il nucleo tetraciclico fondamentale del colesterolo, degli acidi colanici e dell'ergosterolo. La differenza consiste nel possedere queste ultime sostanze una catena laterale unita al quarto ciclo pentametilenico, della quale è privo invece l'ormone follicolare. Dal paragone poi fra il nucleo costitutivo dell'ormone e quello dell'ergosterolo risalta una più stretta analogia: l'ormone estrogeno possiede nel suo nucleo tre doppi legami, mentre l'ergosterolo ne possiede due, in luogo dell'unico doppio legame esistente nel colesterolo e derivati.

Se, dunque, come è ormai notorio, dall'ergosterolo sottoposto alla irradiazione si generano una serie di sostanze di cui una è la vitamina antirachitica, data la stretta parentela chimica dell'ormone follicolare con l'ergosterolo, è logico attendersi che sottoponendo ad un simile trattamento una delle sostanze estrogene, questa debba subire trasformazioni analoghe a quelle dell'ergosterolo, per cui l'ormone potrebbe acquistare nuove proprietà biologiche oppure perderne alcune.

Tra le tante azioni biologiche assegnate all'ormone follicolare, ne abbiam preso in esame soltanto alcune, che ci sembrarono di interesse particolare e le abbiamo studiate in preparati ormonici prima e dopo la irradiazione al fine di stabilire un confronto sicuro; abbiamo pertanto preso in esame l'azione sul ciclo estrale, quella antimascolina e quella ipercalcemizzante.

Sul primo di questi tre effetti, consistente in quelle modificazioni della mucosa vaginale e uterina, che caratterizzano il ciclo estrale dei mammiferi, non è il caso di intrattenersi a lungo, giacchè troppo note ormai in tutte le loro fasi e le meglio studiate.

Quanto all'azione *antimascolina*, così definita da Laqueur e dalla sua scuola, confermata da Pepe e Vacca [3] ed ormai universalmente accettata, di-

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia sperimentale della R. Università di Napoli
(2) Nella seduta del 2 febbraio 1936.
(3) « Boll. Soc. It. Biol. sperim. », 1933, *8*, 1782.

B 55 22

ciamo brevemente in che essa consiste. L'ormone follicolare, iniettato in un maschio (ratto) esplica la sua azione dapprima sull'epitelio seminifero, poi sul testicolo *in toto*. Le sezioni microscopiche di testicolo di ratto sottoposto a trattamento con follicolina fanno rilevare, in seguito ad un trattamento breve, un arresto della spermioistogenesi e, per un trattamento più lungo, una involuzione di tutti gli elementi che compongono la linea seminale; infine involuzione di tutti gli elementi che compongono il testicolo: forte diminuzione del lume dei tubuli, che si mostrano vuoti quasi del tutto di elementi germinali e ridotti alla sola membrana propria; aumento modico del connettivo; scomparsa delle cellule di Leydig; fortissima diminuzione del peso del testicolo, in confronto a quello medio di animali di controllo del medesimo peso e della stessa età.

Circa l'azione ipercalcemizzante posseduta dall'ormone follicolare, si devono considerare a tal proposito conclusive le ricerche di Saviano (1). Questo A. ha dimostrato che il calcio ematico aumenta soltanto dopo un certo tempo dall'inizio del trattamento con l'ormone, in animali (cani) maschi e che, raggiuntosi un determinato valore, la calcemia declina più o meno rapidamente, raggiungendo valori uguali a quelli precedenti il trattamento ormonico.

Allo studio del come si modificano queste tre azioni biologiche dell'ormone follicolare in seguito alla esposizione di esso ai raggi ultravioletti, sono state rivolte queste ricerche.

Gli ormoni usati, e che dobbiamo alla cortesia di due grandi ditte (2), rispondono, come individui chimici, uno all'estrone (chetoidrossiestrina), l'altro ad un suo prodotto di riduzione l'*estradiol* di David. Di queste due sostanze a potere estrogeno noto, si preparava una soluzione in diossano (o benzolo), che, dopo eventuale irradiazione, veniva versata in pallone tarato contenente una soluzione alcalina, così composta: NaCl 0,5 %; $Na_3 PO_4$ 0,5 % NaOH 0,04 %. La miscela veniva poi liberata dal solvente oganico mediante distillazione nel vuoto a bassa temperatura ed infine riportata a volume con altra soluzione alcalina. In qualche caso l'irradiazione fu eseguita sulla soluzione acquosa dopo aver allontanato il solvente organico.

Per lo studio dell'azione estrogena ci siamo serviti di ratte castrate e per la titolazione delle soluzioni di ormone, della prova di Allen e Doisy. Non sono mai state usate meno di 10 ratte.

L'azione antimascolina è stata seguìta su giovani ratti (non meno di 5) dai quali, alla fine del trattamento, si prelevava un testicolo. Il peso di questo veniva confrontato con quello del testicolo di ratti di uguale età non trattati, e dopo, con la tecnica usuale, si allestivano alcuni preparati istologici. Quanto al trattamento ci siamo attenuti alle direttive generali seguite nelle citate ricerche di Pepe e Vacca.

(1) « Mem. R. Acc. Lincei », 1935, ser. 6ª, vol. III, p. 165.

(2) Cogliamo qui l'occasione di ringraziare la ditta Degewop e la G. Richter per la cortesia usataci.

Per lo studio della calcemia siamo ricorsi al cane maschio normale, preferendo il maschio alla femmina, non soltanto per metterci al riparo di eventuali variazioni cicliche del calcio ematico dipendenti dal ciclo estrale, ammesse da molti AA.; ma anche perchè la somministrazione di dosi relativamente elevate di ormone può produrre sul maschio effetti più cospicui che nella femmina, il cui organismo è abituato alle grandi dosi di ormone. Il calcio è stato determinato col metodo di Kramer e Tisdall su almeno due campioni di siero di sangue estratto dalla giugulare esterna.

La irradiazione è stata eseguita esponendo alla luce di una lampada in quarzo a vapori di mercurio (del tipo Gallois) l'ormone sciolto in benzolo o in diossano, in strati non superiori a 2 mm. La durata della irradiazione si è creduto di mantenerla costante: 30 minuti di esposizione a 30 cm. di distanza dalla sorgente luminosa.

Risultati.

1. *Azione estrogena.* — La risposta alla iniezione di 1 unità internazionale dei due ormoni non irradiati in 12 ratte castrate e in stato di diestro è stata del 100 %, e l'estro è durato in media 24 ore; gli stessi ormoni irradiati, iniettati in quantità corrispondenti a 1 unità han provocato l'estro in tutti gli animali, è durato ben 4 giorni.

2. *Azione antimascolina.* — Di 22 ratti normali in periodo pubere, 4 furono usati come controlli (ricevevano *pro die* 1 cc. della semplice soluzione alcalina per via ipodermica); 9 vennero trattati con estrone e col suo prodotto di irradiazione, e precisamente: 3 ricevettero 50 U. I. *pro die*, 3 una quantità uguale del suo prodotto di irradiazione e 3 una quantità doppia di quest'ultimo. Altri 9 animali furono trattati con l'estradiol, e precisamente: 3 ricevettero 50 U. I. *pro die* dell'ormone non irradiato, 3 una uguale quantità del prodotto di irradiazione e 3 una quantità doppia di quest'ultimo. Dopo 30 giorni di trattamento tutti gli animali furono emicastrati, tranne 4 che vennero lasciati integri, e che erano stati trattati coi prodotti di irradiazione, due con 50 unità e 2 con 100 U. *pro die*. Dei testicoli, dopo averne annotato il peso, furono allestiti preparati istologici.

Il peso dei testicoli degli animali trattati con gli ormoni non irradiati risultò metà circa di quello dei testicoli dei ratti controllo e di quello dei ratti trattati con i prodotti di irradiazione dei due ormoni. L'esame istologico comparativo dimostrò che non vi era differenza tra i testicoli di ratti normali di controllo e quelli degli animali trattati coi prodotti della irradiazione degli ormoni; mentre quelli degli animali trattati con gli ormoni non irradiati erano in piena atrofia. Inoltre i ratti, non castrati, che avevano ricevuto 50 e 100 unità dei prodotti della irradiazione, posti in compagnia di femmine vergini, le ingravidarono.

3. *Azione sulla calcemia.* — Dalle esperienze eseguite su 4 cani, iniettando dosi di 500 U. I. *pro die* si è visto che l'azione ipercalcemizzante, posseduta dagli ormoni con cui si è sperimentato, scompare se l'irradiazione venne eseguita sul materiale sciolto in diossano o benzolo, mentre permane qualitativamente e quantitativamente inalterata se la irradiazione venne eseguita su soluzioni acquose. Gli ormoni, però, irradiati in soluzione acquosa, conservano il potere estrogeno, ma non quello antimascolino.

4. *Variazioni di alcune costanti chimico-fisiche degli ormoni sottoposti all'irradiazione.* — Sono stati studiati il punto di fusione e la rotazione specifica. In tutti e due gli ormoni è stata constatata una forte depressione del punto di fusione e della rotazione specifica, che diviene sempre più spiccata col procedere della irradiazione.

La reazione colorata di Kober (all'acido fenolsolforico), specifica dell'ormone follicolare non scompare. Si è notato un aumento della fluorescenza verde nei prodotti dell'irradiazione.

Senza voler, almeno per ora, entrare in discussioni circa la interpretazione dei resultati ottenuti, si può concludere che:

L'estrone (e il suo prodotto di riduzione, l'estradiol) sottoposto alla irradiazione ultravioletta in soluzione benzenica o in diossano:

a) conserva la sua attività di indurre l'estro nella ratta castrata e l'estro dura più a lungo che non col prodotto non irradiato;

b) l'azione antimascolina, caratteristica delle sostanze estrogene, scompare completamente;

c) l'azione ipercalcemizzante va anch'essa perduta, quando l'irradiazione sia stata fatta in solvente organico; è conservata, invece, quando l'irradiazione è stata fatta in soluzione acquosa;

d) la rotazione specifica diminuisce e il punto di fusione si abbassa col progredire della irradiazione; permane invece la reazione di Kober (colorazione rosa con acido fenolsolforico a caldo).

È da presumere che con la irradiazione si generano dagli ormoni estrogeni, analogamente a quanto accade per l'ergosterolo, isomeri ad azioni biologiche differenti.

55726