

Misc B76 / 77

REALE ACCADEMIA D'ITALIA

MEMORIE DELLA CLASSE
DI SCIENZE FISICHE, MATEMATICHE E NATURALI
VOLUME VI.

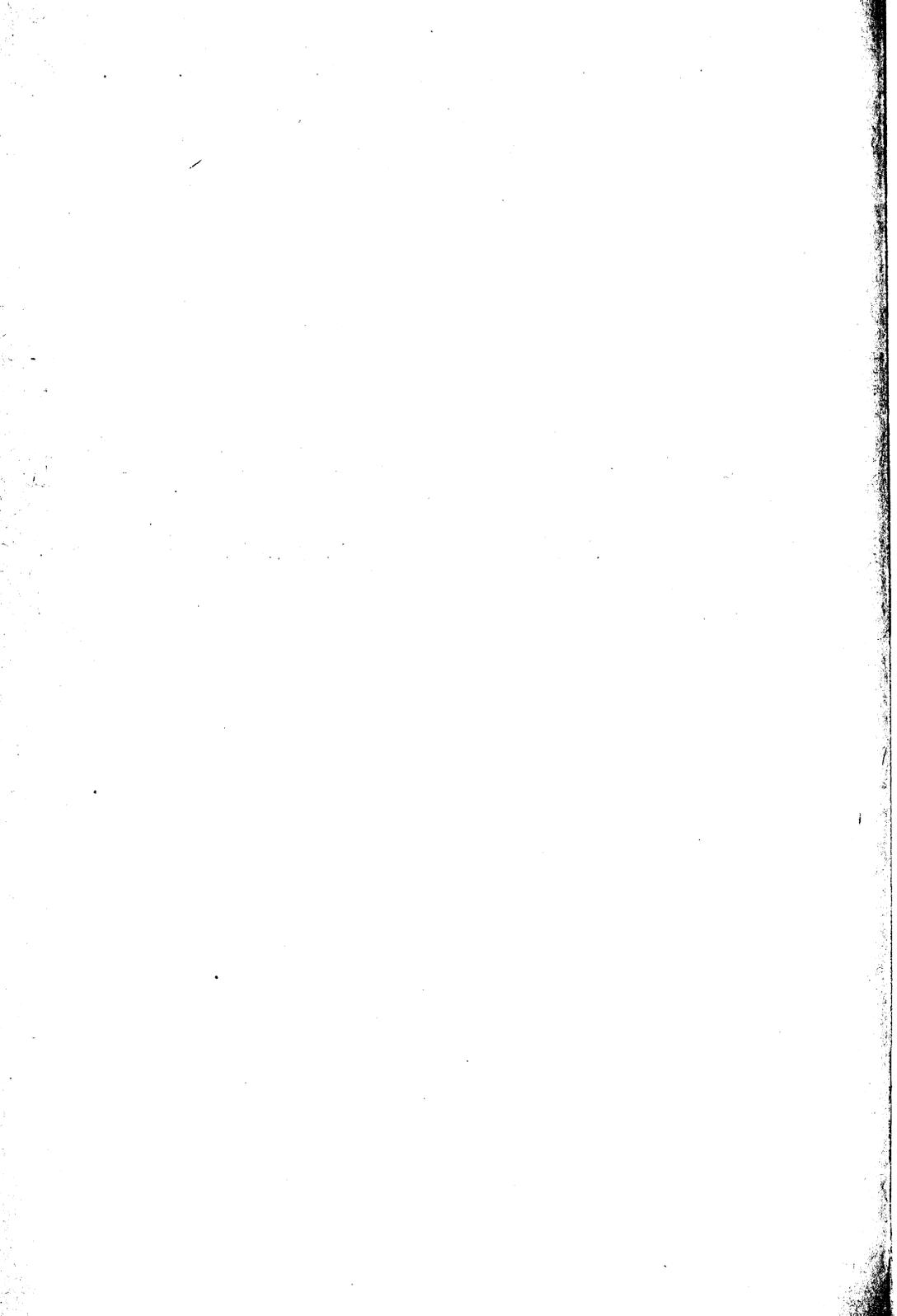
ESTRATTO N. 5.

LUISA POZZI

Le catepsine - Esposizione critica
e ricerche sperimentali



ROMA
REALE ACCADEMIA D'ITALIA
1935-XIII





REALE ACCADEMIA D'ITALIA

MEMORIE DELLA CLASSE
DI SCIENZE FISICHE, MATEMATICHE E NATURALI

VOLUME VI.

ESTRATTO N. 5.

LUISA POZZI

Le catepsine - Esposizione critica
e ricerche sperimentali

ROMA
REALE ACCADEMIA D'ITALIA

1935-XIII

LE CATEPSINE - ESPOSIZIONE CRITICA E RICERCHE SPERIMENTALI

Memoria di LUISA POZZI (*)

RIASSUNTO. — Dopo un'esposizione critica dei recenti sviluppi della dottrina delle catepsine o proteasi endocellulari e relative applicazioni nel campo patologico, si sono studiati gli attivatori della funzione catepsica ed alcuni agenti inibitori; si è ripreso in esame e discusso il rapporto tra azioni ossidanti e resintesi proteica, in base anche ai precedenti lavori della scuola: è stato studiato mediante aggiunta di sieri alle miscele digestive se relazioni immunologiche in vario senso influenzino la autoproteolisi negli organi; e si è stabilita una riduzione della funzione catepsica nel rene ischemico per legatura dell'arteria.

I. - NOZIONI FISILOGICHE.

Un gruppo importantissimo di enzimi proteolitici è quello che è stato denominato catepsine da WILLSTÄTTER e BAMANN e sostanzialmente corrisponde ai vecchi *fermenti autolitici*, quelli cioè che, contenuti entro le cellule e tenuti in freno durante la vita, vengono dopo la morte cellulare ad agire sulle strutture proteiche proprie delle cellule stesse ed a disintegrarle idroliticamente, operando così la autolisi od autodigestione postvitale dei tessuti, quale può comodamente osservarsi e seguirsi *in vitro*. Si tratta di enzimi *non secreti* dalle cellule, come quelli che funzionano nel tubo digerente, ma eminentemente endocellulari e pertanto studiabili solo dopo estrazione o liberazione dalle cellule. La loro conoscenza, derivata dallo studio dei fenomeni di autolisi dei più diversi tessuti,

(*) Presentata nell'Adunanza del 9 novembre 1934-XIII, dall'Accademico PIETRO RONDONI.

è tutt'altro che recente; ma sono recenti alcuni perfezionamenti nella tecnica di studio, come i tentativi di purificazione e la definizione più precisa delle condizioni della loro funzione: così la fissazione della reazione attuale ottimale e la conoscenza di alcuni *attivatori*.

Per quanto riguarda la reazione attuale ottimale, si può concludere che essa corrisponde precisamente al punto isoelettrico delle proteine fungenti da substrato: in altri termini le catepsine agiscono su proteine elettricamente neutre. Questo fatto anzi oggi assume a valore di elemento di definizione di questi enzimi proteolitici, che sono appunto detti costituire un *terzo gruppo* in opposizione ai due gruppi di proteasi tipicamente descritti nel tubo digerente, le peptasi e le triptasi, caratterizzate dall'azione ottimale rispettivamente su proteine in funzione di catione o di anione (NORTHROP) e quindi con carica elettrica positiva o negativa e perciò a distanza — nell'un senso o nell'altro — dal punto isoelettrico. Siccome per la maggior parte delle proteine il punto isoelettrico è in reazione leggermente acida, così anche l'*optimum* delle proteinasi catepsiche (e parliamo qui dunque di vere proteinasi o enzimi agenti su proteine integre) è a tale reazione: di regola corrisponde a $\text{pH} = 4$ circa, probabilmente con piccole differenze a seconda degli organi e di altri fattori collaterali. Secondo KLEINMANN e STERN parrebbe tuttavia che l'*optimum* venisse a spostarsi alquanto verso la reazione acida quando si lavora con enzimi catepsici al possibile purificati.

Gli studi della Scuola di WILLSTÄTTER ed in specie di WALDSCHMIDT-LEITZ, SCHÄFFNER, BECK e BLUM hanno molto approfondito la questione della purificazione delle catepsine, della loro titolazione (unità catepsiche) e soprattutto la questione degli *attivatori*. Le catepsine sono attivate da HCN ed H_2S , al pari degli enzimi proteolitici studiati da GRASSMANN e collaboratori nei lieviti ed al pari della *papaina*, altro enzima vegetale, che ha singolare analogia di azione, anche per riguardo al *pH optimum*, colle catepsine dei tessuti animali. Inoltre le catepsine sono attivabili da un attivatore naturale, che fu dapprima chiamato *zoochinasi* e che si può separare dall'enzima a causa della sua solubilità in alcool diluito ed in acetone ed anche mediante la sua adsorbibilità a caolino in reazione acida; e qui pure si avrebbe piena analogia coi suddetti enzimi vegetali, che sarebbero pure attivabili da una *fitochinasi* con analoghe proprietà (AMBROS e HARTENECK). Ulteriormente si è dimostrato da GRASSMANN, SCHOENEBECK e EIBELER che l'attivatore naturale delle proteasi dei lieviti non è che glutatione; e ad analoga conclusione sono giunti WALDSCHMIDT-LEITZ e PURR per riguardo alla così detta *zoochinasi* o attivatore organico delle catepsine. Il glutatione viene così ad essere riconosciuto come un attivatore importante di tutto questo gruppo di enzimi animali (proteinasi catepsiche) e vegetali (*papaina* e proteinasi di lieviti), che sono poi tutti enzimi intracellulari od istoenzimi. Tale funzione è però propria

solo del glutatione ridotto od SH-glutatione; mentre il SS-glutatione o glutatione in forma di disolfuro (ossidato) non la possiede. E si innesta qui la importante questione della concatenazione fra fenomeni ossidriduttivi e fenomeni proteolitici. Si è riconosciuto cioè che una funzione attivatrice delle catepsine spetta al gruppo -SH o gruppo sulfidrilico, contenuto appunto nell' H_2S stesso, nella cisteina ed in quel tripeptide che è il glutatione; e WALDSCHMIDT-LEITZ e PURR hanno (1931) nettamente formulato l'ipotesi di « un governo del metabolismo endocellulare delle proteine a mezzo del potenziale ossido-riduttivo nel senso della idrolisi come della sintesi », supponendo che, come la dominanza di un basso potenziale ossidativo col permettere la permanenza del glutatione e della cisteina ed eventualmente di altri corpi in forma ridotta è favorevole alla proteolisi, così la accentuazione dei fenomeni ossidativi, condizionando la ossidazione dei corpi sulfidrilati ed altri eventuali attivatori, verrebbe a sopprimere i fenomeni di proteolisi e favorire anzi la proteosintesi.

Questa opinione concorderebbe con osservazioni fatte da MOTHES nel regno vegetale, secondo le quali certe sostanze fungerebbero da regolatori del ricambio proteico nei semi e nei germogli e precisamente favorendo nelle diverse fasi vegetative processi disintegrativi o sintetici a seconda che esse sono in stato ridotto od ossidato. Una conferma precisa poi verrebbe da VOEGLIN e MAVER che trovano la diminuzione della tensione di ossigeno favorevole al progredire della proteolisi in tessuti normali e neoplastici.

Ma su questo punto cui è stata dedicata speciale attenzione in questo Laboratorio, tornerò in seguito più per esteso. Qui voglio brevemente accennare alla discussione svoltasi fra alcuni studiosi sulla reale natura del processo di attivazione da corpi sulfidrilati delle proteinasi catepsiche. È intanto certo che la attivazione in parola non ha nulla a fare con quella della proteinasi (e carbossipolipeptidasi) triptica da enterochinasi: questa, secondo un'opinione sostenuta già da HAMBURGER ed HEKMA e da DASTRE e STASSANO, eppoi sperimentalmente appoggiata da WALDSCHMIDT-LEITZ (1924) si combina in proporzioni stechiometriche colla tripsina, la combinazione essendo reversibile ed agisce probabilmente modificando soprattutto lo stato elettrochimico dell'enzima, la cui funzione presuppone una certa carica (negativa) del substrato. Forse la enterochinasi può anche in parte agire legando ed inattivando certe sostanze organiche inibitrici (GRASSMANN). L'attivazione delle proteinasi catepsiche non si svolge, a quanto pare, in proporzioni definite, sebbene i dati quantitativi siano tutt'altro che ben chiari; nè pare che abbiano qui importanza modificazioni elettrochimiche dell'enzima o del substrato. Secondo un'opinione già ventilata da qualche precedente autore (GRASSMANN) ma soprattutto sostenuta da KREBS (1930) la funzione del HS-glutatione e di tutti i corpi sulfidrilati, come dello stesso HCN rispetto alla papaina ed alle

cathepsine sarebbe riconducibile alla combinazione di cui queste sostanze sono suscettibili colle tracce di metalli pesanti, che mai mancano nelle miscele enzimatiche e che sono veri *avvelenatori* degli enzimi. I presunti attivatori sarebbero dunque dei « *Komplexbildner* » o formatori di complessi coi metalli o veleni dell'anzima; e simulerebbero una vera azione attivante solo eliminando delle azioni paralizzanti. Questa concezione è combattuta energicamente da WALDSCHMIDT-LEITZ e collaboratori e non è appoggiata dalle osservazioni di STERN, secondo le quali certi metalli attiverebbero anzichè paralizzare le cathepsine e fra i primi anche dei sicuri formatori di complessi (con HCN e corpi sulfidrilati) come il ferro. Del resto la funzione del gruppo —SH come modificatore di attività enzimatiche si è allargata molto secondo ulteriori ricerche: WALDSCHMIDT-LEITZ, SCHARIKOWA e SCHÄFFNER e WALDSCHMIDT-LEITZ, WEIL e PURE (1933) evidenziano tutte queste funzioni in rapporto a diversi enzimi, che hanno importanza nel metabolismo intermedio delle proteine e dei carboidrati. Così l'*arginasi* pare, ad onta di risultati in primo tempo incerti e contraddittori (SALASKIN e SOLOWJEW; EDLBACHER e collaboratori KLEIN e ZIESE), attivata, ma non dal solo gruppo sulfidrilico (che in certi casi, come in reazione debolmente acida, inibisce), bensì dal complesso costituito da un composto sulfidrilato e da ferro. Troviamo qui dunque all'opera una specie di sistema attivatore complesso costituito da un metallo pesante e da un corpo organico sulfidrilato, come cisteina. I composti sulfidrilati inibiscono la funzione di alcune *fosfatasi*: così di fosfatasi che scindono alcuni esteri dell'acido fosforico, di nucleotidasi (che staccano acido fosforico da acido nucleinico) e di quelle fosfatasi che staccano l'acido fosforico dall'acido creatinfosforico; allo stato ossidato quei composti perdono tale funzione inibitrice: onde la possibilità che il potenziale ossido-riduttivo influenzi per tal via anche il metabolismo di carboidrati, dell'acido nucleinico e (muscolo?) di complessi guanidino-fosforici.

Ma studi ulteriori hanno portato a riconoscere l'ingranaggio nella funzione cathepsica anche di un'altra sostanza, essa pure altamente riducente, essa pure probabilmente fungente da trasportatrice di idrogeno nei processi delle ossidoriduzioni organiche: l'acido ascorbico o vitamina C. KARRER e ZEHENDER e, indipendentemente, PURE hanno dimostrato la funzione attivante dell'acido ascorbico di fronte a cathepsine di tessuti diversi, i primi lavorando con estratti enzimatici di fegato di porco privati degli attivatori naturali mediante trattamento con acetone ed etere, il secondo lavorando con estratti integrali di un tumore. L'argomento è stato approfondito da EULER, KARRER e ZEHENDER, i quali affermano un'azione attivante, sia pure più limitata, del così detto *reductone* dal glucosio; e trovano che ferro- e ferrijoni, come Ca-joni elevano il potere attivante dell'acido ascorbico, mentre i sali rameici hanno azione inibente. Questi Autori discutono la questione dei *complessi* ed osservano

che sono attivatori in genere quei corpi che legano il rame, agente inibitore per le catepsine. I corpi riducenti come la cisteina e l'acido ascorbico potrebbero agire anche proteggendo le catepsine dall'azione dannosa dell' O_2 ; o comunque creando un sistema labile ossido-riduttivo necessario per il decorso del processo enzimatico. Notovole l'osservazione di EULER e collaboratori che l'acido deidroascorbico, reperibile pure nell'organismo secondo WOLFF e collaboratori e dotato di una interessante azione deidrogenante sugli aminoacidi, non ha funzione attivante per le catepsine. MASCHMANN e HELMERT hanno frattanto studiato l'influenza dell'acido ascorbico sulla papaina, trovando che l'enzima è inibito dalla vitamina, ma attivato dal sistema vitamina + ferro. Il Cu avrebbe azione inibitrice. Vi sarebbero però differenze a seconda del substrato (gelatine di diverse specie, peptoni) usato; ed anche per l'influenza accelerante dell'acido ascorbico sulle catepsine si hanno differenze a seconda del substrato e soprattutto della origine delle catepsine. È supposto che grosse dosi di acido ascorbico abbiano piuttosto funzione inibente. L'azione dell'acido ascorbico, che non è certo un formatore di complessi col Fe ed altri metalli pesanti, mostrerebbe come influenze attivatrici si possano avere indipendentemente dalla soppressione di azioni paralizzanti di tracce metalliche nelle miscele reattive. Interessanti sono le considerazioni di BERSIN, in parte sulla linea dei lavori di MASCHMANN e HELMERT e le osservazioni sulla influenza di agenti riducenti ed ossidanti sulla papaina: i solfiti attivano la papaina al pari di H_2S ed HCN ; ed in genere ciò fanno tutti quei corpi riducenti i quali sono in grado di trasformare i disolfuri in mercaptani, appunto perchè la papaina attiva avrebbe natura di mercaptano ($PaSH$), mentre la inattiva avrebbe natura di disolfuro ($PaSSPa$). Anche una irradiazione non troppo prolungata con raggi ultravioletti attiverebbe tale trasformazione e però eleverebbe la funzione proteolitica della pelle e del sangue. Ma evidentemente qui si fa una serie di assunzioni un po' frettolose; e soprattutto BERSIN non giustifica affatto l'affermazione che l'attivazione di enzimi cateptici conduca ad elevazione del potere battericida dei tessuti e liquidi organici. Come sarà detto anche in seguito, il rapporto fra funzioni immunitarie e funzioni cateptiche è dei più oscuri.

Oltre ad una attivazione da sostanze riducenti o da sistemi di tali sostanze e metalli pesanti (come acido ascorbico + Fe), si deve, dopo le ricerche di RONDONI, anche riconoscere un'accelerazione da *fosfatidi*, di cui questo Autore ha studiato lecitina e cefalina sintetica in primo tempo, poi anche lecitina *ex ovo* (1932): si tratta di un'azione accelerante e non di una attivazione, come nei casi precedenti, il fosfatide non potendo sostituire l'attivatore vero, per es. H_2S od il corpo sulfidrilato, ma potendo solo e probabilmente in virtù di fenomeni di adsorbimento con enzima e substrato proteico, accelerare la funzione idrolitica dell'enzima debitamente attivato.

Non è il caso di riportare la immensa mole dei lavori sulle proteasi endocellulari, studiate coi metodi classici della autolisi. I lavori recenti, surriferiti brevemente, diversificano soprattutto per la tecnica, perchè studiano l'azione delle proteinasi catepsiche su substrati artificialmente aggiunti e non sulle proteine proprie del tessuto: si usa per lo più gelatina o peptone, di rado (e così in un lavoro non più recentissimo di A. CLEMENTI) caseina e si tende a negare alle catepsine una *specificità di organo*. È dubbio se ciò significhi un progresso in tutti i casi ed abbia davvero avvantaggiato la conoscenza del significato fisiologico delle catepsine. Si può infatti discutere se l'attivazione da corpi sulfidrilati ed altre importanti proprietà evidenziate coi metodi recenti nelle catepsine, siano dimostrabili anche quando si lasciano agire gli enzimi sui loro substrati naturali (proteine proprie degli organi): così RONA e KLEINMANN, KLEINMANN affermerebbero che solo se si usa gelatina come substrato occorre un'attivazione da H_2S . Ricerche recenti di ABDERHALDEN e SCHWAB avrebbero dimostrato inoltre che, conforme alle antiche osservazioni e contrariamente alla concezione venuta di poi sulla base dei citati lavori, una specificità degli enzimi endocellulari per rispetto alle proteine proprie dell'organo esisterebbe: così le proteinasi che manifestano la loro azione nella autolisi del fegato sarebbero, in primo tempo elettivamente atte ad idrolizzare le proteine epatiche; e solo col progredire del processo disintegrativo comparirebbero proteinasi che attaccano anche proteine di altra origine. Di poi anche nel polmone, cuore, rene e surrene questi Autori hanno trovato proteinasi organospecifiche; e solo nella milza non si riuscì a dimostrare in nessuna fase del processo autolitico un'attività enzimatica diretta solo sul tessuto splenico, il che potrebbe, secondo gli Autori, dipendere semplicemente dalla gran ricchezza in leucociti coi loro enzimi aspecifici.

Si ha qui un accenno ad un fatto importante, derivato dalle osservazioni della Scuola di WILLSTÄTTER sullo stato degli enzimi nelle cellule: notoriamente WILLSTÄTTER ha distinto per alcuni enzimi (proteasi, amilasi ecc.) uno stato di *desmoenzima* ed uno di *lioenzima*: nel primo caso l'enzima è incluso, come murato, in edifici molecolari molto complessi, nel secondo è liberato o smascherato. I fermenti sono spesso presenti nelle cellule come desmoenzimi, non facilmente estraibili; ma una disintegrazione iniziale, per esempio per un blando processo di autolisi, li solubilizza e li libera e li rende facilmente accessibili, come lioenzimi, ai mezzi di estrazione. Così lo stesso WILLSTÄTTER e RHODEWALD hanno studiato nella mucosa gastrica una desmopepsina ed una desmocatepsina. Ora per le catepsine di molti organi normali e di tumori MASCHMANN e HELMERT (1933) hanno soprattutto fatto attenzione alla possibilità che le catepsine siano, oltre che in parte attivate (da attivatori naturali, come glutatione, ecc.), ed in parte no, anche in parte libere e facilmente estraibili, come liocatepsine, ed in parte (nel fegato) insolubili come desmoeca-

tepsine e dimostrabili nei residui di estrazione per l'azione diretta sul substrato; tuttavia per i tumori essi concludono che il 90 % circa delle catepsine sono facilmente estraibili con glicerina acidificata e perciò presenti come lioenzimi.

Si è sempre espressamente parlato finora di proteinasi catepsiche; ora dobbiamo aggiungere che le ricerche moderne hanno largamente dimostrato che l'apparato enzimatico proteolitico endocellulare comprende, oltre a delle proteinasi od enzimi idrolizzanti proteine naturali più o meno complesse, anche degli enzimi agenti sopra a peptidi preparabili per sintesi e di diversa complessità. In analogia a quanto si sa per alcuni secreti digestivi, si può dire che anche nei tessuti sono contenute delle *peptidasi*, che la scuola di WILLSTÄTTER chiama *peptidasi catepsiche* e distingue in *carbossipolipeptidasi*, *aminopolipeptidasi* e *dipeptidasi*, raggruppando queste ultime (aminopolipeptidasi + dipeptidasi) sotto la denominazione di *ereptasi* o enzimi ereptici. La differenza di azione più sostanziale sta nel punto di attacco al substrato, la carbossipolipeptidasi fissandosi al carbossile libero nei peptidi di diversa complessità, le aminopolipeptidasi e dipeptidasi invece fissandosi all'aminogruppo libero. Queste poi, le aminopolipeptidasi e le dipeptidasi, si distinguono fra loro perchè le prime attaccano peptidi costituiti da almeno 3 aminoacidi, le seconde soltanto i dipeptidi. Non è il caso di riferire qui tutti gli sviluppi moderni, in parte imperfetti, sopra a tutto questo armamentario enzimatico nei tessuti (WALDSCHMIDT-LEITZ, SCHÄFFNER, BECK e BLUM; KLEINMANN e STERN; ABDERHALDEN e SCHWAB ecc.). Si riporta solo il pH ottimale di reazione di ciascun enzima ed il substrato sintetico atto alla dimostrazione.

Carbossipolipeptidasi: pH ottimale 4,2; azione su benzoilglicilglicina (richiede attivazione da H_2S).

Ereptasi { *Aminopolipeptidasi*: pH ottimale 8; azione su d, l-leucilglicilglicina
Dipeptidasi: pH ottimale 8; azione su d, l-leucilglicina e precisamente sul componente l soltanto.

Le ereptasi si somigliano per eguale *optimum* di reazione in ambiente alcalino e per la assenza di attivazione da H_2S , glutazione ecc.; e si contrappongono alle carbossipolipeptidasi; che accompagnano più strettamente le proteinasi, hanno *optimum* in reazione acida come queste ecc.: il tutto analogamente a quanto accade nel secreto e negli estratti pancreatici. Si può dire anzi che in generale H_2S ed HCN sono per le ereptasi agenti inibitori o veleni.

Secondo osservazioni di RONA e KLEINMANN, di WILLSTÄTTER, BAMANN e RHODEWALD (1930), K. STERN (1931 H. S. Z.) i leucociti polinucleati (serie mieloidi) contengono anche una vera triptasi cioè una pro-

teinasì agente in reazione alcalina come la tripsina, tanto che taluno suppone che i leucociti siano la sorgente della tripsina pancreaticà. A quest'ultima opinione si opporrebbe il fatto che la triptasi leucocitaria non è attivabile da chinasi (STERN); ma questo non sarebbe un carattere differenziale assoluto perchè anche nel pancreas pare esistere una tripsina meno solubile, come desmoenzima e di suo attiva, dunque non richiedente attivazione enterochinasi (WILLSTÄTTER e RHODEWALD, 1932, vol. 204). Così i leucociti polinucleati contengono una triptasi, una vera catepsina e delle peptidasi; mentre i linfociti ed i mononucleati contengono solo l'enzima catepsico e le peptidasi al pari delle cellule di quasi tutti gli organi. Tracce di triptasi reperibili in organi diversi possono essere dovute a presenza di leucociti; ma non pare che enzimi triptici facciano parte dell'armamentario interno normale delle cellule: le vecchie osservazioni di HEDIN, che studiando la proteolisi splenica notò un *maximum* di attività a pH 8 (α -lienoproteasi) ed uno a pH 4 circa (β -lienoproteasi) sono oggi spiegabili col fatto che a pH 8 risultava l'azione di ereptasi allora ignote che hanno *optimum* di azione proprio a quel pH (WALDSCHMIDT-LEITZ e DEUTSCH, KLEINMANN e STERN). Anche le recenti ricerche di BORGER proprio su milze normali e patologiche parlano per la presenza solo di catepsine con *optimum* a pH 4 e di ereptasi con *optimum* a pH 8, queste ultime paralizzabili da glutazione ridotto e HCN, che viceversa attivano le prime.

Infine si potrebbe ricordare studi sopra il contenuto enzimatico di *estratti embrionali*, di quegli estratti che hanno anche la nota azione eccitante sulla crescita degli esplantati: CARREL, CARREL e BAKER, A. FISCHER: si devono qui ricerche coi metodi della chimica enzimatica a BORGER e PETERS, che trovano in embrioni di pollo una certa abbondanza di dipeptidasi, meno di aminopolipeptidasi, le une e le altre con un *optimum* in zona più alcalina (pH 8,5) delle comuni ereptasi dei tessuti (pH 8); assenza di proteinasi negli estratti acquosi, una piccola quantità però in estratti allestiti con glicerina acida; e soprattutto alto contenuto proteinasiaco nelle membrane ovariali, conforme a quanto trovò anche KREBS (vol. 238). Nell'insieme le attività proteolitiche dimostrabili *in vitro* non sono molto elevate nei tessuti dell'embrione di pollo; ma si può bensì supporre con BORGER e ZENKER che questi enzimi abbiano importanza per la disintegrazione dei materiali nutritivi e per offrire al tessuto in crescita una certa disponibilità di proteosi ed altri prodotti disintegrativi (CARREL e BAKER) capaci di essere utilizzati. Si spiegherebbe così la inattivazione della funzione eccitatrice per la crescita degli esplantati colla conservazione e col riscaldamento degli estratti ossia con la distruzione degli enzimi, secondo CARREL stesso ed i più recenti osservatori (BORGER e ZENKER) hanno constatato.

Quanto al *significato fisiologico* delle catepsine, vi sono sicuramente molti punti interrogativi: sono esse anzitutto enzimi che entrano in fun-

zione solo alla morte delle cellule per disintegrare la trama proteica dei cadaveri cellulari; o hanno una funzione intravitale, dominando il catabolismo proteico e, per una azione invertita realizzabile sperimentalmente in molti enzimi, anche proteolitici, ma teoricamente ammissibile in tutti, anche i fenomeni di anabolismo e di sintesi? In una rivista sull'argomento BRADLEY, che ha portato anche importanti contributi originali sull'autolisi, diceva nel 1922 che l'autolisi deve essere *intra vitam* correlata ai fenomeni di atrofia normale e patologica: nelle cellule alla reazione neutra corrispondente a circa pH 7,4, quella del sangue, le proteinasi sono inattive, le ereptasi non hanno molto materiale da attaccare, le proteine naturali restano dunque indigerite e la produzione di aminoacidi da esse è trascurabile. Basta che per elevazione di processi catabolici (lavoro cellulare accresciuto) o per ristagno di scorie organiche dovuto ad insufficienza circolatoria (ischemia comunque indotta, anche semplicemente relativa all'aumento della funzione dell'organo) si arrivi ad un accumulato di prodotti acidi (CO₂, acido fosforico, chetoacidi ecc.), perchè sia messo in opera il meccanismo autolitico, collo stabilirsi di una reazione attuale favorevole alla funzione catepsica. Si arriva così secondo BRADLEY ad una diminuzione di massa cellulare, fino al ripristino di un opportuno rapporto fra metabolismo ridotto e condizioni di asportazione dei prodotti metabolici. Insomma « ogni aumento di prodotti acidi nelle cellule o tessuti oltre la capacità dei meccanismi tampone ad immediatamente dominarlo, deve automaticamente tendere a modificazioni di massa in senso di atrofia ». MITCHELL ed HAMILTON riportano senz'altro queste conclusioni e soggiungono che « la autolisi delle proteine tissulari è un fenomeno sporadico ed abnorme, privo di ogni rapporto col catabolismo endogeno minimo ». Ma queste conclusioni negative sono oggi tutt'altro che accettabili: intanto è decisamente erronea la osservazione di BRADLEY che la reazione attuale intracellulare sia quella del sangue, con un pH oltre 7. La reazione intracellulare è certamente piuttosto acida: secondo osservazioni di CHAMBERS riferite da GRAY dovrebbe essere attorno a pH 6,9; ma secondo una sintesi di P. REISS si ha nel citoplasma un pH 6 circa, che può calare ancora nei processi vitali con sviluppo di acidi. Una osservazione tipicamente dimostrativa della influenza della funzione sulla reazione attuale dominante nelle cellule è con molte altre quella della PASTORI su *Vorticella*: la reazione attuale del contenuto del vacuolo passa da pH 5 a pH 3,5 per contrazione dei mionemi. Qui si tratta di reazione in un succo vacuolare che è segregato dal vero citoplasma; ma evidentemente c'è nella contrazione dell'organulo contrattile una formazione di sostanze che elevano la concentrazione idrogenionica prima del citoplasma eppoi del liquido vacuolare. Si può dunque ammettere che durante la vita delle cellule, in parti di esse, in compartimenti speciali del sistema eterogeneo che è il protoplasma differenziato, si possano avere modificazioni di reazione at-

tuale da raggiungere o avvicinare il punto isoelettrico di certe individualità proteiche e perciò da rendere queste substrato ottimale per le catepsine.

Lo schema di BRADLEY (derivato dalla non giusta analogia col sangue) secondo cui si ha nella cellula normale reazione alcalina e proteine perciò a carica negativa ed inattaccabili dagli enzimi endocellulari, non può accettarsi. Non è dunque, con ogni verosimiglianza, un fenomeno post-vitale o puramente patologico la funzione catepsica; ma fa parte dei complessi ingranaggi del metabolismo proteico in condizioni fisiologiche. Il fatto che colla morte delle cellule, colla *neecrosi*, come vedremo a proposito dei tumori, scompaiono le catepsine, parla pure per la loro importanza legata alla vita cellulare.

Se esista la possibilità di una funzione inversa, *sintetizzante* delle catepsine è profondamente oscuro. Fenomeni di proteosintesi sono probabili *in vitro* negli estratti di organi parzialmente autodigeriti. Si possono ricordare qui le vecchie osservazioni di IWANOFF e di KOSFYTSCHEW e BRILLIANT, che avrebbero osservato ricostruzione di proteine da prodotti disintegrativi sotto l'influenza della alcalinizzazione e per soggiorno a 60°. Anche DE BRYNE ammette nelle poltiglie di fegato in autolisi processi di resintesi accanto a quelli idrolitici.

Vedremo che processi ricostruttivi sembrano probabili sotto influenza di agenti ossidanti. Ma per quanto riguarda i fenomeni intravitali la questione è tutt'altro che risolta. BRADLEY tende a riconoscere la funzione sintetizzante degli enzimi autolitici nei processi di crescita e di ipertrofia; e dà importanza alla reazione alcalina ed alla abbondante irrigazione sanguigna. Ma MITCHELL e HAMILTON si staccano qui dalla opinione di BRADLEY e negano ogni valore a tali enzimi nei processi sintetici, perchè, essi dicono, questi processi sono altamente specifici ed esigono selezione di aminoacidi per la costruzione di speciali edifici proteici; mentre le proteasi tissulari sono aspecifiche e sciolgono semplicemente i legami peptidici senza riguardo agli aminoacidi costitutivi ed alla configurazione molecolare delle proteine. Questo modo di vedere dei due Autori è oltre modo discutibile: intanto ci sono già appoggi sperimentali all'ammissione di catepsine dotate di una specificità di organo (v. pag. 198), probabilmente difficili a dimostrare, perchè nei processi post-vitali di autolisi esse sono sopraffatte dalle azioni idrolitiche travolgenti e massive prive di ogni specificità. Noi vediamo anche come certe peptidasi catepsiche posseggano delle precise stereospecificità, così ad esempio le dipeptidasi attaccano la l-leucilglicina e non lo stereoisomero destrogiro (v. pag. 199). D'altra parte può darsi che le catepsine catalizzino bensì le sintesi dei peptidi in modo generico, senza alcuna specificità; ma che questa ultima sia disciplinata e conservata nelle proteine da forze polari od intermolecolari affermantisi fra gruppi di determinata configurazione, a seconda

della distribuzione dei campi polari relativi. Lo stabilirsi di legami peptidici (catalizzato dalle catepsine in funzione invertita) potrebbe allora essere, secondo un'idea svolta da RONDONI, una seconda fase aspecifica di un processo, la cui prima fase è determinata da fenomeno di adsorbimento specifico fra superfici a determinato mosaico di campi polari, fenomeni di cui si hanno esempi numerosi (formazione di cristalli misti, adsorbimento su superfici cristalline di molecole estranee offrenti una adatta distribuzione di forze polari), di grande importanza soprattutto per la immunologia (MARRACK). La neoformazione di individualità proteiche di determinata configurazione sarebbe così effetto di una aggregazione di aminoacidi su un determinato modello od in una determinata trama prestabilita dalle preesistenti individualità; cui poi seguirebbe lo stabilirsi dei legami chimici fra gli aminoacidi.

Per relativa completezza ricordo che di recente HEDIN (1932-33) ha descritto nella milza di vitello un'enzima che propriamente opererebbe la sintesi di proteine da prodotti di scissione proteica.

II. — APPLICAZIONI PATOLOGICHE.

I recenti sviluppi dottrinali e tecnici hanno suggerito applicazioni per la soluzione di problemi patologici.

Si potrebbero anzitutto ricordare gli studi assai numerosi sul contenuto in enzimi proteolitici nei tumori: ma non mi estenderò su questo punto largamente svolto in lavori originali e riassuntivi del mio Maestro (RONDONI, 1932-33 « Bioch. J. »; *il Cancro*), di KLEINMANN (« Kl. Woch. », 1931) di KREBS (1931), di MASCHMANN ed HELMERT (vol. 216, 1933), per dire i più recenti. La conclusione è che non vi sono attività proteolitiche particolarmente elevate nei tumori, sebbene, come osserva RONDONI, poco valga il consueto confronto cogli organi normali più studiati, fegato, milza, rene, organi dalle complesse e differenziate funzioni, mentre, per stabilire se la trasformazione neoplastica implichi o no una modificazione sia pure solo quantitativa dell'apparato enzimatico della cellula occorrerebbe paragonare la cellula neoplastica con quella normale di origine, il che non è stato fatto quasi mai ed è spesso impossibile a fare.

L'idea di WALDSCHMIDT-LEITZ e SCHÄFFNER che col progredire dello sviluppo neoplastico aumenti nel tessuto la concentrazione di attivatori a tipo di corpi riducenti (composti sulfidrilati) e che perciò esista una connessione fra esaltata proteolisi e diminuiti processi ossidativi nel tumore, non è stata generalmente accettata: le ricerche sul contenuto in corpi sulfidrilati ed in ispecie in glutatione ridotto nei tessuti neoplastici sono oltremodo contraddittorie; mentre un accumulo di altri attivatori noti, per esempio di acido ascorbico, non è neppure dimostrabile (BORGHİ e DEOTTO). Più di recente WALDSCHMIDT-LEITZ, MC. DONALD e collaboratori trovano che il contenuto in catepsine scema nel progredire della crescita neoplastica; ed altri enzimi (desamidasi e fosfatasi) si comportano ugualmente, mentre le arginasi aumentano. Una modificazione costante del contenuto in corpi sulfidrilici a funzione attivatrice per le catepsine non è ulteriormente riscontrata in queste nuove ricerche di WALDSCHMIDT-LEITZ e MC DONALD. È probabile che le modificazioni necrotiche estese che occorrono nei tumori trapiantabili dei piccoli roditori presi principalmente in esame da questi Autori siano in gran parte responsabili delle modificazioni riscontrate, per esempio della diminuzione di attività catepsica col progredire dello sviluppo e perciò della necrosi. Difatti anche MASCHMANN ed HELMERT (1933, vol. 216, pag. 161) trovano nelle parti necrotiche mancante il contenuto in proteinasi e quello in dipeptidasi ridotto ad $\frac{1}{3}$. DEMUTH e RIESEN descrissero in culture *in vitro* di tumori la presenza di un certo attivatore coetostabile ed ultrafiltrabile,

che dovrebbe provenire da autolisi cellulare ed attivare i fermenti fibrinolitici dello esplantato. Ma ricerche di controllo mie (2) e di MASCHMANN ed HELMERT non hanno evidenziato alcun peculiare attivatore nel tessuto neoplastico. Le ricerche sulle peptidasi nel tessuto neoplastico ad opera di WALDSCHMIDT-LEITZ e SCHÄFFNER, di KREBS, di RONDONI, di MALOWAN, di MASCHMANN ed HELMERT ecc., non hanno portato a nette differenziazioni dai tessuti normali. È stato indagato anche se nell'organismo portatore di tumore si abbiano modificazioni del contenuto catepsico in organi diversi: ma anche qui i risultati dicono poco di preciso. MASCHMANN ed HELMERT parlano di aumento di proteinasi nel fegato e soprattutto nella milza di animali portatori; mentre WALDSCHMIDT-LEITZ e Mc DONALD trovano diminuzione di catepsina nel fegato. RONDONI (« Bioch. Jl. ») nota parecchie oscillazioni del contenuto in dipeptidasi di organi, in seguito a trattamenti (con lipoidi) modificanti lo sviluppo neoplastico; e notò che le modificazioni di tale contenuto negli organi non decorrono parallele colle modificazioni nel tessuto neoplastico; ma non è possibile inquadrare oggi tutte queste ricerche in uno schema definitivo. Forse si può riportare qui una conclusione del RONDONI: la cellula neoplastica, in virtù del suo sviamento biologico, sa talora usare in modo abnorme il suo in sè normale apparato enzimatico proteolitico.

Non bisogna perdere di mira, a spiegare le talora elevate attività catepsiche dei tumori e le azioni che un tempo furono dette *eterolitiche* (digestione a carico di cellule e tessuti normali circostanti al tumore o presenti in esplantati insieme alle cellule neoplastiche), la certamente abnorme composizione lipidale del tumore, quale oggi risulta da numerose ricerche, anche svolte nella nostra scuola (BOLAFFI). Si è già ricordato che certi fosfatidi possono eccitare l'attività catepsica; e la stessa lecitina *ex ovo* eleva di poco (RONDONI, *Cancro*, 1932, « Biochem. Journ. »), la proteolisi in estratti di cancro del topo. È però supponibile che un fattore modificatore delle catepsine sia offerto da peculiari individualità lipidali quali sono concentrate nel tumore o da condizioni e proporzioni speciali dei lipoidi nella cellula neoplastica. È sorprendente osservare che nel 1917 il PIANESE in base a dati puramente istologici aveva avanzato l'opinione che le lecitine potessero stimolare gli enzimi endocellulari nei tumori ed in altri tessuti a rapida crescita.

Si è già accennato nella parte fisiologica come da tutti, anche dai meno propensi a valorizzare le catepsine, si dia importanza a questi istoenzimi nei processi di atrofia patologica: è vero che BRADLEY nota come nell'atrofia da enervazione dei muscoli di coniglio la perdita proteica è di gran lunga superiore a quella che in egual tempo si ha per autolisi asettica dei muscoli *in vitro*; ma è ovvio come le cose procedano *in vivo* in modo diverso che *in vitro*, là avendosi ad esempio il continuo allontanamento dei prodotti di digestione, per effetto della circolazione, mentre nell'autolisi

in vitro questi prodotti restano nel campo reattivo ed inibiscono l'ulteriore idrolisi. Di recente BROMLEY e ORECHEWITSCH trovano aumento di catepsine (desmocatepsine) nel rigenerato di coda di anfibio.

Nella febbre, in processi consuntivi vari, nelle infezioni in genere, si ha una esaltata attività catepsica. Io potei dimostrarla (1) nel fegato e nel rene di cavie rese scorbutiche da dieta carenzata in vitamina C. Noto che mentre era nettamente aumentato il contenuto in proteina in confronto a cavie normali, non era nettamente cresciuto il contenuto in dipeptidasi (ricerca per l-leucilglicina). Io misi in rapporto l'esaltata proteolisi colla riduzione dei fenomeni ossidativi nell'avitaminosi, conforme alle idee di WALDSCHMIDT-LEITZ ed altri; ma la ricerca ulteriore, anche nel nostro laboratorio (CALCINAI e GALIGANI) ha dimostrato che nello scorbutico della cavia non c'è una diminuzione di ossidazioni, piuttosto un certo aumento, che la somministrazione di acido ascorbico corregge. Perciò io penso oggi che l'esaltata proteolisi sia puramente un *fenomeno di cachessia*, come lo è probabilmente negli organi di animali portatori di tumori (v. pag. 205), dunque senza alcun significato specifico.

BORGER, PETERS e KURZ hanno studiato dal punto di vista del contenuto catepsico l'*infarto*, e toccato la questione della genesi della *necrosi da coagulazione*. Secondo quanto è stato detto sugli attivatori a carattere di corpi sulfidrilati, ci sarebbe da attendersi che la ischemia di un tessuto, indotta da arresto dell'afflusso arterioso in organo in cui i vasi hanno carattere terminale, dovrebbe implicare un accumulo di tali corpi (glutazione ridotto ecc.), nel tessuto e perciò lo scatenarsi di fenomeni proteolitici. Ora questi Autori non dimostrano un aumento di glutazione in forma ridotta in infarti naturali e sperimentali; piuttosto una diminuzione ed una scomparsa per demolizione del tripeptide; e notano come le alterazioni del tessuto - necrosi da coagulazione - non sono quelle di una intensificata digestione, che dovrebbe portare piuttosto ad una colliquazione. Notano anche la modificazione in senso alcalotico del tessuto in necrosi, il che pure non concorda cogli schemi di BRADLEY (pag. 201). Suppongono che sia proprio quella peculiare alcalinizzazione del tessuto ischemico ad inibire la funzione catepsica; ma di essa non danno alcuna spiegazione. Sulla proteolisi nel tessuto ischemico tornerò in seguito.

È in generale ancora incerto il riferimento di fenomeni vitali ai reperi della funzione catepsica in vitro: così nell'interessante studio di BORGER sulle milze infettive e da emorragia, notoriamente rammollite, si ebbe un rapporto piuttosto incostante fra stato morboso e funzione enzimatica esattamente determinata. Certo la milza infettiva (*tumore spodogeno di milza* degli anatomo-patologi) offre i segni di una intensificata funzione enzimatica; ma ciò può dipendere da aumentato contenuto enzimatico, come da aumentata attivazione della normale provvista di enzimi o da modificazioni dell'ambiente reattivo (pH ecc.).

III. — RICERCHE PERSONALI.

a) *Considerazioni tecniche.*

Si è fatto cenno (pag. 198) dell'inconveniente delle tecniche moderne usate da quasi tutti i ricercatori nello studio delle proteinasi catepsiche: si suole preparare un estratto con glicerina acida dall'organo fresco (o, se vogliamo eliminare gli attivatori naturali dall'organo trattato con acetone ed alcool diluiti o acetone diluito ed etere) con tecnica indicata (1927) da WALDSCHMIDT-LEITZ e DEUTSCH: precisamente una parte in peso di organo triturato è trattata con 2 volumi di glicerina 87 % contenente 0,15 % di acido acetico. La glicerina stabilizza gli enzimi e di qui il vantaggio dell'estrazione glicerica, che si prolunga per alcune ore, fino a 24 ed oltre, dopo di che si filtra e si ottiene un estratto denso, di colore rossastro più o meno intenso. Questo estratto è saggiato su gelatina 8 % con aggiunta dei necessari puffer acetici (pH circa 4), previa attivazione con H₂S od altro attivatore allo studio; l'azione digestiva è seguita da WALDSCHMIDT-LEITZ per 24 ore a 30° e la digestione è misurata dall'aumento di aminogruppi dimostrabile col metodo di VAN SLYKE eseguito su parti aliquote della miscela avanti e dopo il periodo digestivo. Altri adottano piccole varianti, come BORGER, che digerisce a 40° sotto toluolo su gelatina 10 %.

Questo procedimento usa come prova del contenuto in proteinasi catepsiche l'azione digestiva su una proteina altamente incompleta quale è la gelatina; non tiene quasi mai conto (solo BORGER lo fa) della differenziazione della digestione della gelatina aggiunta e di quella delle proteine proprie dell'estratto, che sono tutt'altro che in quantità trascurabile. Inoltre, a meno di ricorrere a lunghi e poco redditizi tentativi di purificazione, determina in blocco l'azione proteinasica ed una eventuale peptidasi ancora possibile a quel pH. Per scopi più strettamente fisiologici sono dunque preferibili quei metodi che, come i classici procedimenti autolitici, tengono conto della digestione delle proteine proprie dell'organo; soprattutto se, più che determinare l'aumento dei prodotti disintegrativi al v. Slyke o con metodi diversi, determinano la diminuzione del substrato proteico. Così RONA, KLEINMANN e STERN usano un procedimento nefelometrico di dimostrazione delle proteine dell'estratto avanti e dopo la fase autodigestiva; e dalla diminuzione delle proteine precipitabili con acido solfosalicilico ed HCl calcolano l'intensità della idrolisi. I metodi nefelometrici offrono tuttavia parecchi inconvenienti per conto loro, il grado di intorbidamento dipendendo non solo dal quantitativo di proteine

flocculate, ma anche dalla dispersione di queste e modificandosi anche rapidamente durante le stesse letture. Così è stato elaborato nel nostro laboratorio un metodo che corrisponde in fondo a quello autoproteolitico di STERN (« Biochem. Z. ») colla differenza che le proteine sono determinate avanti e dopo o durante la digestione degli estratti diluiti non già con un infido metodo nefelometrico ma con un metodo gravimetrico integrato da quello chimico della determinazione del N al Kjeldahl. Infatti il fondamentale nostro procedimento (RONDONI, « Bioch. JI. ») è il seguente: preparato l'estratto con glicerina acida (secondo WALDSCHMIDT-LEITZ e DEUTSCH), questo viene conservato in ghiacciaia; così gli enzimi per effetto della bassa temperatura e dell'alta concentrazione di glicerina si conservano inattivi per settimane. Se tale estratto si diluisce in modo che il contenuto in glicerina cali al 5 % al massimo — e quindi si deve diluire circa 1 : 20 — e la diluizione si tiene a 37°, allora gli enzimi presenti coi loro attivatori naturali sono liberi di agire ed operano la digestione delle proteine proprie dell'estratto, le quali rappresentano il *vero substrato fisiologico*. La determinazione delle proteine si fa aggiungendo a parti aliquote della diluizione di estratto (ossia di miscela enzima + substrato + acqua) dell'acido tricloroacetico (per lo più cmc. 20 di acido tricloroacetico 20 % per 60 di diluizione, in modo che la concentrazione finale di acido tricloroacetico sia 5 %), che precipita le proteine. Il precipitato è raccolto su filtro tarato, lavato con soluzione diluita di acido tricloroacetico, poi con alcool ed etere, indi seccato a 110° fino a peso costante e pesato. Si ha così il peso delle proteine della miscela: se la determinazione si fa all'inizio, appena preparata la diluizione, eppoi durante il progredire della digestione a 37°, si hanno i pesi successivi della proteina indigerita, da cui è facile calcolare le quote percentuali di digestione a varia epoca (per lo più le abbiamo determinate fino alla 6^a ora). Nei precipitati proteici si determina spesso l'N al Kjeldahl, che può anche determinarsi del resto nei liquidi di filtrazione e lavaggio. È naturale che così lavorando non si abbiano sempre risultati del tutto concordanti con quelli dei metodi alla gelatina. Già BORGER ha notato ad esempio che HCN e glutazione, noti attivatori della digestione su gelatina, non lo sono più, anzi diventano inibitori, se si studia quella che egli chiama « Eigenspaltung » degli estratti e che corrisponde al dispositivo autolitico o funzione catepsica sulle proteine proprie dell'organo. Quindi moltissime constatazioni fatte dai recenti Autori coi metodi alla gelatina vanno rivedute col metodo che chiamerei fisiologico.

Quest'ultimo ha poi il vantaggio che ci dà l'azione delle proteinasi *pure*; perchè eventuali azioni ereptiche non possono incidere sopra al contenuto in proteine precipitabili da acido tricloroacetico, mentre incidono sul contenuto in NH₂-gruppi od in COOH-gruppi. Inoltre il metodo usato offre la possibilità di riconoscere gradi iniziali di proteolisi,

con spezzamento della molecola proteica in grossi frammenti, ossia quei gradi, i quali, implicando scarso aumento di gruppi aminici e carbosilici liberi, sono malamente segnalati dai metodi gassometrici, acido-od alcalimetrici. Generalmente le diluizioni di estratto sono state portate a $pH = 4,7$, con puffer acetici aggiunti (parti eguali di soluzione normale di acido acetico e acetato sodico) in dose adatta: per lo più 4 cmc. della miscela tampone per ogni 50-60 cmc. di diluizione totale di estratto, facendo rientrare questo quantitativo della miscela nel totale del liquido di diluizione (acqua bidistillata sempre).

Lavorando col nostro sistema non riesce comodo l'impiego dell'apparecchio di v. SLYKE: le diluizioni sono assai voluminose e si dovrebbero usare dei macroapparati; ma il contenuto in gruppi aminici e soprattutto le modificazioni di questo contenuto non possono essere vistose e perciò i valori ottenibili sarebbero molto bassi ed infidi; d'altra parte non sarebbero utilizzabili microapparati che richiedono piccoli volumi di materiale in esame. Per speciali casi si è fatto uso della determinazione degli aminoacidi al formolo; ed anche della determinazione alcalimetrica dei gruppi carbosilici secondo WILLSTÄTTER (all'alcool).

Il procedimento comunemente usato da noi ha sulle comuni tecniche di autolisi con poltiglie d'organo integrali diversi vantaggi, oltre i già detti: intanto non è richiesta aggiunta di toluolo od altri disinfettanti, la concentrazione di glicerina finale delle diluizioni di estratti essendo sufficiente ad impedire polluzioni batteriche disturbatrici. Siccome il contenuto proteico è basso (attorno ad 1,5 %) e certamente ridotto di molto in confronto agli organi naturali, mentre la estrazione di enzima è molto larga, abbiamo dei rapporti fra enzimi e substrati favorevoli ad una azione rapida; e difatti, se si fa il confronto, si vede che le quote percentuali di digestione, calcolate dalla riduzione dell'N coagulabile dall'acido tricloroacetico, sono nel nostro caso molto più pronunziate, dopo poche ore arrivandosi al massimo della digestione, mentre nell'autolisi dell'organo integrale tutto il processo è molto più prolungato. L'assenza di frammenti d'organo e di connettivo indigeribile, l'omogeneità degli estratti e relative diluizioni, la loro facile misurabilità sono tutte ragioni di preferenza della tecnica da noi usata, che è una derivazione in fondo di quella della scuola di RONA e soprattutto di quella di STERN succitato colla sostituzione delle esatte determinazioni gravimetriche e azotometriche alle incerte determinazioni nefelometriche. Per eseguire le numerose pesate senza eccessivo dispendio di tempo è indispensabile una bilancia ad oscillazioni smorzate (« Dämpfungsschnellwange » Sartorius). Le miscele digestive, in palloni Erlenmeyer di adatte dimensioni, stanno a 37° in un bagno di Ostwald a regolazione elettrica perfetta (Terzano, Milano). Occorre gran cura nella pulizia dei recipienti e pipette, sempre sciacquati con acqua bidistillata da noi stessi preparata.

Si è lavorato per lo più con estratti di fegato (di coniglio o cavallo), talora di cancro del topo.

b) *Attivatori ed inibitori.*

Già in un lavoro precedente (RONDONI e POZZI) fu presa in considerazione l'azione della cisteina, poichè KLEINMANN e STERN e KLEINMANN (« K. Woch. ») avevano asserito che le catepsine sono attivabili da H_2S e corpi sulfidrilati solo quando si fanno agire su gelatina; non già adottando altri substrati: ciò che ridurrebbe molto il significato fisiologico degli attivatori a tipo di glutatione, cisteina ecc. Si vide che la cisteina e più ancora la cisteina insieme a solfato ferroso elevano nettamente l'attività catepsica sulle proteine proprie del tessuto (fegato di coniglio e cancro del topo), dunque anche quando le catepsine agiscono sul loro substrato fisiologico. Ad onta che il sistema enzimatico dei nostri estratti sia completo, contenendo tutto l'armamentario dei naturali attivatori, l'aggiunta di cisteina o meglio del sistema cisteina + Fe^{++} accelera la funzione digestiva. La cisteina era aggiunta come cloridrato; ma ci persuademmo con determinazione elettrometrica della concentrazione idrogenionica che la cisteina non agiva modificando sensibilmente la reazione attuale della miscela digestiva. Così che l'aggiunta di corpi sulfidrilati e di sali ferrosi, in genere dunque di sostanze a funzione riducente, esalti la proteolisi secondo le concezioni sopra svolte, è accertato, anche secondo il dispositivo sperimentale fisiologico da noi adottato.

Ho voluto saggiare secondo questo dispositivo un estratto glicerico preparato da fegato di cavallo previamente estratto con acetone 70 %, acetone ed etere, etere, ripetutamente, filtrando ogni volta su filtro di Buchner. Questo trattamento ha lo scopo di estrarre gli attivatori naturali: l'estratto di per sè dovrebbe essere allora inattivo, e dovrebbe agire solo se addizionato di cisteina o trattato con H_2S . Non sempre si riesce ad ottenere una inattivazione completa con perfetta attivabilità: è possibile che da un lato il trattamento con solventi organici non asporti tutti gli attivatori, e che dall'altro lato esso danneggi l'enzima o forse denaturi il substrato (proteine del tessuto); e così i risultati possono essere talora incostanti. Però si riesce ad avere dei protocolli sperimentali soddisfacenti. Pare anche che la attività catepsica residua in tali estratti di fegati trattati con etere sia più labile della normale.

Ho voluto così, su estratti integrali e su estratti di organo pretrattati con solventi organici saggiare l'azione dell'*acido ascorbico*, che tutti finora, per quanto so, hanno sperimentato sul sistema solito, catepsina + gelatina. Come si è dubitato ed anzi taluno ha asserito per i corpi sulfidrilati, potrebbe anche la funzione attivatrice dell'*acido ascorbico* esercitarsi

solo di fronte ai substrati artificiali; ed è pertanto utile sapere se questa funzione ha una portata più generale.

Intanto un protocollo dimostra una, sia pure non molto spiccata, funzione acceleratrice per la proteolisi, in estratto di fegato di coniglio senza alcun trattamento preliminare.

Si preparano le seguenti miscele:

- a) acqua bidistillata emc. 159
 Puffer acetici 1 : 1 emc. 12
 Estr. glicer. integr. fegato coniglio emc. 9;

- b) Acqua bidistillata emc. 159
 Puffer acetici 1 : 1 emc. 12
 Estr. c. s. emc. 9

Ac. ascorbico (Merck) gr. 0,316 (nel volume totale della miscela risulta concentrazione 1/100 molare)

Le miscele sono divise ciascuna in 3 porzioni di 50 emc. cad.; in Erlenmeyer; e le porzioni risultanti hanno il seguente trattamento:

1 a e 1 b : subito aggiunta di 20 emc. sol. 20 % di acido tricloroacetico;

2 a e 2 b : 3 h a 37°; poi aggiunta soluzione 20 % di acido tricloroacetico;

3 a e 3 b : 6 h a 37°; poi aggiunta soluzione 20 % di acido tricloroacetico.

Filtrazione su filtri tarati, lavaggio con soluzione diluita di acido tricloroacetico, alcool ed etere dei precipitati, pesata; la tabella dà i pesi dei precipitati ed il loro contenuto in N, determinato al Kjeldahl.

	mgr. proteina non digerita	mgr. N della proteina non digerita		mgr. proteina non digerita	mgr. N della proteina non digerita
1 a	68,6	9,03	1 b	70,8	10,57
2 a	63,3	—	2 b	60,6	—
3 a	55,5	8,26	3 b	55,4	8,12

Se calcoliamo la percentuale di digestione (quanto della proteina iniziale della porzione di 50 emc. della miscela è stato digerito) troviamo:

	% digestione in base al peso	% digestione in base alla determinazione N		% digestione in base al peso	% digestione in base alla determinazione N
1 a	—	—	1 b	—	—
2 a	7,7	—	2 b	14,4	—
3 a	19,0	8,5	3 b	21,7	23

Si vede come la determinazione di N dia degli scarti in confronto alle pesate: una precisa e costante corrispondenza non è attendibile, perchè evidentemente, ad onta dei lavaggi dei precipitati, materiali (lipidi) restano aderenti più o meno ad essi; e le stesse determinazioni al Kjeldahl, su piccole quantità come queste, non vanno immuni da qualche errore. Soprattutto credo che la precipitazione con acido tricloroacetico non dia sempre una separazione fra complessi precipitabili e prodotti disintegrativi non precipitabili nello stesso punto costante, ma che certe individualità intermedie a seconda della durata dell'azione, del lavaggio più o meno prolungato ecc., possano o no passare nel filtrato. Pur facendo queste riserve, è ovvio che l'acido ascorbico (serie *b*) ha fatto avanzare la proteolisi, il che è evidente più in base alle determinazioni di N che alle pesate: è possibile che proprio questo corpo abbia generato delle difficoltà all'accurato lavaggio dei precipitati, facendo qualche volta sembrare più alto il peso di questi (3 *a*). Si può asserire che la Vitamina C è favoritrice della funzione catepsica studiata sul sistema fisiologico: catepsine + proteina propria dell'organo. Soggiungo che ad esperimento finito i filtrati tutti sono stati saggiati coll'indicatore di TILLMANS, diclorofenolindofenolo, secondo le norme consuete: la dimostrazione di un alto potere riducente in tutti i filtrati *b* (saggio su 5 cmc. di ciascuno), per cui sono occorsi alcuni cmc. di soluzione di indicatore per avere il viraggio (mentre i filtrati *a* hanno dato viraggio dopo una sola goccia di questa soluzione) è prova che l'acido ascorbico si è mantenuto largamente, in forma ridotta, presente nelle miscele digestive durante le 6^h di termostato (i matracci erano turati con tappi di gomma).

Un altro esperimento mostra l'azione comparativa della cisteina e dell'acido ascorbico sulla digestione in estratto di fegato di cavallo previamente trattato con acetone diluito ed etere e perciò inattivato. La inattivazione qui è perfetta (i lievi scarti nei pesi rientrano nei limiti degli errori); e la riattivazione è ben riuscita.

Si allestiscono le seguenti miscele:

- a) Acqua bidistillata cmc. 159
Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12
Estr. fegato cavallo trattato con acet.-etere cmc. 9.
- b) Acqua bidistillata cmc. 144
Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12

Soluzione $\frac{m}{10}$ cisteina cloridr. cmc. 15 (nel volume totale della miscela risulta concentrazione 1/100 mol.)

Estratto c. s. cmc. 9.

- c) Acqua bidistillata cmc. 155
Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12
Estr. c. s. cmc. 9

Ac. ascorbico (Merck) gr. 0,316 (nel volume totale della miscela risulta concentrazione 1/100 molare).

Da ciascuna miscela si fanno 3 porzioni di 50 emc. cad.; e queste subiscono i seguenti trattamenti:

1 a, 1 b e 1 c: aggiunta immediata di 20 emc. acido tricloroacetico 20 %;

2 a, 2 b e 2 c: 3^b a 37°; poi aggiunta immediata di 20 emc. acido tricloroacetico 20 %;

3 a, 3 b e 3 c: 7^h a 37°, poi aggiunta immediata di 20 emc. acido tricloroacetico 20 %.

Solito trattamento dei precipitati, che sono lavati e pesati. La seguente Tabella dà i pesi di proteina indigerita e le percentuali di digestione calcolate sulla loro base.

	mgr. proteina non digerita	% digest.		mgr. proteina non digerita	% digest.		mgr. proteina non digerita	% digest.
1 a	31,6	—	1 b	31,5	—	1 c	31,2	—
2 a	30,8	quasi 0	2 b	29,9	5,1 %	2 c	28,5	8,6 %
3 a	31,3	quasi 0	3 b	23,8	24,7 %	3 c	26,1	16,6 %

Si vede che la cisteina ha attivato discretamente; meno ha attivato l'acido ascorbico (ad eguale concentrazione molare), ma pur sempre nettamente. Dunque l'acido ascorbico è almeno un acceleratore se non sicuramente un vero attivatore della proteolisi *anche* di fronte al sistema *naturale* della proteinasi catepsica + la proteina propria dell'organo (con eventuali tracce metalliche cui MASCHMANN dà importanza); il che conferma ed allarga e soprattutto valorizza dal lato fisiologico le osservazioni di PURR, KARRER e collaboratori ecc.

Si è voluto vedere come la presenza di alcuni prodotti di scissione proteica, di tripeptidi o dipeptidi, possa influenzare la proteolisi. Infatti si potrebbe pensare che nel corso della funzione catepsica si liberassero sostanze che a lor volta influenzassero l'ulteriore decorso della proteolisi stessa in senso favorente o inibente a prescindere dall'azione notoriamente di arresto che l'accumulo dei prodotti della digestione nel campo reattivo ha sopra l'ulteriore avanzamento della digestione stessa. Alcuni tentativi in questo senso hanno dato risultati dubbi; ma un protocollo sperimentale potrà essere qui utilmente riportato, perchè mostra una influenza inibitrice di un dipeptide, molto lieve per un antipode ottico del dipeptide (il destrogiro), più netta per l'altro antipode (il levogiro). Così si documenta anche la sensibilità della funzione catepsica alla configurazione sterica

di certi materiali presenti nella miscela digestiva. Si è usata la leucil-glicina, e precisamente i due stereo-isomeri, diversi per la distribuzione spaziale delle masse atomiche attorno al α -C del componente leucina; secondo il seguente protocollo:

Si preparano le seguenti miscele:

a) Acqua bidistillata cmc. 159

Puffer acetici : 1 : 1 cmc. 12

Estratto fegato coniglio cmc. 9

b) Acqua bidistillata cmc. 159

Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12

Estr. c. s. cmc. 9

d-leucilglicina gr. 1,12 (sciolti prima in parte dell'acqua bidistillata concentrazione finale nella miscela circa $\frac{1}{30}$ mol.).

c) Acqua bidistillata cmc. 159

Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12

Estr. c. s. cmc. 9

l-leucilglicina gr. 1,12 (c. s.).

Si fanno da ciascuna miscela 3 porzioni di 50 cmc. cadauna e si assoggettano al seguente trattamento:

1 a, 1 b, 1 c : subito aggiunta di 20 cmc. ac. tricloroacetico 20 %;

2 a, 2 b, 2 c : 3^h a 37° poi aggiunta di 20 cmc. di acido tricloroacetico 20 %;

3 a, 3 b, 3 c : 6^h a 37°, poi aggiunta di 20 cmc. acido tricloroacetico 20 %.

Solito trattamento dei precipitati, lavaggio molto prolungato (perchè non vi restino tracce del dipeptide): le cifre di partenza assolute dei pesi, casualmente inferiori in 1 b e 1 c in confronto ad 1 a, dimostrano che tracce di dipeptide, non devono essere restate a turbare i valori gravimetrici ed azotometrici.

Una tabella dà questi risultati assoluti:

	mgr. prot. non diger.	N prot. non diger.		mgr. prot. non diger.	N prot. non diger.		mgr. prot. non diger.	N prot. non diger.
1 a	54,6	8,26	1 b	53,1	8,12	1 c	47	7,35
2 a	45,4	6,02	2 b	44,4	6,72	2 c	44,7	6,37
3 a	36,9	5,11	3 b	37,6	5,81	3 c	37,8	5,74

Ed una seconda tabella dà le percentuali di digestione calcolate in base al peso dei precipitati ed al relativo contenuto proteico: sulla non perfetta corrispondenza v. quanto fu detto sopra (pag. 212).

	o/o digest. in base al peso	o/o digest. in base deter. N		o/o digest. in base al peso	o/o digest. in base deter. N		o/o digest. in base al peso	o/o digest. in base deter. N
1 a	—	—	1 b	—	—	1 c	—	—
2 a	16,8	27	2 b	16,3	17,2	2 c	4,9	13,3
3 a	32,4	38,1	3 b	29,2	28,4	3 c	19,6	21,9

Fatto il doveroso conto delle inevitabili irregolarità sperimentali, c'è tuttavia una netta concordanza nel risultato della determinazione gravimetrica e di quella azotometrica della proteina indigerita e del risultante grado di digestione. La l-leucilglicina ha nettamente inibito, sempre, dopo 3 e dopo 6 ore di digestione; mentre assai più scarsa seppure costante, è stata l'azione inibente della varietà d. La varietà fisiologica comune della leucina è la l-leucina, quale occorre nel dipeptide da noi usato (La Roche): è non privo di interesse constatare che questo peptide ha più dell'altro stereoisomero la funzione inibitrice sulla proteinasi catepsica rispetto alla proteina propria del tessuto.

In tema di influenze di prodotti digestivi sulla digestione ha richiamato la mia attenzione una serie di lavori di ABDERHALDEN e v. EHRENEWALL, nei quali fra le altre è fatta la seguente constatazione: nelle soluzioni di tripsina (da pancreas) purificata coi procedimenti dell'adsorbimento elettivo ed eluzione si fa comparire la funzione ereptica con aggiunte varie: glicerina + certi aminoacidi; zuccheri + certi aminoacidi; ossiaminoacidi; l-adrenalina. Può darsi dunque secondo questi Autori che certi prodotti della stessa digestione triptica, per esempio aminoacidi, facciano ad un certo punto comparire le mancanti funzioni ereptiche: ciò che sarebbe contrario al principio della reale specificità ed indipendenza dei due gruppi di enzimi proteolitici, i triptici e gli ereptici, così nettamente separati dalla scuola di WILLSTÄTTER. Ora ho voluto vedere se durante la autodigestione di proteine nelle miscele digestive preparate secondo la mia solita tecnica, e perciò per effetto dell'azione di proteinasi catepsiche, compaiano o si rafforzino eventuali funzioni peptidasiche, saggiando porzioni della miscela su un dipeptide, l-leucilglicina, previa opportuna modificazione della reazione attuale, e stabilendo (metodo alcalimetrico di WILLSTÄTTER all'alcool: aumento dei carbossili liberi) se occorra scissione. Per ora ho avuto sempre risultati negativi; e mi pare che non possa asserirsi la liberazione di dipeptidasi durante il processo digestivo. Ma occorrerebbe forse attuare molte varianti nel dispositivo sperimentale, per sorprendere un'attività dipeptidasica (o polipeptidasica), che comparisse e che, anche debole, avrebbe una grande importanza per la concezione degli ingranaggi fra i vari enzimi e dell'inclusione di fun-

zioni enzimatiche entro complessi proteici elevati e loro liberazione per processi autolitici od eterolitici.

Lo stesso ABDERHALDEN ha con SCHWAB creduto di poter affermare che la l-adrenalina e così pure la 1-3, 4-diossifenilalanina hanno azione accelerante sull'autolisi, in specie di muscoli cardiaci e scheletrici ma anche di fegato; con spostamento del rapporto aminoacidi-poli-peptidi a favore dei primi e quindi con probabile accentuazione di funzioni erettiche. Io ho voluto studiare pure il comportamento comparativo della d- e della l-adrenalina; e ho fatto ricorso in alcuni esperimenti alla tecnica precisa di ABDERHALDEN e SCHWAB, facendo svolgere l'autolisi di poltiglie di fegato in acqua cloroformiata e titolando all'alcool (con timolfaleina quale indicatore) secondo WILLSTÄTTER i carbossili subito ed a vario tempo (fino a 30 ore) di digestione. Ecco un protocollo sperimentale:

Si prepara in 3 matracci a tappo smerigliato la miscela seguente (eguale per i tre matracci):

fegato di cavallo in poltiglia gr. 20;
 acqua cloroformiata cmc. 160;
 miscela di puffer acetici cmc. 40 (acido acetico normale cmc. 35
 e soluzione normale ac. sod. cmc. 5 — pH = 3,8).

Ad un matraccio non aggiungo nulla (a); ad uno (b) aggiungo gr. 0,366 di d-adrenalina (base); ad un terzo (c) aggiungo la stessa quantità di l-adrenalina. Subito, dopo 20 e dopo 30 ore si fa titolazione su 10 cmc. di ogni miscela immessa in 120 di alcool assoluto neutralizzato alla timolfaleina e bollente, usando soluzione $\frac{n}{10}$ alcoolica di KOH.

I valori ottenuti (aumento di gruppi carbossilici espresso in cmc. di soluzione alcoolica $\frac{n}{10}$ KOH) sono i seguenti:

	<i>a</i> (controllo)	<i>b</i> (d-adrenalina)	<i>c</i> (l-adrenalina)
dopo 20 ^h	8,5	7,75	8,5
dopo 30 ^h	1,25	0	1,5
Totale	<u>9,75</u>	<u>7,75</u>	<u>10,0</u>

Non si ha un netto aumento di digestione ad opera della l-adrenalina, come vorrebbero ABDERHALDEN e SCHWAB: lo 0,5 di eccesso in c) contro a) non può essere molto valutato. Invece è netta, sebbene non fortissima un'azione inibente della d-adrenalina.

Usando il nostro consueto dispositivo e lavorando perciò su estratto glicerico di fegato (coniglio), si è avuta la conferma di un'azione inibente ancora più netta della adrenalina destrogira e qui è comparsa anzi spesso

una inibizione, più limitata, per parte della sinistrogira. Di azione favorente dell'una o dell'altra adrenalina sull'attività catepsica non ho mai potuto dimostrare traccia. Ecco un protocollo che presenta la inibizione anche da l-adrenalina:

Si preparano le due miscele seguenti:

a) Acqua bidistillata cmc. 159

Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12

Estratto fegato coniglio cmc. 9.

b) idem per tutti i componenti: aggiunta di gr. 0,329 di l-adrenalina (base); corrispondente a concentrazione $\frac{1}{100}$ mol. nel volume totale.

Prelievo al solito di 3 porzioni da cmc. 50 cad. da ogni miscela, aggiunte come segue:

1 a e 1 b, subito 20 cmc. soluzione 20 % acido tricloroacetico;

2 a e 2 b, 3^h a 37° ed aggiunta soluzione 20 % acido tricloroacetico;

3 a e 3 b, 6^h a 37° ed aggiunta soluzione 20 % acido tricloroacetico.

Filtrazioni, pesate, N al Kjedadhl sui precipitati, secondo il solito.

Risultati:

	mgr. proteina non digerita	N relativo	% digestione in base peso proteico	% digestione in base N
1 a	53,1	8,05	—	—
2 a	43,1	6,58	18,8	18,2
3 a	37,3	5,60	29,7	30,4
1 b	51,5	7,70	—	—
2 b	44,8	6,86	13	10,9
3 b	41,6	6,44	19,2	16,3

È uno dei protocolli colle più soddisfacenti concordanze fra i risultati puramente gravimetrici e quelli azotometrici: si guardino le percentuali di digestione nella serie a) a seconda dei due procedimenti, le quali vengono quasi a coincidere. Si vede come la l-adrenalina non solo non abbia accelerato, ma anzi molto inibito la digestione. Non so dunque qui trovare alcuna conferma ai dati degli autori suddetti; e le divergenze possono trovare spiegazione in peculiarità del materiale o della tecnica mal precisabili.

Dopo il saggio di alcuni materiali che possiamo chiamare fisiologici, ho voluto vedere come si comportasse un corpo del tutto diverso e preci-

samente un idrocarburo a potente funzione cancerogena quale 1-2-benzopirene. Siccome è stata ripetutamente ammessa una relazione fra esaltata proteolisi e sviluppo neoplastico, siccome questi idrocarburi policiclici cancerogeni e spesso estrogeni sono autossidabili fotochimicamente e possono secondo osservazioni di BOYLAND ingranare nei meccanismi ossidativi dei tessuti e d'altra parte i fenomeni ossidoriduttivi paiono essere concatenati con quelli proteolitici, così non mi è sembrato assurdo vedere se e come uno di questi composti modifichi la funzione catepsica. Devo il preparato sintetico alla cortesia del prof. dott. CORBELLINI, aiuto nell'Istituto di Chimica industriale dell'Università di Milano. Una grossa difficoltà di questo saggio è offerta dalla assoluta insolubilità dell'idrocarburo nell'acqua. Riesce per ciò ben difficile farsi un'idea dell'azione di una sostanza così idrofoba sopra un sistema eminentemente idrofilo come è quello enzima + substrato. L'idrocarburo è stato preparato dal prof. CORBELLINI sotto forma di sol acquoso, che contiene gr. 0,01 su 200 di acqua; ad onta di sì alta diluizione esso non è molto stabile, ed è probabile poi che flocculi prontamente nelle miscele digestive, a contatto di sali ecc., sebbene la glicerina e le proteine possano forse costituire una certa protezione. Quello che si saggia dunque è una specie di sospensione dell'idrocarburo; e gli effetti potrebbero anche essere soltanto quelli di un adsorbimento in via puramente fisica, senza relazione alla natura chimica del materiale. Comunque e tenendo conto che anche BOYLAND nel lavorare sulle influenze degli idrocarburi cancerogeni sulle perossidasi ha avuto analoghe difficoltà (che ha creduto di superare sciogliendo gli idrocarburi in toluolo e facendo confronti con miscele con toluolo senza idrocarburo), io ho eseguito un certo numero di esperimenti, dai risultati qua e là irregolari dal lato quantitativo ma che sostanzialmente danno questo risultato complessivo: piccolissime dosi di sol di benzopirene sono senza effetto od hanno talora dato lievissime accelerazioni della proteolisi nel mio consueto dispositivo (su estratti di fegato di cavallo), le dosi un po' più alte hanno netta e costante azione inibitrice. Ecco uno dei protocolli più fidati:

Si allestiscono le seguenti miscele:

- a) acqua bidistillata cmc. 140
Puffer acetici: 1 : 1 cmc. 12
Estratto fegato di cavallo cmc. 9;
- b) Acqua bidistillata cmc. 135
Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12
Soluzione benzopirene cmc. 5
Estratto c. s. cmc. 9;
- c) Acqua bidistillata cmc. 130
Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12
Soluzione benzopirene cmc. 10
Estratto c. s. cmc. 9.

Prelievo di 3 porzioni di 50 emc. cad. dalle tre miscele; e trattamento come segue:

1 a, 1 b e 1 c, subito aggiunta di emc. 20 di soluzione 20 % di acido tricloroacetico;

2 a, 2 b e 2 c, 3^h a 37° ed aggiunta di emc. 20 di soluzione 20 % di acido tricloroacetico;

3 a, 3 b e 3 c, 6^h a 37° ed aggiunta di emc. 20 di soluzione 20 % di acido tricloroacetico.

Risultato in peso e contenuto N dei precipitati:

	mgr. proteina non dig.	N relativo		mgr. proteina non dig.	N relativo		mgr. proteina non dig.	N relativo
1 a	89,6	13,72	1 b	93,2	13,86	1 c	90,8	13,86
2 a	83,6	13,16	2 b	86,2	12,88	2 c	85,7	12,88
3 a	76,1	11,20	3 b	76,0	10,92	3 c	75,6	11,62

Ed ecco le percentuali di digestione calcolate:

	% digestione in base peso proteico	% digestione in base N		% digestione in base peso proteico	% digestione in base N		% digestione in base peso proteico	% digestione in base N
1 a	—	—	1 b	—	—	1 c	—	—
2 a	6,9	4	2 b	7,5	7,0	2 c	5,6	7,0
3 a	15,0	18,37	3 b	18,4	21,2	3 c	11,2	16,1

Data l'aggiunta di una sospensione certo disturbatrice fisicamente dei rapporti dominanti nel sistema, forse difficile ad asportare bene dai filtri (furono lavati i precipitati a lungo con benzolo) e perciò turbante i reperti gravimetrici, ci possiamo contentare di una relativa concordanza complessiva ed affermare che le dosi più alte del sol di benzopirene hanno dato una certa inibizione, la quale compare anche più netta in altri protocolli. Purtroppo la scarsezza del materiale disponibile e che doveva essere soprattutto impiegato nel nostro laboratorio per altri esperimenti (sugli animali) non mi ha permesso di approfondire molto la questione; ma nell'insieme pare che dosi relativamente sempre piccole dell'idrocarburo siano inibitrici. Bisogna pensare che la dose più alta da me usata e trovata modestamente inibitrice è di 10 emc. del sol, corrispondenti a gr. 0,0005 di idrocarburo in 161 emc. di miscela totale. È anzi sorprendente

come concentrazioni così basse di questo idrocarburo influenzino la digestione. Senza pretendere di trarre conclusioni troppo spinte si può dire che in fondo il benzopirene ha, sulla funzione catepsica, un'azione inibitrice, cioè *nel senso medesimo dell'azione delle sostanze ossidanti*; ed osservazioni di BOYLAND fanno supporre che gli idrocarburi in parola possano formare composti a tipo di perossidi, capaci di fungere a lor volta da ossidanti e così di distruggere certi enzimi.

c) *La questione della resintesi proteica nelle miscele digestive sotto l'influenza di agenti ossidanti.*

Questa questione è stata, per riguardo agli endoenzimi dei tessuti, agitata da VOEGLIN, MAVER e JOHNSON e da RONDONI e POZZI; dopo che già LAQUEUR aveva parecchi anni fa notato un'azione inibitrice dell'O₂ sulla autolisi. VOEGLIN e collaboratori hanno visto che in poltiglie di tessuti neoplastici e normali si arresta la proteolisi e si provoca l'aumento di sostanze azotate precipitabili con acido tricloroacetico, nonchè la diminuzione di aminogruppi, se vi si fa passare una corrente di ossigeno e la reazione si sposta verso il punto neutro da acida che era durante la digestione. RONDONI ed io abbiamo veduto pure un aumento, sia pure modesto, di sostanze precipitabili con acido tricloroacetico e dell'N relativo, se negli estratti diluiti ed in attiva autodigestione secondo il nostro metodo si immettono piccole quantità di H₂O₂, specialmente spostando la reazione verso minor acidità. Il gorgogliamento di O₂ ci ha dato risultati meno netti, perchè la larga formazione di schiuma disturba assai. L'acqua ossigenata d'altro canto può avere l'inconveniente di produrre delle distruzioni di sostanze organiche ed anche azotate e così, mentre da un lato favorisce la formazione di complessi, dall'altra maschera o attenua il fenomeno. Su questi complessi poi noi ci siamo espressi assai prudentemente: resta per ora incerto — noi diciamo — se si abbia a fare con un'aggregazione fisica o con vere e pure combinazioni chimiche. Soggiungerei che è ancora in parte discusso fino a che punto anche le proteine naturali siano aggregati di relativamente più piccole pietre costruttive, legate da valenze accessorie o forze coesive, se ed in quale misura entrino a far parte dell'edificio proteico anidridi a tipo di dichetopiperazine, tenute insieme da gruppi collaterali o semplicemente da valenze accessorie. È dunque naturale che sia difficile stabilire la vera natura del processo di neoformazione di corpi precipitabili con acido tricloroacetico nelle miscele enzimatiche sotto l'influenza di agenti ossidanti.

Ultimamente è uscito un interessante lavoro di BLAGOWESTSCHENKI e KORMAN, che riprendono in esame il fenomeno da noi evidenziato, colla nostra tecnica precisa, lavorando con catepsine di tessuti vegetali (semi di *Vicia sativa*) su proteine di semi di girasole. Essi trovano che la cisteina

favorisce la digestione: nel qual reperto sconcordano da tutti gli Autori precedenti, il che non fa meraviglia, data la profonda diversità del materiale. Si ha poi una sorprendente concordanza coi nostri reperti per quanto riguarda l'influenza degli interventi ossidanti: mentre l'uso dell'ossigeno in corrente può condurre a cause d'errore, come la inclusione di sostanze azotate nella schiuma e perciò, per questa ragione puramente fisica, il falsamento dei risultati, l'azione di H_2O_2 a basse concentrazioni in miscele digestive a digestione assai avanzata (dopo 6 ore) di digestione può veramente offrire una, nei loro esperimenti, assai considerevole elevazione del contenuto di corpi precipitabili da acido tricloroacetico e quota azotata relativa.

Anche questi Autori russi, come noi, mettono in discussione se si tratti di un puro processo fisico di aggregazione o di una vera sintesi; e, ammessa una sintesi, essi dicono, resta da discutere se si abbia a fare con un vero aumento di dimensioni molecolari o piuttosto con formazione di strutture cicliche a tipo di dichetopiperazine per chiusura di anelli fra gruppi aminici e carbossilici. La diminuzione, anche in proporzioni equivalenti, di NH_2 e $COOH$ -gruppi, non darebbe una soluzione del problema; perchè tanto che si costituiscono nuove e più lunghe catene peptidiche per vera sintesi, o che si chiudano semplicemente ad anello le catene preesistenti, dei gruppi aminici e carbossilici spariscono. La decisione potrà provenire forse da ricerche con metodi fisici che permettano di controllare le dimensioni molecolari. Per ora io mi sono limitata qui ad esporre quanto è stato già fatto da noi ed a confrontarlo con osservazioni successive di altri, che mi pare offrano una discreta concordanza. Ho voluto ripetere l'esperimento nelle miscele autolitiche integrali, su poltiglie di organi, dunque col metodo fondamentale di VOEGLIN e collaboratori; e devo dire che tanto usando la corrente di O_2 quanto immettendo H_2O_2 , si hanno risultati meno netti che nelle miscele digestive costituite dagli estratti glicerici diluiti. In realtà le condizioni reattive sono nei due casi profondamente diverse: nel comune dispositivo autolitico con poltiglia di organi in acqua cloroformiata o sotto toluolo abbiamo un'alta concentrazione di proteine, che può essere sfavorevole alla manifestazione di eventuale resintesi; la digestione è lenta; l'azione dell' H_2O_2 è da un lato per così dire deviata su tante altre sostanze azotate e no. Invece nella diluizione 1 : 20 di estratto glicerico la concentrazione proteica è bassa, la digestione decorre più rapida, si ha la presenza di glicerina (circa 5 %), che io ho l'impressione non sia indifferente, come corpo idrofilo altamente, nel favorire l'aggregazione o addirittura la resintesi, che implica la liberazione di molecole acquose (la cui disponibilità favorisce la idrolisi). Comunque ho qualche protocollo che mostra una probabile formazione di corpi precipitabili con acido tricloroacetico nelle poltiglie semidigerite di organo proprio anche per gorgogliamento di O_2

come vogliono VOEGTLIN e collaboratori, sebbene secondo il mio parere e quello dei due russi, che hanno controllato le ricerche nostre, le cause d'errore siano tante che è necessaria la massima prudenza nel concludere. Ho cercato di stabilire se altri sistemi ossidanti, per esempio *chinone*, possano dare nelle poltiglie di organo semidigerite risultati più regolari e soddisfacenti: in realtà il seguente protocollo offre un accenno di risultato positivo.

Si preparano in due recipienti a tappo smerigliato due miscele uguali fatte ciascuna con gr. 25 di fegato equino triturato, emc. 50 di miscela di puffer acetici 1 : 1 e 200 emc. di acqua cloroformiata. Subito si prelevano da ciascuna delle miscele, ben agitate e brevemente sedimentate e che chiameremo A e B, con pipetta 20 emc. di liquido, che si filtra per carta e su 10 di ciascun filtrato (privo di frammenti grossolani, limpido) si mettono emc. 2,5 di soluzione acido tricloroacetico 20 %, in modo da precipitare le proteine. Si filtra su filtro tarato, si ha un precipitato A_1 e B_1 e un filtrato A_1 e B_1 . Si fanno gli opportuni lavaggi, i filtrati sono tutti mescolati; si pesano i precipitati seccati a 110° e si determina al Kjeldahl l'N dei precipitati e dei filtrati.

I due recipienti stanno 18^h a 37°; poi si fa nuovo prelievo da ciascuno di 20 emc. di liquido, che si filtra; e 10 di filtrato servono per la solita precipitazione con acido tricloroacetico. Si hanno così precipitati e filtrati e si determina il peso dei precipitati (A_2 e B_2) e l'N dei precipitati stessi e dei filtrati.

A questo punto i trattamenti del recipiente A del B divergono:

In A aggiunta da buretta di soluzione normale NaOH fino a reazione neutra al tornasole; e immissione di gr. 0,06 di chinone. Prelievo di 20 emc. subito, filtrazione, precipitazione di proteine con acido tricloroacetico su 10 emc. di filtrato; e determinazione peso e N del precipitato e filtrato (A_3).

In B aggiunta di acqua in quantità eguale alla soluzione alcalina immessa in A. Niente chinone.

Prelievo come da A.

Determinazione peso proteine e N in precipitato e filtrato (B_3).

I due recipienti stanno 5^h a 37°, agitando spesso; quello A imbrunisce di poco (idrochinone). Poi si fa dai due nuovo prelievo di 20 emc., filtrando e su 10 del filtrato operando al solito. Si hanno i valori A_1 e B_1 , il cui confronto A_3 e B_3 deve dire se c'è stata ulteriore digestione, arresto ed eventuale inversione.

Reperti:

	Pesi precipitazione proteine	N precipitato	N filtrato	Proporzione di N precipitato e N filtrato su 100 N
A ₁	19,4	3,08	0,7	81,48 : 18,52
A ₂	9,5	1,40	11,27	11,04 : 88,96
A ₃	6,9	1,05	10,50	9,09 : 90,91
A ₄	7,2	1,26	9,31	11,92 : 88,08
B ₁	16,7	2,38	0,7	77,27 : 22,73
B ₂	12,3	1,96	12,32	13,72 : 86,28
B ₃	11,4	1,82	11,06	14,15 : 85,95
B ₄	9,8	1,77	12,77	12,17 : 87,83

Si deve tener conto che nel passaggio dai reperti 2 a 3 c'è una diluizione (aggiunta di soluzione alcalina in A e di acqua in B); che perciò la concentrazione totale deve variare in meno, in tutti i casi; che la alcalinizzazione di A implica modificazione delle proteine disciolte, che in parte precipitano prima, via via che ci si approssima al punto isoelettrico, eppoi si risciolgono; che dai frammenti di fegato triturato passano sempre nuove proteine e prodotti di disintegrazione in soluzione e così si spiegano i bassi valori dell'N in A₁ e B₁, in specie nel filtrato. Onde tante cause di irregolarità di cui pare alcuni Autori poco si preoccupino. Tutto valutato però e istruttivo il confronto fra i valori 3 e 4: il peso del precipitato proteico è in A aumentato da 3 a 4, ossia per 5 ore di nuovo soggiorno a 37° in presenza di chinone; com'è, di pochissimo, aumentato il contenuto in N di esso, mentre è diminuito il contenuto in N del filtrato. Invece in B seguita a calare (progresso di digestione) il peso del precipitato da 3 a 4, come cala l'N di esso, mentre aumenta l'N del filtrato. Dunque il chinone ha certo ostacolato la proteolisi, al pari di tutti gli agenti ossidanti e forse ha operato una lieve inversione di essa in processi ricostruttivi.

Sono ben lungi dal presumere di avere risolto questa ardua questione, di cui RONDONI (*Cancro*, 1933) ha accennato la importanza per le questioni cancerologiche. Resta ad ogni modo stabilito che gli agenti ossidanti sono ostacolanti per la proteolisi catepsica; ed è probabile che possano favorire fenomeni di aggregazione o di sintesi, secondo principî teoricamente svolti, dal punto di vista energetico, da WURMSER (ossidazioni legate alla sintesi ossia fornenti energia per lo svolgimento di sintesi).

d) *Influenza di sieri normali ed immuni sulla proteolisi in fegato di animali normali ed immunizzati.*

I raccordi fra le ricerche immunologiche e sierologiche da un lato e quelle enzimatiche dall'altro sono scarsi, incerti e frammentari. C'è bensì tutto lo sviluppo dottrinale di ABDERHALDEN e collaboratori sui così detti *fermenti protettivi*, di recente meglio studiati, purificati e trovati, secondo quella scuola, di una specificità così elevata che non ha riscontro neppure nelle reazioni sierologiche più delicate. Ma tutto il corpo dottrinale e sperimentale di ABDERHALDEN fa parte a sè, lo stesso ABDERHALDEN negando che i suoi « Abwehrfermente » abbiano qualcosa a fare colle catepsine; ed esso non ha purtroppo trovato finora quel largo e spassionato controllo che meriterebbe soprattutto da parte degli immunologi. Io devo stare nel campo ben definito delle catepsine e precisamente delle proteinasi catepsiche; e mi sono domandata se la autodigestione degli organi (il fegato è pur sempre il più comodo ad elaborare, anche per ragioni di massa) sia in qualche modo influenzata dalla esistenza nel mezzo di un siero, il quale abbia relazioni immunologicamente specifiche coll'organo stesso. Queste relazioni possono essere in doppio senso: si può studiare se e come la digestione sia influenzata quando alla miscela digestiva si aggiunge un siero immune (precipitante) diretto contro le proteine della specie cui appartiene l'organo in autolisi; nel qual caso noi sagliamo l'influenza eventuale di anticorpi esistenti nel mezzo e specifici per la proteina in funzione di substrato enzimatico, ossia sagliamo se e come la digestione di una proteina-antigene è modificata dalla presenza e presumibilmente legame degli anticorpi aggiunti. Oppure noi possiamo studiare lo svolgersi della digestione in organo di animale previamente immunizzato contro sieri eterologhi; e vedere se e come questa digestione sia influenzata dalla aggiunta del siero-antigene al mezzo; nel qual caso noi sagliamo l'eventuale modificazione che alla funzione catepsica può portare l'essere presenti nel substrato le strutture specifiche (anticorpi) che la immunizzazione ha evocato, quando specialmente nel mezzo reattivo siano presenti anche gli antigeni (proteine seriche). Esperienze richiamanti in parte le mie si devono parecchi anni fa a PICK e HASHIMOTO, spesso citati, i quali intanto nel fegato di cavie previamente sensibilizzate mediante siero eterologo trovano alti valori dell'N incoagulabile ad espressione di intensificati fenomeni autolitici *intravitali*, valori che sarebbero ridotti dalla precedente estirpazione della milza, la quale pertanto conterrebbe principi acceleratori dell'autolisi epatica. Il siero di cavie sensibilizzate mediante siero di cavallo ossia un siero immune ha un'azione esaltante sulla autolisi *in vitro* del fegato di cavia, mentre

il siero normale inibisce di regola l'autolisi; se a questa miscela, di fegato più siero immune, si aggiunge un po' dell'antigene (siero di cavallo), si ha una inibizione potente della digestione. Infine, secondo questi Autori un fegato di animale sensibilizzato, che *in vivo* offre, come si è detto, alti valori di disintegrazione proteica, *in vitro* si digerisce come uno normale; ma se si aggiunge alla poltiglia di fegato del siero antigene (cavallo), allora si ha una inibizione molto più forte di quella dovuta al siero normale: PICK e HASHIMOTO parlano di uno shock anafilattico *in vitro* nel fegato di cavie sensibilizzate previamente. Si potrebbe supporre dunque che la interazione antigene-anticorpi in una miscela digestiva potesse in varia guisa influenzare la digestione.

Trovo anche una osservazione di SKORODUMOFF secondo cui mentre il siero umano normale inibisce l'autolisi di organi di morti per tifo esantematico, il siero di ammalati invece (siero immune?) avrebbe azione esaltante.

Che i sieri normali abbiano azione inibitrice sulla autolisi e perciò sulla funzione catepsica è certo per dati di BRADLEY ed altri; ed in rapporto, almeno in parte, colla notevole resistenza delle proteine plasmatiche alle azioni proteolitiche in genere. Infatti io stessa ho veduto che la proteolisi, secondo la nostra tecnica, procede molto più avanti se si elaborano organi perfusi in modo da togliere al possibile tracce di proteine plasmatiche (e di emoglobina). Comincio dunque dal riportare un protocollo sperimentale che mostra la inibizione da siero normale, sia questo omologo od eterologo rispetto all'organo in autolisi; e la inibizione dovuta ad un siero immune, ma senza relazione sierologica specifica coll'organo.

Si preparano le seguenti miscele:

- a) Acqua bidistillata cmc. 140
Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12
Estratto glicer. fegato coniglio normale cmc. 9;
- b) Acqua bidistillata cmc. 137
Puffer acetici 1 : 1 cmc. 12
Siero di cavallo diluito 1 : 2 con soluzione fisiologica cmc. 3
Estratto come sopra cmc. 9;
- c) Come in b), tranne che invece del siero di cavallo si ha eguale dose e concentrazione di siero di coniglio normale;
- d) come in b) e c), tranne che il siero è di coniglio immunizzato con siero di cavallo (siero di coniglio precipitante anti-cavallo).

Facendo da ogni miscela i soliti prelievi di 50 cmc. per volta a vario tempo e cioè subito, dopo 3 e dopo 6 ore a 37°, e precipitando le proteine (20 cmc. soluzione 20 % di acido tricloroacetico), indi raccogliendole su filtro tarato e pesando, si hanno i seguenti valori, cui corrispondono le rispettive quote percentuali di digestione.

Tempo di digestione	a)		b)	
	mgr. proteina non digerita	% di digestione	mgr. proteina non digerita	% di digestione
0	60	—	98,4	—
3h	47,6	20,6	94,2	4,3
6h	34,9	41,8	83,8	14,9

Tempo di digestione	c)		d)	
	mgr. proteina non digerita	% di digestione	mgr. proteina non digerita	% di digestione
0	73,6	—	73,4	—
3h	62,3	15,3	68,3	6,9
6h	59,0	19,8	65,1	11,3

La inibizione è evidente per tutti i sieri, che importano un'alta dose di zavorra proteica male digeribile nelle tre miscele *b)*, *c)*, *d)*; è massima in *d)*, che contiene un siero omologo rispetto al substrato, ma immune, cioè di coniglio trattato con proteine equine che non trovano rappresentanza in questo esperimento: probabilmente la più alta azione inibente proprio di questo siero dipende dal suo alto contenuto in proteine, specie in globuline, proprio di tutti i sieri immuni. Fra siero normale omologo ed eterologo rispetto al substrato non c'è gran differenza: semmai si può notare che il siero di cavallo (eterologo) inibisce un po' più dell'omologo (coniglio).

Venendo ora alle serie sperimentali in cui è attuata la coesistenza di antigene ed anticorpi, comincio dal riferire sul primo tipo di esperimenti, in cui un siero immune è addizionato alla miscela di digestione della proteina antigene. Si è adoperato in tal caso estratto di fegato di cavallo, allestito colla solita tecnica di WALDSCHMIDT-LEITZ e DEUTSCH; e, a seconda del solito procedimento, si è saggiata l'aggiunta di siero di coniglio anticavallo come di siero di coniglio normale e di cavallo normale. I risultati sono stati piuttosto negativi, tanto che credo inutile riportare dei protocolli: si è osservata la consueta lieve inibizione da sieroproteine sul processo digestivo; ed il siero immune ha offerto solo, in confronto al normale, una lievissimamente maggiore azione inibente sulla digestione, il che si può spiegare col fatto che siero immune vuol dire siero con più alto contenuto proteico e specialmente globulinico e quindi probabilmente

anche e forse solo per ciò è più antiproteolico, come ho visto a proposito del surriportato esperimento preliminare in cui la digestione del fegato di coniglio era inibita al massimo da siero di coniglio anticavallo. Non è dunque presumibilmente rilevabile alcuna netta influenza sulla funzione catepsica per parte della interazione fra antigene (che è qui il substrato della digestione, la proteina di cavallo) ed anticorpi aggiunti; ma si svolgono solo influenze inibitrici probabilmente aspecifiche per parte delle proteine seriche, abbiano esse o no impronta di anticorpi o siano esse o no vettrici di anticorpi.

Per dare un esempio dei valori di queste inibizioni seriche dirò che in due esperienze con estratto di fegato equino e siero di coniglio anticavallo o normale, si ebbero le percentuali di digestione (alla 6^a ora) seguenti:

Data esperimento	Digestione in estratto solo	Digestione in estratto + siero immune	Digestione in estratto + siero normale
19 dicembre 1933	17 %	4,3 %	10 %
10 gennaio 1934	18 %	7,7 %	12,5 %

Dunque concordanza di risultati a distanza di tempo, mostrandoci inibizioni modeste e di regola più considerevoli ad opera dei sieri immuni, senza che io sappia dare un significato specifico a questa differenza.

Si noti che i sieri stessi talora in questo dispositivo sperimentale hanno offerto, nei necessari controlli in cui essi erano soli, senza estratto di organo, segni di lieve proteolisi; ma talora anche dei curiosi e probabilmente apparenti aumenti, per quanto lievissimi, di contenuto proteico col soggiorno a 37°. Forse si tratta semplicemente di errori sperimentali, inevitabili quando si lavora con miscele complesse, e di difficoltà che le proteine seriche oppongono ad accurato lavaggio sui filtri.

Comunque ho voluto ripetere questa ricerca con altra tecnica, anche per evitare l'obiezione di una eventuale azione disturbatrice della glicerina sulla interazione dell'antigene coll'anticorpo; e precisamente su poltiglie di organo tenute in acqua cloroformiata, debitamente aggiustate riguardo al pH; titolando poi i prodotti della digestione al formolò od all'alcool secondo WILLSTÄTTER. Con questo metodo autolitico vecchio si ottengono spesso delle digestioni scarsissime dei fegati freschi di cavallo prelevati al Macello: evidentemente l'aumento dei gruppi aminici e carbossilici liberi e titolabili è limitato, formandosi più che altro prodotti elevati di scissione proteica, la quale non progredisce molto; quindi è difficile avere dei protocolli molto persuasivi. Tuttavia, specie col metodo all'alcool, ho avuto netta prova della lieve inibizione serica, senza differenze degne di nota fra sieri normali (di coniglio) ed immuni (di coniglio anticavallo): qui non

c'è presenza di materiali disturbatori, la concentrazione degli anticorpi risulta elevata; eppure influenze nette ritardanti o acceleranti non si affermano.

Vengo così all'altro tipo di esperimento, con estratto di fegato di animale immune (conigli trattati con siero di cavallo endovena ripetutamente, per preparare sieri precipitanti anticavallo) messo a digerire in presenza dell'antigene serico (siero di cavallo). Anche qui il siero ha offerto un'azione inibente; e questa sembra qui di grado maggiore di quella usualmente dovuta al siero. Vi sono state tuttavia delle differenze da esperimento ad esperimento: una volta la digestione della epatoproteina immune (come potremmo chiamarla) di coniglio è stata dalla presenza di siero equino antigene del tutto arrestata, tanto da ricordare l'esperimento di PICK ed HASHIMOTO sul così detto shock anafilattico *in vitro*. In realtà il mio dispositivo non si allontana questa volta molto da quello di questi Autori; ma si trattava per l'appunto di un estratto autodigerente piuttosto scarsamente, per cui una modesta inibizione può portare facilmente ad arresto od apparenza di arresto della proteolisi. Altre volte si sono avute inibizioni di grado modesto, di poco superiori a quelle date da siero non antigene (siero di coniglio normale o immune, ossia siero omologo alla proteina dell'estratto). Esperienze di autolisi in poltiglie di organi non hanno dato risultati utilizzabili per la quasi costante scarsità della digestione. In conclusione un effetto inibente del siero antigene sulla proteina immune è costante; ed esso pare di regola di un grado superiore a quello che le sieroproteine in genere esercitano sulla proteolisi catepsica; onde non è esclusa una certa interferenza dell'antigene serico colla digestione della proteina immune ad opera delle catepsine. Ma non è possibile dire fino a che punto questa interferenza sia specifica e da cosa dipenda. Mi pare che parlare di uno shock *in vitro* sia un'esagerata valorizzazione di queste nell'insieme modeste influenze; ma ulteriori ricerche potranno essere opportune.

Del resto siamo qui in presenza di una serie di incognite: sono presenti anticorpi, sia pure in forma *mascherata*, nel fegato dell'animale immune, a prescindere da quelli corrispondenti a residui di plasma sanguigno? È questo un punto che è argomento di ricerche in questo laboratorio, sulle quali sarà riferito a suo tempo. Se anticorpi vi sono, possono essi modificare la funzione catepsica? Ossia, può la impronta specifica assunta dalle proteine dell'organo avere relazione colla attaccabilità per parte degli enzimi o possono gli enzimi essere influenzati dai gruppi specifici in funzione di anticorpi o da complessi anticorpi-antigeni formati nelle miscele? All'oscuro come siamo sull'origine ed essenza intima degli anticorpi (la cui chimica è molto meno progredita di quella degli antigeni) non possiamo oggi rispondere a queste domande; e dobbiamo contentarci di registrare dei fatti.

e) *Le catepsine nella necrosi ischemica.*

Si è già accennato agli interessanti reperti di BORGER, PETERS e KURZ sulla scomparsa del glutatione nei tessuti ischemizzati e nell'infarto. Ho voluto io stessa farmi un'idea del comportamento globale della funzione catepsica nei tessuti sottoposti a necrosi ischemica e precisamente nel rene dopo legatura dell'arteria renale, oggetto di studio questo molto comodo perchè consente il confronto coll'organo normale controlaterale. Non ho cercato di differenziare e dosare un eventuale attivatore, che potrebbe in organi così profondamente alterati essere sostituito da altri ignoti, derivanti dalla stessa scomposizione delle proteine una volta avviata; ma ho semplicemente stabilito l'attività catepsica del rene in stato di ischemia e del rene normale, preparando estratti con glicerina acida secondo il solito sistema e seguendo l'auto-proteolisi dopo la consueta diluizione.

A cinque conigli in narcosi eterea lego l'arteria renale *sinistra* (aggressione extraperitoneale del rene dalla regione dorsale, con taglio longitudinale a circa cm. 3 dalla linea mediana), avendo cura di risparmiare la vena emulgente e l'uretere. Decorso operatorio perfetto; assenza di ogni complicanza infettiva. Dei 5 conigli uno è sacrificato dopo 24 ore, uno dopo 48 e gli altri tre dopo 72 ore (salasso dalla carotide). Il reperto anatomico è il seguente:

Dopo 24 ore: il rene operato si presenta molto ingrossato e rosso cupo; peso gr. 16. Al taglio fuoriesce liquido rosso cupo, superficie di taglio rosso cupo uniforme, non differenziata la corticale dalla midollare. Dopo riduzione in piccoli frammenti e spremitura con carta bibula, il peso si riduce a gr. 8. Tessuto perirenale edematoso. Il rene non operato (destra) pesa gr. 6,5; colore normale.

Dopo 48 ore: il rene operato si presenta ingrossato e di colore molto chiaro; pesa gr. 8,7; al taglio la corticale biancastra appare nettamente differenziata dalla midollare che è rosso cupa. Dopo frammentazione e spremitura il peso si riduce a gr. 7,7. Tessuto perirenale edematoso. Il rene destro di aspetto normale pesa gr. 6,7.

Dopo 72 ore il rene operato nei tre conigli si presenta un po' ingrossato e pallido; al taglio evidente la necrosi ischemica della corticale; il rene destro di aspetto normale. Pesi: rene operato rispettivamente gr. 13,7; gr. 18,5; gr. 14,2; rene destro non operato gr. 10; gr. 13,2; gr. 10.

L'esame istologico praticato su un piccolo frammento del rene di 72 ore offre: necrosi estesa a carattere di n. da coagulazione soprattutto nella *cortex corticis* ed in tutto il parenchima; edema diffuso dell'interstizio; fitto vallo leucocitario fra corticale e midollare, con infiltrati insinuanti verso la midollare, fra i canalicoli delle piramidi.

Gli estratti sono stati praticati mettendo la glicerina acida in proporzione di 3 parti di peso su 1 parte di organo, invece che 2 su 1 come di consueto. Tanto per rene normale che operato si è ogni volta adottata la stessa quantità di glicerina, calcolata in base al peso del rene normale; ossia, siccome il rene operato pesava sempre di più, abbiamo relativamente preparato estratti più concentrati del rene operato. Lo scopo di questo modo di procedere deriva dalla riflessione che il peso maggiore del rene operato dipende da accumulo di sangue e liquido di edema, che non fa che diluire il contenuto enzimatico e le proteine-substrato; e quindi noi non dobbiamo tenerne conto se vogliamo avere per i due reni estratti al possibile comparabili come diluizione dei reagenti per noi importanti, enzima e substrato. Su ogni estratto si è praticato l'esperimento prendendo cmc. 159 di acqua bidistillata, cmc. 12 di puffer acetici 1 : 1, cmc. 9 di estratto; e di questa miscela si sono fatte tre porzioni di cmc. 50 ciascuna. Una porzione è stata subito addizionata con 20 cmc. di soluzione 20 % di acido tricloroacetico; una porzione è stata 3 ore ed una 6 ore a 37°; quindi pure addizionata id. Raccolta dei precipitati proteici su filtri tarati; disseccamento e pesata; e talora (in tre estratti) determinazione dell'N al Kjeldahl. La tabella a pag. 231 dà i risultati.

La tabella mostra parecchie irregolarità le più gravi delle quali sono state da me contrassegnate con punto interrogativo. In realtà la presenza di sangue, di materiale necrotico, di liquido di edema nel rene operato deve avere condizionato le principali incongruenze fra pesate della proteina ed N relativo, per svariate ragioni: difficoltà maggiori di lavaggio dei precipitati non omogenei, residui di tracce di derivati di pigmento ematico e di lipidi. Anche il rene controlaterale, in stato di avviata ipertrofia compensatoria o almeno di iperfunzione, deve presentare disturbi circolatori importanti errori di rilievo e sconcertanze nei diversi rilievi. Il fatto fondamentale che risulta in modo univoco è la molto più scarsa autodigestione nel rene ad arteria legata in confronto all'altro. I valori della digestione nel rene normale e certo iperfunzionante (destro) sono fra i più elevati da me riscontrati in tutte le mie ricerche: non ho per ora termini di paragone numerosi con reni di coniglio normale; ma per tutte le esperienze mie e di altri sulla funzione catepsica misurata sulle proteine proprie dell'organo, si può affermare essere rara una digestione di oltre il 50 % in qualunque organo. Ora qui i reni destri danno valori fra 60 ed 81 %; e se anche quest'ultimo valore può parere sospetto, perchè tutto l'andamento della proteolisi in quel caso offri delle irregolarità, restano pur sempre valori di 60-68 %, cui corrisponde una percentuale in base al Kjeldahl di 36-57 % (le percentuali in base all'N essendo di regola un po' minori). Nei reni sinistri, con necrosi ischemica, si ha invece una proteolisi scarsa, che sta sempre più o meno al disotto del 50 % dopo 6 ore, anzi nei reni ischemici da 24 e 48 ore non arriva che al 20 %; ed anche

i valori al Kieldahl, ove furono determinati, danno percentuali di digestione dal 9 al 19 % solo. Non è affermabile una direzione costante di modificazione della proteolisi collo scorrere del tempo dalla operazione. Le precauzioni da noi avute nella preparazione degli estratti e l'osservazione del non costante rapporto fra quantità di sangue residuata nel rene e la riduzione dell'attività catepsica mi autorizzano a ritenere che non a presenza di sangue o non solo a questa è dovuta la scarsa proteolisi nel rene operato.

Estratti	Rene sinistro (operato)				Rene destro (non operato)			
	mgr. proteina indiger.	N relativo	% dig. in base peso proteico	% dig. in base N	mgr. proteina indiger.	N relativo	% dig. in base peso proteico	% dig. in base N
Estratto coniglio ucciso dopo 24 ore avanti digestione	62,8	8,96	—	—	26	4,62	—	—
dopo 3 ^h dig. . . .	53,5	8,26	14,8	7,91	13,3	2,92	48,8	36,7
dopo 6 ^h dig. . . .	50,3	8,12	19,8	9,47	10,4	2,52	60	45,4
Estratto coniglio ucciso dopo 48 ore avanti digestione	32,2	5,04	—	—	31,3	4,90	—	—
dopo 3 ^h dig. . . .	28,6	4,62	10,9	8,3	14,2	3,64	54,6	25,6
dopo 6 ^h dig. . . .	25,4	4,03	20,8	19,4	12,5	3,22	60,30	36,3
Estratto coniglio ucciso dopo 72 ore avanti digestione	17,2	4,06	—	—	23,2	4,90	—	—
dopo 3 ^h dig. . . .	16,3	3,64	5,2	10,3	7,3	2,10	68,5	57,1
dopo 6 ^h dig. . . .	?	3,50	?	13,7	4,4	2,10?	81	57,1?
Estratto coniglio ucciso dopo 72 ore avanti digestione	20,2	—	—	—	21,1	—	—	—
dopo 3 ^h dig. . . .	17,2	—	14,8	—	11,3	—	46,4	—
dopo 6 ^h dig. . . .	12,5	—	38,1	—	6,7	—	68,2	—
Estratto coniglio ucciso dopo 72 ore avanti digestione	15,8	—	—	—	14,7	—	—	—
dopo 3 ^h dig. . . .	8,4	—	46	—	8,1	—	44,2	—
dopo 6 ^h dig. . . .	8,4	—	46	—	5,6	—	61,9	—

Io posso affermare per ora questo: che nell'infarto del rene (essenzialmente rosso nelle mie esperienze, onde vero, infarto e non pura necrosi ischemica) si ha una considerevole riduzione di attività catepsica dell'organo, contro normalità o forse elevazione nel rene controlaterale. In fondo il mio reperto concorderebbe con quello di BORGER e collaboratori sulla diminuzione degli attivatori a tipo di glutatione; ed anzi lo integerebbe. Non si inquadra invece nelle più volte citate concezioni che connettono la ischemia e difetto di ossigeno collo scatenarsi dei fenomeni proteolitici. Ma forse ulteriori ricerche potrebbero portare ad una conciliazione sulla base di più precise nozioni. Può darsi che nel tessuto ischemico gli stessi enzimi proteolitici più che variare quantitativamente varino qualitativamente nella loro funzione, conducendo a quei fenomeni di coagulazione che anche per il sangue oggi taluno (WALDSCHMIDT-LEITZ, 1929) vuole identificare con processi proteolitici; per esempio la digestione potrebbe arrestarsi precocemente, a livello di prodotti elevati di idrolisi ancora a carattere altamente colloidale e prontamente gelificanti. Anche ricerche recenti di CALCINAI dimostrano come la papaina, enzima proteolitico vegetale avente grande analogia colle catepsine, produca nella digestione di organi parenchimali di cavia *in vitro* delle alterazioni di certi parenchimi tali da ricordare la necrosi da coagulazione classica; e GROLL parla anzi di una *coagulazione da digestione* negli organi esposti *in vitro* all'azione di enzimi proteolitici ad un pH opportuno e che non coincide con quello ottimale per la consueta funzione digestiva.

Dunque la ridotta digestione quale appare nelle esperienze colla nostra tecnica evidenziante la idrolisi di complesse individualità proteiche e la riduzione dell'N precipitabile coll'acido tricloroacetico, potrebbe benissimo conciliarsi con una speciale modificazione delle proteine dell'organo, sempre a carattere proteolitico ma arrestata e diretta in senso peculiare, per effetto proprio delle condizioni create dalla ischemia e forse proprio per la deficienza, da BORGER e collaboratori dimostrata, dei normali attivatori sulfidrilati che devono spingere la funzione catepsica nell'usuale binario e fino ai prodotti avanzati di scissione.

IV. — RIASSUNTO.

Dopo una esposizione critica delle ricerche eseguite in questi ultimi anni sugli enzimi catepsici od enzimi endocellulari proteolitici, colle tecniche e secondo le direttive soprattutto della scuola di WILLSTÄTTER, di RONA ecc., dalle quali ricerche sono derivate nozioni nuove od impostazioni di nuovi problemi di importanza per la fisiologia normale e patologica, si sono studiati successivamente alcuni punti particolari utilizzando prevalentemente una tecnica (autoproteolisi in estratti glicerici di organo diluiti, determinazione gravimetrica della proteina indigerita e dell'N relativo) che è stata elaborata e largamente applicata in questo laboratorio.

Si conferma l'azione attivatrice della cisteina e dell'acido ascorbico, che, contrariamente a quanto fu da altri asserito, esiste anche quando la proteolisi si studia sulle proteine proprie dell'organo e non solo quando si usano come substrati gelatina o peptoni (eterolisi): ciò che allarga e valorizza dal lato fisiologico le osservazioni di precedenti autori. La l-leucilglicina inibisce la attività catepsica, in modo molto più netto della varietà destogira del dipeptide; si ha dunque un'influenza di certi peptidi sulla funzione delle proteinasi catepsiche; ma non si è riusciti viceversa a dimostrare la comparsa di peptidasi (dipeptidasi) durante la proteolisi. Non si è potuta dimostrare un'azione favorente della proteolisi da parte della l-adrenalina, come vorrebbero ABDERHALDEN e SCHWAB; ma piuttosto l'adrenalina e specialmente la destogira ha un'azione inibente. Una certa azione inibitrice ha un idrocarburo policiclico cancerogeno (1-2-benzopirene) da certe dosi assai piccole in su; dosi ancora minori sono inattive o forse lievemente acceleranti.

È discussa, in base ai risultati anteriori di RONDONI e POZZI, di VOEGTLIN e collaboratori ed a successivi controlli di BLAGOWESTSCHENSKI e KORMAN, la questione della resintesi di proteine o almeno formazione di aggregati precipitabili con acido tricloroacetico nelle miscele digestive sotto influenza di agenti ossidanti. Pare che il fenomeno, anche per le conferme suddette, sussista, la sua interpretazione essendo ancora incerta; e che, come H_2O_2 , anche chinone possa prestarsi a dimostrarlo in certe condizioni. Resta comunque stabilito che gli agenti ossidanti sono ostacolanti per la proteolisi catepsica.

È stata saggiata l'influenza di sieri normali ed immuni sulla proteolisi di fegato di animali normali od immuni, per stabilire se la presenza di relazioni immunologicamente specifiche fra substrato della proteolisi ed

un siero aggiunto al mezzo influenzi comunque l'attività catepsica. Si è affermata costante una certa azione inibitrice dei sieri come tali, normali od immuni, sulla proteolisi; ed una certa maggiore azione inibitrice di sieri immuni, legata probabilmente al più alto contenuto proteico ed in specie globulinico, in confronto ai normali, sia la proteina-substrato enzimatico corrispondente o no all'antigene quando si è saggiato siero immune (combinazione: estratto di fegato di cavallo in digestione in presenza di siero di coniglio anticavallo). Si è avuta una inibizione di regola un poco più spiccata per parte del siero quando esso rappresentava l'antigene rispetto all'organo di animale immune nella miscela digestiva (combinazione: estratto di fegato di coniglio immunizzato con siero di cavallo in digestione in presenza di siero di cavallo). Non si evidenziano così influenzamenti molto spiccati della funzione catepsica per parte di eventuali interazioni fra antigeni ed anticorpi; e molto incerto è se nella seconda combinazione suddetta possa parlarsi di uno shock anafilattico *in vitro* a carico della attività enzimatica.

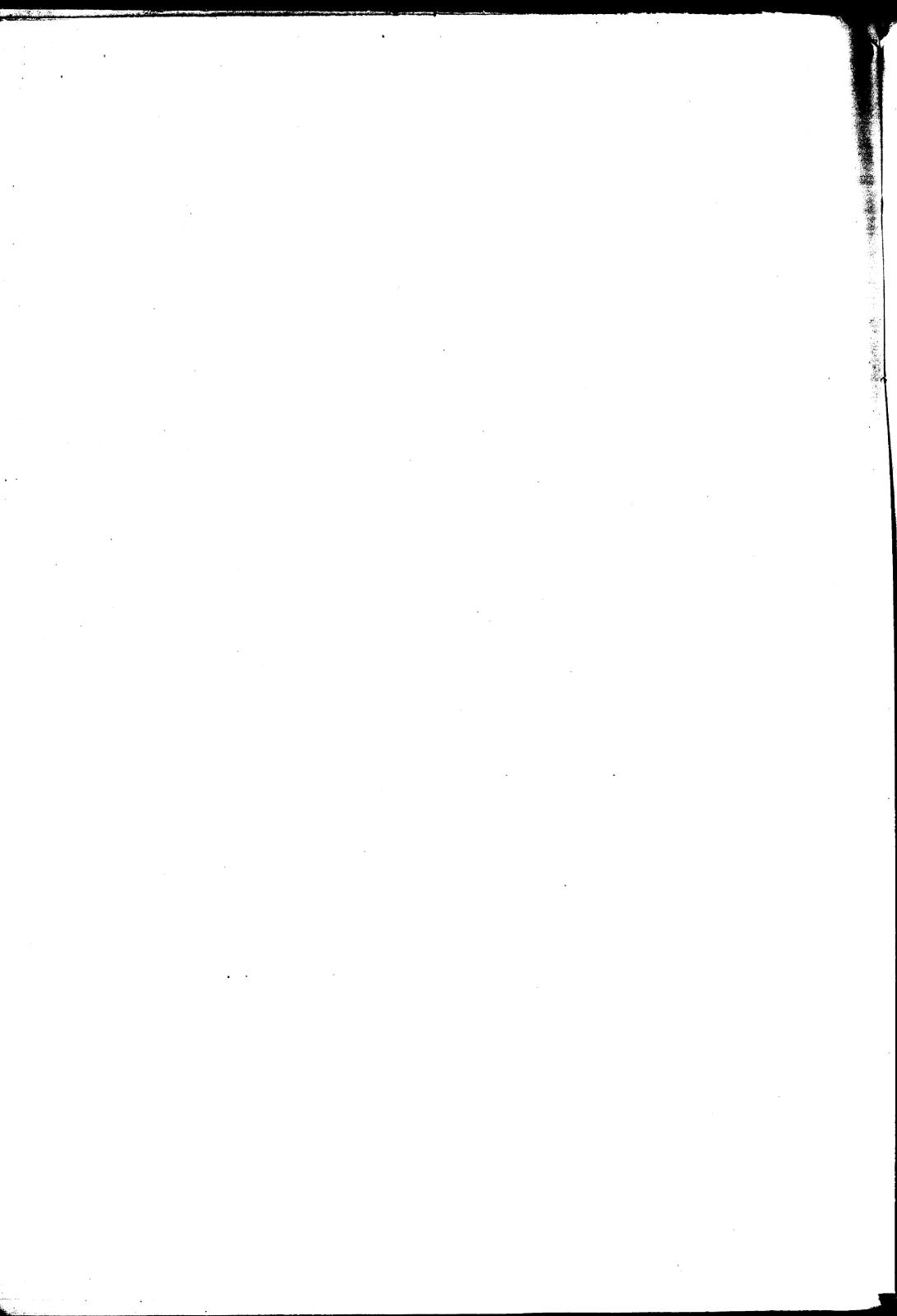
È stata studiata la funzione catepsica in rene reso ischemico per legatura dell'arteria renale in confronto al normale controlaterale: il reperto fondamentale è la riduzione di questa funzione 24-72 ore dopo l'operazione, contro normalità o forse intensificazione della stessa funzione nel rene opposto. Questo risultato concorda sostanzialmente colla osservazione recente di BORGER, e collaboratori sulla scomparsa di attivatori sulfidrilati (glutatione) nell'infarto.

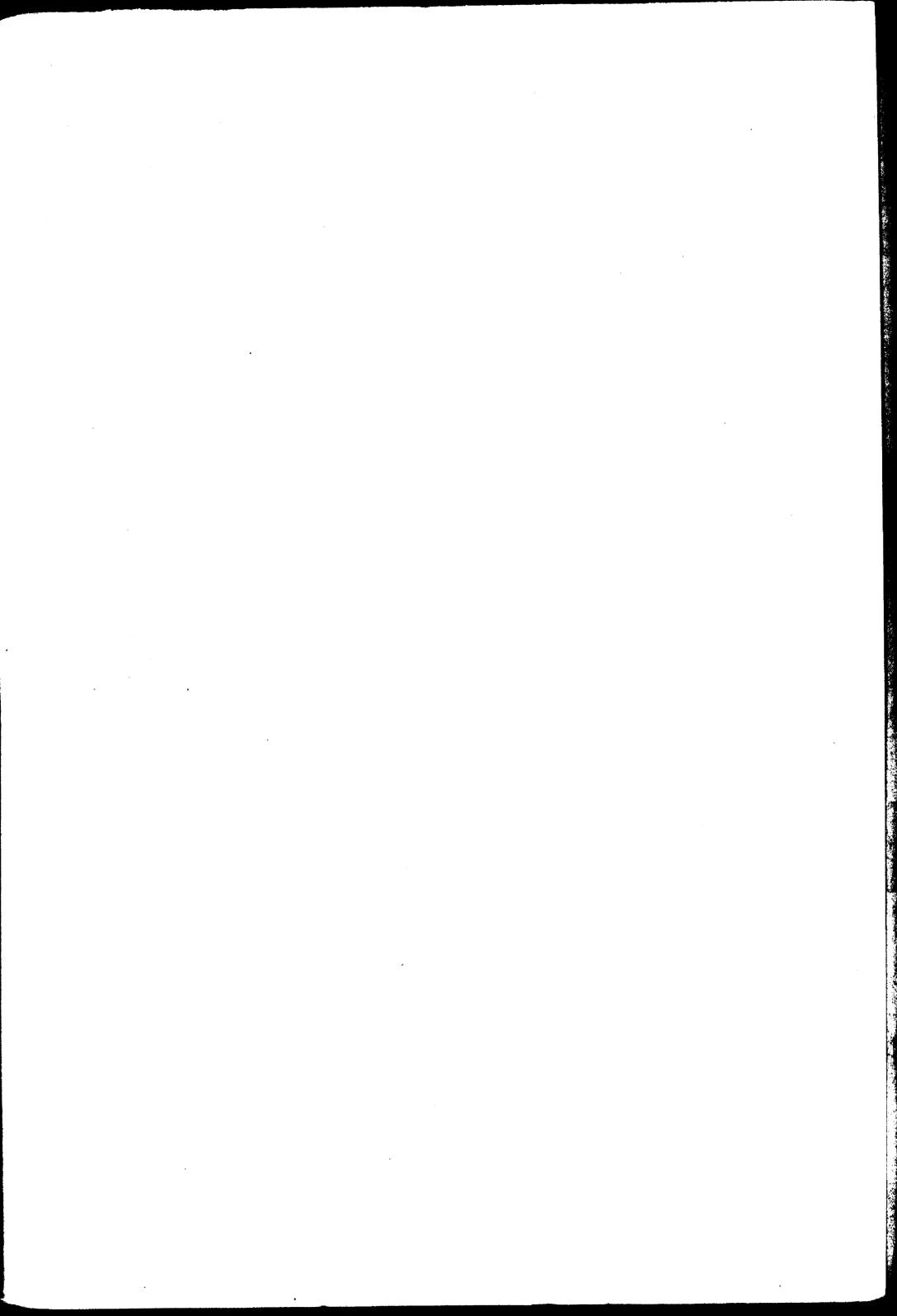
BIBLIOGRAFIA

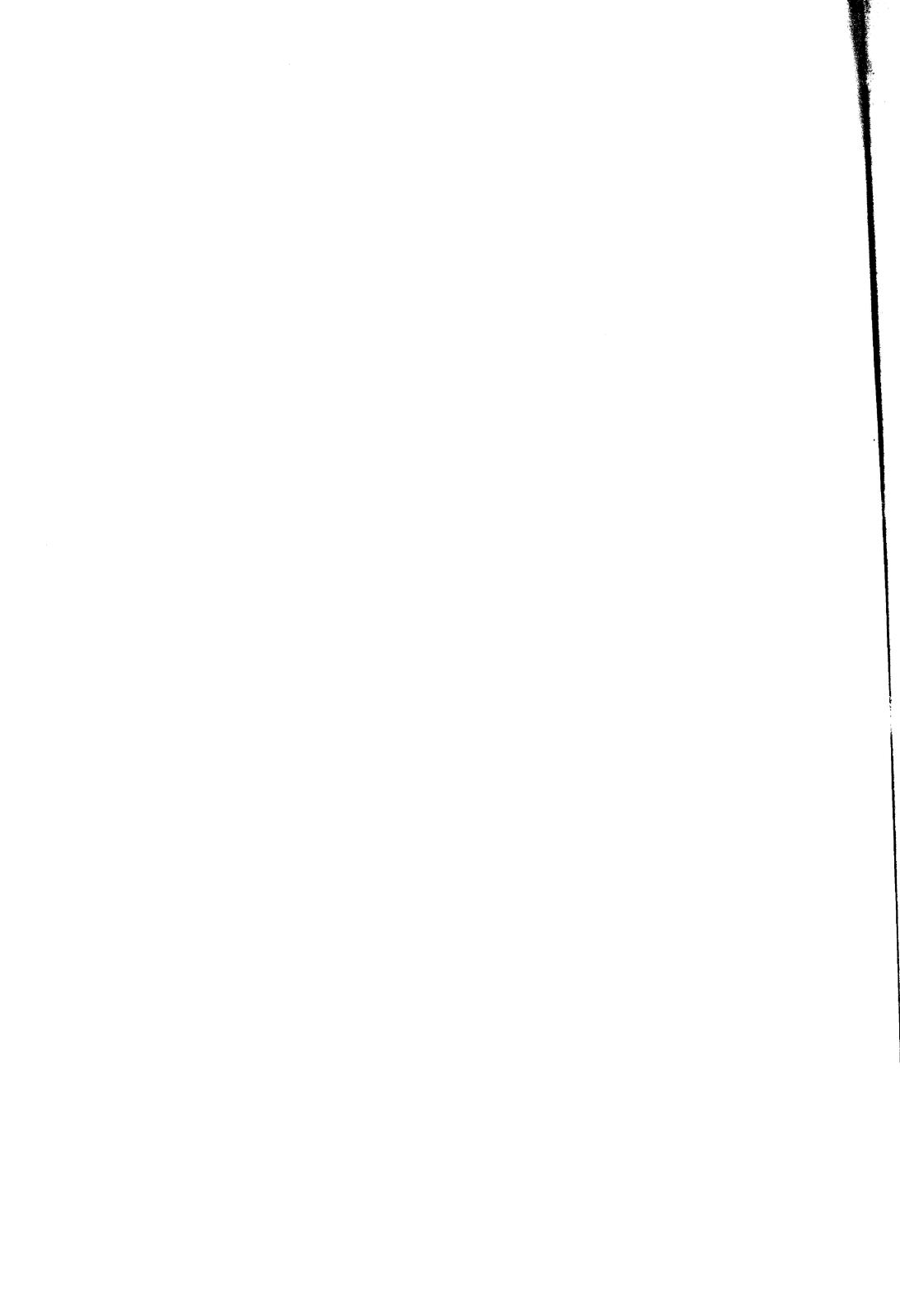
- ABDERHALDEN e E. v. EHRENEWALL, « Fermentforsch. », vol. 12, pag. 411, 1931; vol. 13, pag. 47 e 262, 1932; vol. 14, pag. 1, 1933.
- ABDERHALDEN e SCHWAB, « Fermentforschung », vol. 13, pag. 544, 1933; vol. 14, pag. 43, 1933.
- AMBROS e HARTENECK, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 181, pag. 24, 1928-29.
- BERSIN, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 220, pag. 209, 1933; vol. 222, pag. 177, 1933.
- BLAGOWESTSCHENSKI e KORMAN, « Biochem. Zeitschr. », vol. 270, pag. 341, 1934.
- BOLAFFI, « Tumori », vol. XV, pag. 1, 1929; « Bioch. e Terap. sperim. », vol. 18, pag. 77 e pag. 372, 1931.
- BORGER, « Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. », vol. 164, pag. 469, 1932.
- BORGER e PETERS, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 214, pag. 91, 1933.
- BORGER, PETERS e KURZ, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 217, pag. 255, 1933.
- BORGER e ZENKER, « Verhandl. d. d. pathol. Gesellschaft », 1931.
- BORGHI e DEOTTO, « Zeitschr. f. Krebsforsch. », vol. 40, pag. 293, 1934.
- BOYLAND, « Biochem. Journ. », vol. 27, pag. 791, 1933.
- BRADLEY, « Physiol. Reviews », II, pag. 415, 1922.
- BRADLEY e collab., « Journ. of biol. Chem. », vol. 61, pag. 807, 1924.
- BROMLEY e ORECHEWITSCH, « Biochem. Zeitsch. », vol. 272, pag. 324, 1934.
- CALCINAI, « Sperimentale », anno 87, pag. 437, 1933.
- CALCINAI e GALIGANI, « Bioch. e Terap. sperim. », vol. 21, pag. 227, 1934.
- CARREL, « Journ. of exp. Med. », vol. 17, pag. 14, 1913.
- CARREL e BAKER, « Journ. of exp. Med. », vol. 44, pag. 503, 1927.
- CLEMENTI, « Biochem. Zeitschr. », volume 136, pag. 71, 1923.
- DASTRE e STASSANO, « Arch. intern. d. physiol. », vol. 1, pag. 86, 1904.
- DE BRUYNE, « Journ. de phys. et d. pathol. gen. », vol. 22, fasc. 4, 1924.
- DEMUTH e RIESEN, « Bioch. Zeitschr. », vol. 203, pag. 22, 1928.
- EDLBACHER, KRAUS e WALTER, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 206, pag. 65, 1932.
- EULER, KARRER e ZEHENDER, « Helv. chem. Acta », vol. 17, pag. 157, 1934.
- FISCHER A., « Gewebezüchtung », 3te Aufl. München, 1930.
- GRASSMANN, « Proteasen in Oppenheimer Handb. d. Biochem. Ergänzungs. », Fischer, Jena, 1930.
- GRASSMANN, SCHOENEBECK e EIBELER, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 194, pag. 124, 1930-31.
- GRAY, « A text-book of experimental Cytology », The University Press, Cambridge, 1931.
- GROLL, « Ziegler's Beitr. z. pathol. Anat. », vol. 93, pag. 477, 1934.

- HAMBURGER e HEKMA, « Journ. de physiol. et pathol. », vol. 4, pag. 805, 1902.
- HEDIN, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 207, pag. 213, 1932; vol. 216, pag. 203, 1933.
- HEDIN, « Journ. of physiol. », vol. 30, pag. 155, 1904; « Biochem. Journ. », vol. 2, pag. 112, 1906-907; « Journ. of. biol. Chem. », vol. 54, pag. 177, 1922.
- IWANOFF, « Bioch. Zeitschr. », vol. 63, pag. 359, 1914; vol. 120, pag. 1, 1921.
- KARRER e ZEHENDER, « Helv. chem. Acta », vol. 16, pag. 701, 1933.
- KLEIN e ZIESE, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 211, pag. 23, 1932.
- KLEINMANN, « Klin. Woch. », 1931, n. 32.
- KLEINMANN e STERN, « Bioch. Zeitschr. », vol. 222, pag. 31 e pag. 84, 1930.
- KOSTYTSCHEW e BRILLIANT, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 91, pag. 372, 1914.
- KREBS, « Biochem. Zeitschr. », vol. 220, pag. 281, 1930; vol. 238, pag. 174, 1931.
- LAQUEUR, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 79, pag. 82, 1912.
- MALOWAN, « Zeitschr. f. Krebsforsch. », vol. 37, pag. 277, 1932.
- MARRACK, « Chemistry of antigens and antibodies », His Majesty's Stationery Office, London, 1934.
- MASCHMANN e HELMERT, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 216, pag. 141 e pag. 161, 1933.
- MASCHMANN e HELMERT, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 222, pag. 207, 1933; vol. 223, pag. 127, 1934; vol. 224, pag. 56, 1934.
- MITCHELL e HAMILTON, « The biochemistry of aminoacids », Chemical Catalog Comp., New York, 1929.
- MOTHES, « Naturwissensch. », 20 Jahrg. pag. 102, 1932.
- NORTHROP, « Naturwissensch. », vol. 11, pag. 713, 1923.
- PASTORI, « Arch. di scienze biol. », volume 17, pag. 164, 1932.
- PIANESE, « Atti R. Accad. medico-chir. di Napoli », 1917.
- PICK e HASHIMOTO, « Zeitschr. f. Immunitätsf. », vol. 21, pag. 237, 1914; « Arch. f. exper. Pathol. u. Ther. », vol. 76, pag. 89, 1914.
- POZZI, « Rendic. R. Acc. Naz. Lincei », vol. 17, serie 6^a, 1^o sem., fasc. 7, 1933.
- POZZI, « Rendic. R. Acc. Naz. d. Lincei », vol. 17, serie 6^a, 1^o sem., fasc. 10, 1933.
- PURR, « Biochem. Journ. », vol. 27, pag. 1703, 1933.
- REISS P., « Compt. rend. d. l. Soc. d. biol. », vol. 95, pag. 51, 1926.
- RONA e KLEINMANN, « Bioch. Zeitschr. », vol. 241, pag. 283, 316, 1931.
- RONDONI, *Il Cancro*, vol. 3, pag. 96, 1932; vol. 4, pag. 203, 1933.
- RONDONI, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 207, pag. 103, 1932; « Boll. Soc. Ital. sper. », vol. 7, fat. 4, 1932; « Biochem. Journ. », vol. 26, pag. 1477, 1932.
- RONDONI e POZZI, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 219, pag. 22, 1933.
- SALASKIN e SOLOWJEW, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 200, pag. 259, 1931.
- SKORODUMOFF, cit. sec. « Oppenheimer's Handb. d. Biochem. », vol. II, pag. 641, 1925.
- STERN, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 199, pag. 169, 1931.
- STERN, « Biochem. Zeitschr. », vol. 234, pag. 116, 1931.
- STERN, « Klin. Woch. », 1930, n. 37; « Biochem. Zeitschr. », vol. 234, pagina 116, 1931.
- VOEGLIN e MAVER, « Public Health Rep. », vol. 47, pag. 711, 1932.

- VOEGLIN, MAVER e JOHNSON, « Science », vol. 77, pag. 92, 1933; « Journ. of pharmac. a. exp. Therap. », volume 48, pag. 241, 1933.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 132, pag. 181, 1924; vol. 183, pag. 39, 1929.
- WALDSCHMIDT-LEITZ e DEUTSCH, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 167, pag. 285, 1927.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, MC DONALD e collab., « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 219, pag. 115, 1933.
- WALDSCHMIDT-LEITZ e PURR, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 198, pag. 260, 1931.
- WALDSCHMIDT-LEITZ e SCHÄFFNER, « Naturwissensch. Hahrg. », 18, pagina 280, 1930.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, SCHÄFFNER, BECK e BLUM, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 188, pag. 17, 1930.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, SCHARIKOWA e SCHÄFFNER, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 214, pag. 75, 1933.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, WEIL e PURR, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 215, pag. 64, 1933.
- WILLSTÄTTER, « Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren... ». In « Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeit-smeth. », Abt I, T. 7, H. 2.
- WILLSTÄTTER e BAMANN, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 127, pag. 130, 1928-29.
- WILLSTÄTTER, BAMANN e RHODEWALD, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 188, pag. 107, 1930.
- WILLSTÄTTER e collab., « Untersuchungen über Enzyme », Berlin, Springer, 1928.
- WILLSTÄTTER e RHODEWALD, « H. S. Zeitschr. f. phys. Chem. », vol. 204, pag. 181, 1932; vol. 208, pag. 258, 1932.
- WOLFF e collab., « Nature », vol. 132, pag. 315, 1933.
- WURMSER R., « Oxydations et réductions », Presse Univers. d. France, Paris, 1930.
-









Prezzo : L. 9.