

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXI.

1914

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1914

Chimica biologica. — *Ricerche sulla arginasi* ⁽¹⁾: *la distribuzione della arginasi nell'organismo e nella serie dei vertebrati.*
Nota II del dott. ANTONINO CLEMENTI, presentata dal Socio
L. LUCIANI.

Dato l'alto interesse fisiologico che presenta la conoscenza della distribuzione dell'arginasi nelle diverse classi dei vertebrati, e data la mancanza assoluta di notizie in proposito, ne ho intrapreso e condotto a termine la ricerca sistematica, ottenendo i risultati che qui sinteticamente sono riassunti.

Tecnica. — Nelle mie ricerche ho adoperato, in tutto, da 40 gr. a 50 gr. di arginina. Per preparare l'arginina, si ricavarono, da 12 kgr. circa di seme di canapa, 700 gr. di edestina; questa fu idrolizzata bollendola in diverse porzioni con acido solforico al 25 %, per 14 ore circa, in apparecchio a ricadere; dalla sostanza, idrolizzata seguendo il metodo di A. Kossel e Kutscher ⁽²⁾ colle modificazioni che si adoperano nell'Istituto di fisiologia di Heidelberg.

⁽¹⁾ Ricerche eseguite nell'Istituto di fisiologia dell'Università di Heidelberg, diretto dal prof. Albrecht Kossel.

⁽²⁾ Kossel A. und Kutscher, Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd., 31, pag. 165 (1900), furono preparate le base esoniche, separando l'arginina dalla lisina e dall'istidina. L'arginina, così ottenuta in forma di carbonato, veniva purificata trasformandola prima in picrato, trasformando poi il picrato in solfato, il solfato, nuovamente in carbonato, il quale così si otteneva chimicamente puro allo stato cristallino; esso veniva allora utilizzato nelle esperienze, avendolo prima sottoposto alle seguenti manipolazioni: La quantità di carbonato di arginina da adoperare veniva ogni volta sciolta in pochi centimetri cubi di acqua distillata; a questa si aggiungeva, in leggero eccesso, barite; si riscaldava per pochissimi istanti fino a 50° per facilitare la precipitazione del carbonato di bario; subito dopo, con acido solforico diluito, veniva precipitato l'eccesso di barite. Il precipitato di solfato di bario, così formatosi, veniva filtrato e più volte accuratamente lavato con acqua; il filtrato, acido per H₂SO₄, veniva neutralizzato esattamente alla carta di laccamuffa con NaOH: e la soluzione di solfato di arginina esattamente neutrale così, ottenuta, veniva diluita fino a un volume perfettamente noto (100 cm.). In dieci centimetri cubici della soluzione veniva fatta una determinazione di azoto col metodo di Kjeldahl e una determinazione dell'azoto aminico secondo il metodo di Sørensen; e in questo modo veniva calcolata la quantità di arginina contenuta in dieci centimetri cubi. Ogni ricerca veniva condotta nel modo seguente: dieci o più centimetri cubi di solfato di arginina, esattamente misurati, venivano mescolati, in un piccolo Erlenmeyer, con pochi centimetri cubici di estratto e di succo ottenuto con la pressa di Buchner, i quali erano anche perfettamente misurati; e, dopo aggiunta di circa cinque centimetri cubici di toluolo, venivano posti in stufa a 37° per un tempo determinato.

Come prova di controllo serviva l'identica quantità di estratto o di succo pressato, la quale veniva mescolata con dieci centimetri cubi d'acqua distillata; e, dopo aggiunta di cinque centimetri cubi di toluolo, contemporaneamente veniva posta a digerire in stufa. Dopo un certo tempo, le due prove venivano portate via dalla stufa, liberate dal toluolo mediante filtrazione, e il filtro veniva accuratamente lavato con una quantità possibil-

1ª Serie di ricerche. — I risultati ottenuti nella prima serie di ricerche, in cui ho ricercato l'arginasi nel fegato delle diverse classi di vertebrati, sinteticamente si possono così riassumere:

1) *Mammiferi*. — Tra i mammiferi sono stati oggetto di esperienza il cane, il bue, il maiale, e la cavia. Nell'estratto di fegato dei mammiferi, l'arginasi, ricercata mediante il metodo titrimetrico, si mostrò sempre presente. La sua azione era intensa, poichè la quantità di arginina scomposta non andò mai al disotto del 50 %, e raggiunse una media oscillante tra il 70 e l'80 %.

2) *Uccelli*. — Tra gli uccelli sono stati oggetto di esperienza il *Gallus domesticus*, la *Columba livia*, la *Turtur turtur*, la *Fringuilla cloris*. Negli estratti di fegato degli uccelli, l'arginasi, ricercata col metodo titrimetrico, in nessun caso si mostrò presente.

Lo stesso risultato si ottenne anche quando la reazione del mezzo fu artificialmente resa alcalina.

3) *Rettili*. — Tra i rettili furono oggetto di esperienza, nell'ordine dei Sauri, la *Lacerta agilis* e l'*Anguis fragilis*; nell'ordine degli Ofidii la *Coronella austriaca*; nell'ordine dei Cheloni, l'*Emis europae*.

Negli estratti di fegato dei sauri e degli ofidii, l'arginasi, ricercata col metodo titrimetrico, fu trovata sempre assente. Solo negli estratti di fegato dei Cheloni, l'arginasi fu trovata presente. Questi stessi risultati si ottennero anche quando l'azione del fermento si svolse a temperatura dell'ambiente.

4) *Anfibi*. — Tra gli anfibi sono state oggetto di esperienza la *Rana aesculenta* e la *Rana temporaria*.

Negli estratti di fegato di rana, l'arginasi, ricercata col metodo titrimetrico, fu trovata sempre presente.

Il per cento dell'arginina scomposta era approssimativamente uguale a quello dell'arginina scomposta per azione del fegato dei mammiferi. Per prolungata azione di alcool concentrato, l'arginasi del fegato di rana viene danneggiata nell'intensità della sua azione.

5) *Pesci*. — Tra i teleostei furono oggetto di esperienza il *Barbus fluviatilis*, la *Perca fluviatilis*, l'*Abramis brama*; e tra i selacei, la *Torpedo ocellata* e la *Raia clavata*.

mente piccola di acqua distillata. Le soluzioni così ottenute, quasi sempre leggermente colorate, venivano esattamente neutralizzate, nel caso in cui non lo erano, alla carta di laccamuffa e di azolitmina; solo quando queste operazioni erano finite, si procedeva alla titolazione al formolo, la quale veniva proseguita fino al colore rosso-vivo della fenolftaleina (terzo stadio di Sørensen). La soluzione di controllo era rappresentata da una quantità di acqua distillata, precedentemente bollita, uguale al volume della soluzione che si analizzava. La titolazione delle soluzioni cui era aggiunto il formolo, veniva eseguita con idrato di sodio $\frac{n}{5}$.

Negli estratti di fegato di pesce, l'arginasi, ricercata col metodo titrimetrico, fu trovata presente, sia nei selacei, sia nei teleostei.

Nelle ricerche su accennate fu adoperato sempre estratto acquoso di fegato, e fu utilizzato sempre il metodo titrimetrico. Per stabilire con assoluta sicurezza la mancanza dell'arginasi nel fegato degli uccelli, fu eseguita una esperienza in cui fu adoperato succo, ottenuto con la pressa di Buchner da fegato di gallina e l'arginasi fu ricercata col metodo titrimetrico. In un'altra esperienza fu adoperato succo ottenuto con la pressa di Buchner da fegato di gallina, e l'azione dell'arginasi venne ricercata seguendo il metodo di Kossel e Dakin. Sia nella prima, sia nella seconda esperienza, si ottennero risultati concordanti, si trovò cioè assente l'arginasi.

2ª Serie di ricerche. — I risultati ottenuti nella seconda serie di ricerche eseguite negli altri organi delle diverse classi di vertebrati, si possono sinteticamente così riassumere:

1) *Mammiferi.* — Negli estratti acquosi di reni, mucosa intestinale e milza di vitello, cane e cavia, come pure negli estratti di placenta umana e nel siero di sangue di cane, l'arginasi, ricercata col metodo titrimetrico, si trovò sempre assente.

2) *Uccelli.* — Negli estratti acquosi di milza, mucosa intestinale e muscoli degli uccelli, l'arginasi, ricercata col metodo titrimetrico, fu trovata assente; invece, negli estratti acquosi di reni degli uccelli, in tutti i casi esaminati, l'arginasi fu trovata sempre presente, sebbene l'intensità della sua azione si mostrasse variabile nei diversi casi.

3) *Rettili.* — Negli estratti acquosi di reni e d'intestino dei rettili, l'arginasi, ricercata col metodo titrimetrico, si mostrò assente.

4) *Anfibi.* — Negli estratti acquosi di ovari di testicoli, di reni, di muscoli di rana, l'arginasi fu trovata sempre assente.

5) *Pesci.* — Negli estratti acquosi di muscoli ed ovari e reni dei teleostei l'arginasi fu trovata assente.

Come si vede, fra gli estratti degli organi esaminati nelle diverse classi di vertebrati (non considerando il fegato), solo negli estratti dei reni degli uccelli fu riscontrata la presenza dell'arginasi. Poichè da Kossel e Dakin, nel succo, ricavato con la pressa di Buchner dai reni dei mammiferi, fu riscontrata la presenza dell'arginasi, io ho creduto necessario di eseguire come controllo le due seguenti esperienze:

In una prima esperienza, alquanto succo, preparato con la pressa di Buchner dai reni di vitello, fu posto ad agire sul solfato di arginina; e col metodo titrimetrico fu ricercata l'arginasi. Questa fu trovata presente: ma l'intensità della sua azione era molto bassa. In un'altra esperienza, una certa quantità di estratto di reni di vitello fu fatta agire sopra carbonato di arginina, e l'arginasi fu ricercata col metodo di Kossel e Dakin. L'arginasi fu trovata assente.

Le conclusioni a cui mi conducono le mie ricerche sono le seguenti:

1) I risultati che nella ricerca dell'arginasi si ottengono mediante l'uso del mio metodo titrimetrico applicando la titolazione al formolo coincidono, nelle linee fondamentali, con i risultati che si ottengono mediante l'uso del metodo della precipitazione al nitrato d'argento di Kossel e Dakin.

2) Nella serie dei vertebrati, l'arginasi è presente nel fegato dei mammiferi, degli anfibi e dei pesci; manca nel fegato degli uccelli e della maggior parte dei rettili.

3) L'arginasi è presente anche nei reni dei mammiferi. Però, mentre l'arginasi epatica si riscontra sia negli estratti acquosi sia nel succo ricavato con la pressa di Buchner, l'arginasi dei reni dei mammiferi non si può ricavare con la semplice estrazione acquosa.

4) Ugualmente l'arginasi si mostra assente, ricercata col metodo titrimetrico, negli estratti acquosi della milza, mucosa intestinale, muscoli dei mammiferi, come pure negli estratti acquosi degli stessi organi degli uccelli, anfibi, rettili e pesci.

5) I reni degli uccelli rappresentano l'unica eccezione di fronte ai reni e ad altri organi (fegato escluso) dei rimanenti vertebrati, poichè, analogamente all'arginasi del fegato dei mammiferi, anfibi e pesci, l'arginasi dei reni degli uccelli è presente anche negli estratti acquosi degli organi medesimi.

Di questi fatti, due meritano speciale considerazione, poichè sono in evidente rapporto colla funzione dell'arginasi nell'organismo:

1) *La mancanza dell'arginasi nel fegato di quei soli vertebrati, presso i quali il fegato elabora acido urico al posto dell'urea (cioè a dire uccelli e rettili); e la presenza di essa in tutti i rimanenti vertebrati, presso i quali il fegato elabora urea (cioè a dire mammiferi, anfibi e pesci).*

2) *La presenza dell'arginasi nei reni dei mammiferi, ma la impossibilità di ottenerla colla semplice estrazione acquosa del tessuto renale anche delle altre classi dei vertebrati, con l'unica eccezione rappresentata dai reni degli uccelli, nel cui estratto acquoso l'arginasi è presente.*

A questi due fatti singolari, che si riscontrano nello studio della distribuzione dell'arginasi nelle diverse classi dei vertebrati, fanno riscontro due importantissime anomalie del ricambio catabolico dell'azoto. Infatti, nel fegato di quei soli vertebrati (uccelli e maggioranza dei rettili) in cui, al posto dell'urea viene elaborato acido urico, l'arginasi è assente; questo fatto rappresenta la dimostrazione di natura biologica, che finora ci mancava, della partecipazione effettiva dell'arginasi, nel fegato dei mammiferi (anfibi e pesci), alla elaborazione dell'urea. La presenza, d'altra parte, dell'arginasi nei reni degli uccelli (in condizioni diverse che nei reni dei mammiferi),

contemporanea alla assenza di essa nel fegato dei medesimi, ci illumina sul *determinismo fisiologico della formazione dell'acido orniturico*, che, come risulta dalle ricerche di Jaffè (1) tra i prodotti catabolici dell'urina di questi vertebrati occupa il posto dell'acido ippurico; infatti, l'ornitina necessaria alla formazione dell'acido orniturico non si può originare che dalla scissione idrolitica della molecola dell'arginina: la scissione idrolitica dell'arginina per opera dell'arginasi avviene nell'organismo dei mammiferi principalmente nel fegato, dove l'ornitina formatasi subisce subito la desaminazione (2), e in minima parte nei reni; negli uccelli, invece, la scissione idrolitica dell'arginina, non potendo avere luogo nel fegato (dove l'arginasi manca) deve evidentemente avvenire, in principal luogo, nei reni; qui l'ornitina formatasi, viene subito legata dall'acido benzoico che si trova eventualmente presente, e apparisce nell'urina in forma di dibenzoilornitina o acido orniturico.

Io credo che noi ci troviamo di fronte a dei fatti di natura biologica, che finora erano sconosciuti, i quali tendono a dimostrare indirettamente che questo fermento partecipa attivamente all'intimo meccanismo dei fenomeni del ricambio catabolico dell'azoto dell'organismo animale, e lo fanno perciò assurgere tra i fermenti dell'organismo, a un posto di importanza fisiologica di prim'ordine.

Ecologia vegetale. — Di uno speciale tipo di isolatore per evitare la fecondazione incrociata nelle barbabietole madri. Nota di O. MUNERATI, presentata dal Socio R. PIROTTA.

Mentre mi riserbo, con i miei colleghi dottori G. Mezzadrolì e T. V. Zapparoli, e con la scorta dell'abbondante materiale di osservazione raccolto alla R. Stazione Sperimentale di bieticoltura, di esaminare il problema — di una sostanziale importanza dal punto di vista della selezione — se per la barbabietola da zucchero il principio della selezione individuale (3)

(1) Jaffè, Berichte der deutsche Chemische Gesellschaft, 10, 1925 (1877); 11, 401 (1878).

(2) Tompson, Journal of physiology, voll. 32, 137 (1905); 33, 106 (1906).

(3) Dalla grandissima maggioranza degli sperimentatori e dei selezionatori, l'autofecondazione nella barbabietola è considerata come causa di degenerazione del tipo.

Confrontisi: bibliografia (scarsa e frammentaria), fino al 1907, in comunicazione di Andrlík, Bartos e Urban, *Der Einfluss der Fremd- und Selbstbeurichtung auf den Zuckergehalt der Nachkommen der Zuckerrübe*. Zeitschrift für Zuckerindustrie in Böhmen, XXXII Jahrgang, 1907-1908, pag. 373. Da segnalarsi inoltre: Laurent E., *Recherches sur la descendance des betteraves à sucre extrêmement riches*, Journal des Sociétés Agricoles du Brabant et du Hainaut, 1902, 42, pag. 887; Andrlík, Bartos e Urban, *Der Einfluss der Selbstbefruchtung auf die Degenerierung der Zuckerrübe*, Zeit. f. Zuck. in