

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA NAZIONALE
DEI LINCEI

ANNO CCCXX

1923

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXXII.

2° SEMESTRE.



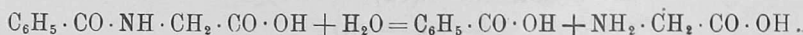
ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1923

Chimica fisiologica. — *Sulla idrolisi fermentativa dell'acido ippurico* ⁽¹⁾. Nota di A. CLEMENTI, presentata dal Socio Corrispondente S. BAGLIONI ⁽²⁾.

Schmiedeberg e Minkowski nel 1881-83 ammisero l'esistenza nell'organismo di un enzima, che denominarono *istozima*, avente l'attitudine di idrolizzare l'acido ippurico secondo la seguente equazione:



Tali ricerche furono eseguite in un'epoca in cui la tecnica per le indagini sugli enzimi era piena di lacune; da quell'epoca ad oggi non sono state eseguite in proposito altre indagini tranne quelle di Mutch (1910) (che impiegò per lo studio della scissione dell'acido ippurico un metodo colorimetrico fondato su una reazione colorata di natura non definita, avente luogo tra acido benzoico e ipobromito di sodio).

La presenza nei reni di un enzima, che opera la scissione idrolitica dell'acido ippurico, sta apparentemente in contrasto col processo fisiologico della sintesi di questo composto, che ha luogo normalmente in tali organi; io ho perciò sottoposto con un nuovo procedimento a più rigorosa analisi sperimentale il problema della esistenza dell'istozima di Schmiedeberg.

Il procedimento, che ho usato per lo studio dell'idrolisi fermentativa dell'acido ippurico (che rispetto a quelli finora descritti, ha il vantaggio della maggiore esattezza e della maggiore rapidità), consiste nel dosaggio dell'azoto aminico della glicocola, che si mette in libertà dalla molecola dell'acido ippurico in seguito alla sua idrolisi; per tale dosaggio ho applicato la titolazione al formolo prima e dopo l'azione dell'organo (poltiglia, estratto, succo) sull'acido ippurico, fondandomi sul fatto, che l'acido ippurico come tale non reagisce al formolo, mentre si comporta alla titolazione al formolo come un acido monobasico, dopo la sua scissione in acido benzoico e in glicocola.

Nelle nostre esperienze alla soluzione di ippurato di sodio (o di calcio) $\frac{1}{10}$ normale e alla poltiglia d'organo (rene, fegato) era aggiunto un eccesso di toluolo; in alcune esperienze si adoperò poltiglia d'organo sottoposta previamente a ebollizione, in altre si procedette al prelevamento asettico del rene e asetticamente sotto controllo batteriologico si fece decorrere l'esperienza. I risultati ottenuti sono raccolti nella seguente tabella:

⁽¹⁾ Lavoro eseguito nell'Istituto di fisiologia della R. Università di Roma.

⁽²⁾ Pervenuta all'Accademia il 16 agosto 1923.

ORGANO (Poltiglia: sospensione in soluzione fisiologica 10% toluolo)	Permanenza in termostato a 37°-40° C.	Quantità di Na OH $\frac{1}{10}$ n. impiegata per la titolazione al formolo			Idrolisi dell'acido ippurico
		della poltiglia d'organo	della poltiglia d'organo + cc 10 d'ippurato di Na 1/10 n.	dell'azoto aminico corrispondente alla glicocolla liberata	
		cc	cc	cc	
Rene (Maiale N. 1) 10	8	6.5	16.0	9.5	+++
Rene (" " 1) 10		6.5	16.0	9.5	+++
Rene (Maiale N. 2) 5	3	4.4	12.4	8.0	+++
Rene (" " 2) 5	3	3.3	12.3	9.0	+++
Rene (Maiale N. 1) (bollito) 10	8	3.5	3.6	0.1	---
Rene (" " 2) (bollito) 5	3	2.2	2.2	0.0	---
Fegato (Maiale N. 1) 5	5	3.5	13.0	9.5	+++
Fegato (" " 1) 5	5	3.5	13.0	9.5	+++
Fegato (Maiale N. 1) 5	1	1.8	3.8	2.0	+-
Fegato (" " 1) (bollito) 5	5	1.6	1.7	0.1	---
Rene (Cane N. 1) 4	7	2.2	2.3	0.1	--
Rene (" " 1) 10	3	4.0	5.5	1.5	+-
Rene (Cane N. 2) 10	5	5.0	8.0	3.0	+
Rene (" " 2) 15	7	11.0	18.5	7.5	+++
Rene (Cane N. 3) (bollito) 10	7	2.7	2.8	0.1	---
Fegato (Cane N. 1) 5	7	1.6	2.4	0.8	-
Fegato (" " 1) 10	7	4.8	2.8	2.8	+-
Fegato (Cane N. 2) 10	5	8.4	8.3	0.0	---
Fegato (" " 2) 10	7	10.0	10.0	0.0	---
Rene (Ratto albino) 5	9	4.2	7.5	3.3	++
Rene (Cavia N. 1) 2	9	0.5	8.0	7.5	+++
Fegato (" " 1) 2	9	0.5	0.5	0.0	--
Rene (Cavia N. 2) 5	5	3.5	12.5	9.0	+++
Rene (" " 2) 5	5	3.5	13.0	9.5	+++
Fegato (Cavia N. 2) 10	5	12.0	12.5	0.5	-
Fegato (" " 2) 10	5	12.0	13.0	1.0	-+
Precipitato alcoolico-acetonico da estratto acquoso di fegato di Maiale. gr. 0,05	4	0.3	2.0	1.7	+
Succo pancreatico di Cane (da fistola permanente del dutto pancreatico) 2	8	0.8	0.8	0.0	---
Succo enterico di Cane (da ausa alla Vella) 2	8	0.9	1.0	0.1	---
Rene (Cane N. 3) 20	7	4.5	8.5	4.0	++
Rene (" " 3) 20	7	4.8	8.3	3.5	++

(Rene prelevato asetticamente; la indagine batteriologica nei campioni prima dei dosaggi conferma la loro sterilità).

Dalle nostre esperienze, dunque, risulta, che la scissione idrolitica dell'acido ippurico in acido benzoico e in glicocolle: 1°) può essere operata dai tessuti animali in vitro; 2°) si può dimostrare, e se ne può dosare l'intensità, praticando mediante la titolazione al formolo il dosaggio dell'azoto aminico della glicocolle liberata dall'acido ippurico; 3°) ha luogo in presenza della poltiglia di rene di maiale, di cane, di ratto albino, di cavia e di fegato di maiale con aggiunta di toluolo, mentre manca o è dubbia in presenza di poltiglia di fegato di cane e di fegato di cavia; 4°) viene operata anche dal precipitato alcoolico dell'estratto acquoso del rene di maiale, mentre non viene operata dalla poltiglia di rene o di fegato di maiale, quando questa è stata sottoposta a prolungata ebollizione; 5°) si compie anche per azione della poltiglia di rene di cane prelevato asepticamente e che è rimasta sterile.

Questi risultati rappresentano una nuova e rigida *dimostrazione sperimentale dell'esistenza nell'organismo di un enzima, che idrolizza l'acido ippurico* e della sua presenza nel rene dei mammiferi in genere e nel fegato di maiale; per escludere con certezza la sua presenza nel fegato degli altri mammiferi appaiono necessarie ulteriori ricerche. Questo fermento (ippuricasi) sebbene abbia un'attività amidolitica analoga a quella della erepsina e della tripsina, *rappresenta un individuo biochimico distinto* da questi ultimi, non solo perchè nè il succo pancreatico, nè il succo enterico idrolizzano l'acido ippurico, ma anche perchè la poltiglia di fegato di alcuni mammiferi (fegato di cavia) pure essendo ricca di fermenti peptidolitici non idrolizza l'acido ippurico.

La presenza dell'ippuricasi nei reni (e per alcuni mammiferi anche nel fegato) non sembra in contraddizione con la funzione fisiologica della sintesi dell'acido ippurico, che normalmente viene compiuta da tali organi, ove si ammetta, che la scissione idrolitica dell'acido ippurico, che in vitro si attua per opera dell'ippuricasi, rappresenta il processo inverso a quello, che lo stesso enzima, conformemente al principio della reversibilità delle reazioni enzimatiche, compie nel protoplasma della cellula renale vivente grazie all'esistenza di meccanismi, i quali fanno decorrere la reazione in una direzione determinata.