
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SANDRA CARINI, ENRICA GALLI

La riduzione biologica del colestenone

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.5, p. 720-728.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_5_720_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Enzimologia. — *La riduzione biologica del colestenone* (*). Nota di SANDRA CARINI ed ENRICA GALLI, presentata (**) dal Corrisp. C. ARNAUDI.

È da tempo stabilito che la riduzione biologica del colesterolo conduce alla formazione di coprosterolo (5β -colestan-3- β -olo), il derivato saturo normalmente rinvenuto nel contenuto intestinale e nelle feci di mammiferi ed ottenuto anche *in vitro* per riduzione batterica dello sterolo insaturo sopra detto.

In laboratorio il coprosterolo non può essere ottenuto direttamente per via chimica dal colesterolo, e due metodi sono stati usati per la sua sintesi: il primo consiste nella idrogenazione catalitica dell'allocolesterolo (colest-4-en-3- β -olo) con formazione di una miscela di coprosterolo e colestanololo (5α -colestan-3- β -olo) [1]. Il secondo metodo [2] permette di ottenere coprosterolo puro formando due composti intermedi e consiste in una prima ossidazione del colesterolo a colestenone, il cheto derivato con doppio legame in posizione 4-5; in seguito comporta una parziale riduzione a coprostanone; questo composto viene infine ulteriormente ridotto a coprosterolo.

Sorgeva così l'ipotesi che nell'organismo animale il colesterolo venisse ridotto per una delle due vie sopra indicate per ottenere chimicamente il coprosterolo e cioè passando o attraverso l'allocolesterolo o attraverso il colestenone ed il coprostanone come prodotti intermedi. La prima possibilità venne scartata perché non si era mai potuto trovare allocolesterolo anche in tracce nell'organismo animale [3]. In quanto alla seconda venne appoggiata da Schoenheimer e coll. [4] che dimostrarono come il colestenone o il coprostanone somministrati a cani o uomini con la dieta portino ad una maggior escrezione di colesterolo, se uniti a diete prevalentemente di carboidrati, o di coprosterolo, se la dieta è in gran parte proteica. Inoltre, sempre secondo i sopra citati Autori, somministrando coprostanone marcato con deuterio il coprosterolo escreto risultò contenere deuterio; questo provò inequivocabilmente che il coprostanone *in vivo* poteva essere trasformato in coprosterolo anche se il deuterio ritrovato nel coprosterolo risultò essere una piccola quantità rispetto alla dose somministrata. Gli Autori avanzarono l'ipotesi, certamente molto probabile, che lo sterolo marcato e non ritrovato negli escreti fosse stato in parte assorbito o diversamente metabolizzato.

L'ipotesi di Schoenheimer fu accettata anche da Rosenheim e Webster [5-6]; gli Autori appoggiarono l'ipotesi che anche nell'organismo la formazione

(*) Lavoro eseguito presso il Centro di Studio per le Trasformazioni Microbiche di Idrocarburi, Steroidi e derivati, del Consiglio Nazionale delle Ricerche, aggregato all'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Milano.

(**) Nella seduta del 12 maggio 1962.

di coprosterolo segua la stessa via che viene usata in laboratorio e comprenda così una prima ossidazione del colesterolo a colesteno seguita da una riduzione a coprostanone. Il colesteno può essere riconvertito a colesterolo essendo questo un processo biologicamente reversibile, ed è un composto trovato, anche se in piccole quantità, nei tessuti [7-8-9-10] e nelle feci assieme ad altri chetoni [11]. I succitati Autori non riuscirono però in esperimenti *in vitro* ad ottenere coprosterolo da colesterolo e colesteno.

Fra i prodotti supposti intermedi in questa trasformazione biochimica si era fino ad allora isolato dalle feci il solo colestano ma non il coprostanone. Solo qualche anno più tardi anche il coprostanone è stato separato da feci umane [12] per cromatografia su allumina della frazione insaponificabile.

In appoggio all'ipotesi in istudio oltre alla possibilità di ottenere biologicamente coprosterolo da colesteno e coprostanone, e di isolare questi composti dalle feci, alcuni Autori e tra gli altri anche Rosenheim e Webster (loc. cit.) osservarono che la parziale o totale idrogenazione del colesteno e l'ossidazione della sua catena laterale portano a numerose sostanze che è noto hanno un ruolo importante nel metabolismo animale.

In seguito Anchel e Schoenheimer [13] videro la possibilità che l'aumento nell'escrezione di colesterolo in seguito alla dieta con colesteno e carboidrati possa non derivare dal colesteno somministrato ma da un effetto secondario sul metabolismo degli steroli, essendo noto che squalene o varie altre sostanze date con l'alimentazione aumentano l'escrezione di colesterolo; ed infatti quando i sopra citati Autori alimentarono topi con deuterocolesteno non ebbero dati sicuri sulla formazione di colesterolo da colesteno: dalle feci riuscirono ad isolare solo insignificanti quantità di colesterolo con deuterio.

Russel e coll. [14] ripeterono l'esperimento di Schoenheimer [4] usando anziché il colesteno, il 4-deidrotigogenone (I), una sostanza che ha la struttura del nucleo steroidico del colesteno, ma la catena laterale caratteristica delle sapogenine. Dalla frazione insaponificabile delle feci isolarono i composti della figura 2 e cioè diosgenina (II), smilagenina (III) e epismilagenina (IV) corrispondenti rispettivamente a colesterolo, coprosterolo, ed epicoprosterolo. Gli Autori ritennero di venire in appoggio con questa loro esperienza alla teoria di Schoenheimer, che il colesteno sia un intermedio nella formazione del coprosterolo nell'organismo.

Rosenfeld e collaboratori [15] in prove *in vivo* ed *in vitro* con colesterolo-3 *d*, 4-C¹⁴ oltre a dare una dimostrazione della conversione biologica del colesterolo in coprosterolo, dai dati ottenuti sperimentalmente poterono arguire che il coprosterolo è prodotto dal colesterolo principalmente per un processo che non coinvolge il gruppo idrossilico in C₃, ma per diretta saturazione del doppio legame C₅-C₆ del colesterolo, per cui è molto improbabile, secondo detti Autori, che tale trasformazione segua la via indicata nella fig. 1, passando attraverso i derivati chetonici. Se questo avvenisse, il deuterio in C₃ verrebbe perso nella formazione del colesteno ed il rapporto che gli Autori studiano fra deuterio e C¹⁴ nel colesterolo di partenza e nel coprosterolo di

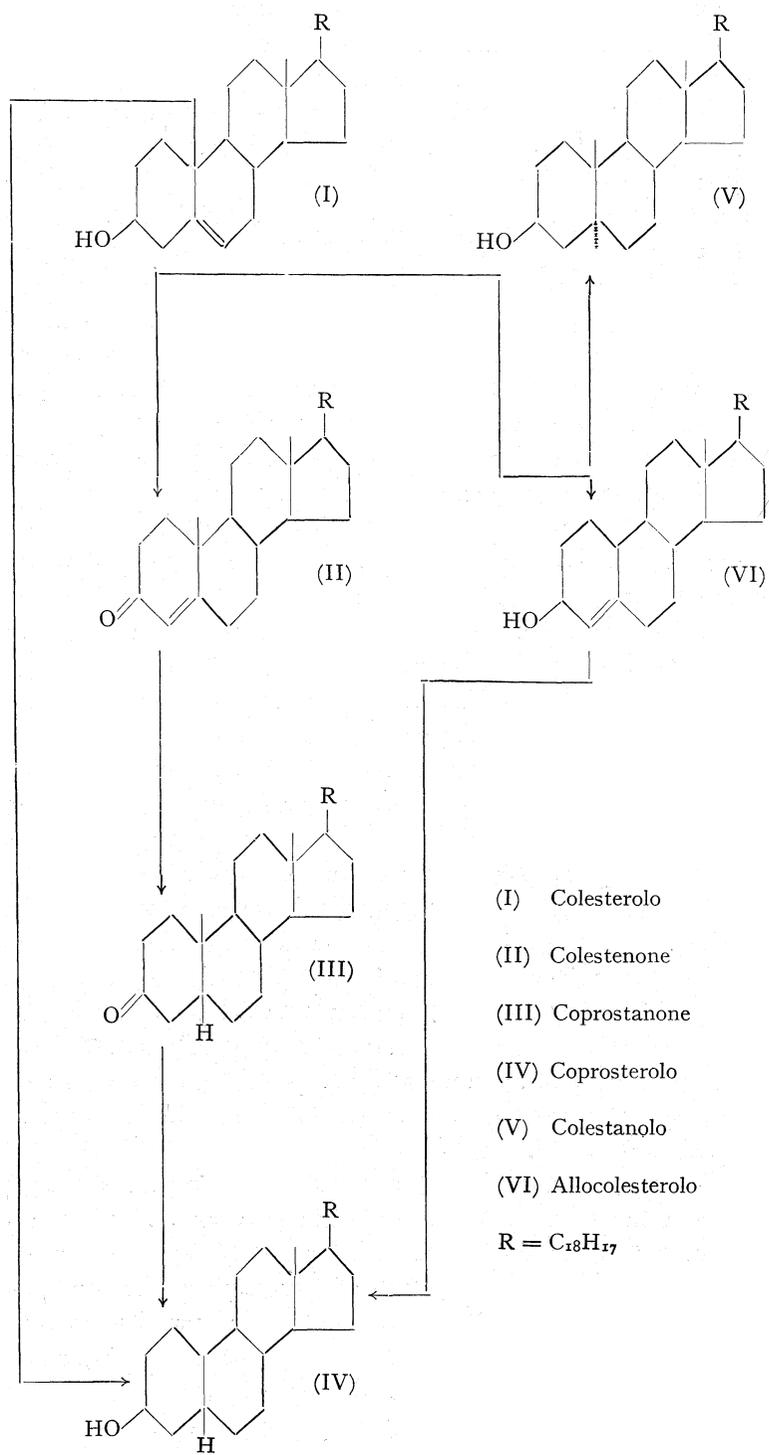


Fig. 1.

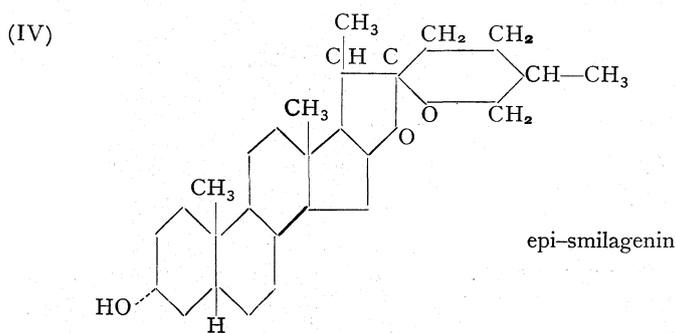
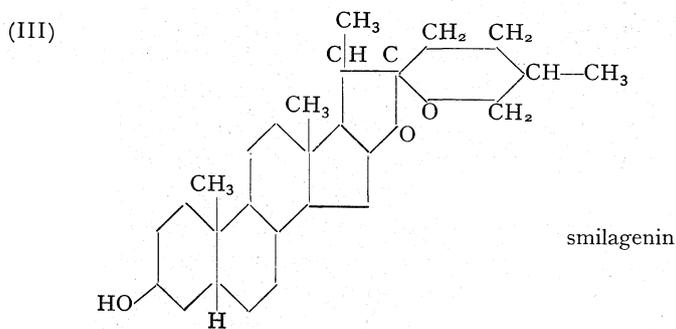
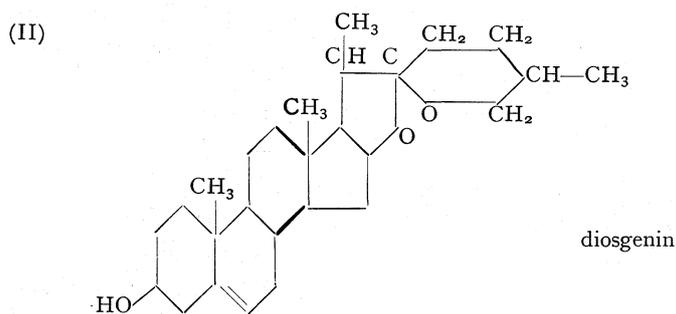
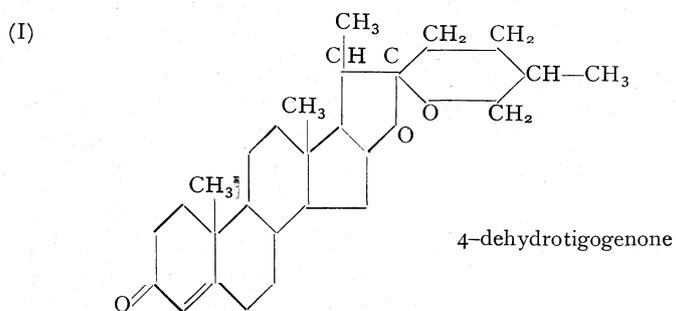


Fig. 2.

Il cervello utilizzato per la preparazione dei terreni colturali fu cervello di bue liofilizzato. Per il terreno colturale 2 il cervello liofilizzato fu estratto fino ad esaurimento, dapprima con acetone, quindi con etere etilico. Si considerò privo di steroli quando l'ultima frazione estratta con etere non contenne più sostanze precipitabili con digitonina.

Gli steroli aggiunti ai terreni colturali furono: colesterolo del commercio purificato, per eliminare le eventuali tracce di steroli saturi presenti, secondo il metodo di Schoenheimer [16]. Il colesténone fu ottenuto da colesterolo per via biologica.

I terreni colturali furono sterilizzati per tindalizzazione: gli steroli vennero aggiunti, prima dell'ultima sterilizzazione, sciolti in 1 cc di alcool etilico a caldo nella quantità di 50 mg per coltura.

Per ogni coltura si usarono cc 50 di terreno colturale, che dopo la semina e l'aggiunta di cloridrato di cisteina all'1 ‰, si incubarono a 37° C in condizioni di anaerobiosi.

Estrazione e identificazione degli steroli delle colture. — I liquidi colturali dopo incubazione vennero saponificati con KOH al 60 ‰ (20 cc per coltura) in un bagnomaria per 10 ore; indi estratti in imbuto separatore con etere etilico. Dopo evaporazione dell'etere, gli steroli totali così ottenuti vennero saggiati per cromatografia su strato sottile secondo Stahl [17] (fase mobile: cloroformio; rivelatore: H₂SO₄) per l'identificazione dei β-idrossi-steroli; e su carta Watmann n. 1 (fase mobile: metanolo; rivelatore: 2,4-dinitro-fenilidrazina) per l'identificazione dei derivati chetonici.

Per la separazione ed identificazione del coprosterolo si usarono metodi già da noi indicati in altro lavoro [18].

Semina ed incubazione. — Si seminarono i brodi colturali con una miscela di batteri fecali che da tempo si è dimostrata atta a ridurre *in vitro* la molecola del colesterolo a coprosterolo. Le colture vennero incubate a 37° C in apparecchio per anaerobi e per il tempo indicato dalla Tabella I.

RISULTATI SPERIMENTALI.

In una prima serie di esperienze (Tabella I) incubando colesterolo nelle adatte condizioni sperimentali si volle stabilire se nelle colture ove si formi coprosterolo si abbia anche presenza di colesténone o di altro chetone identificabile con coprostanone, che potrebbero essere considerati prodotti intermedi nella trasformazione del colesterolo a coprosterolo.

Incubando colesténone, nelle medesime condizioni sperimentali, si cercò di stabilire se la medesima flora che agisce *in vitro* riducendo il colesterolo a coprosterolo è anche atta a trasformare il colesténone a coprosterolo.

TABELLA I.

Riduzione del colestenone e colesterolo a coprosterolo.

	Terreno colturale	Sterolo aggiunto	Tempo di incubazione	Colestenone cromatografia	Coprosterolo	
					cromatografia	mg
1	terreno cervello 2	colesterolo	5 giorni	—	+	
2	» » 2	colestenone	5 giorni	+	+	
3	» » 2	colestenone	2 giorni	tracce	+	13,4
4	» » 2	»	4 giorni	—	+	25,3
5	» » 2	»	6 giorni	—	+	40,1
6	» » 1	—	1 giorno	—	+	
7	» » 1	—	2 giorni	—	+	
8	» » 1	—	3 giorni	—	+	
9	» » 1	—	5 giorni	—	+	
10	» » 1	—	10 ore	—	+	11,3
11						
12						
13	» » 1	—	24 ore	—	+	15,5
14						
15						
16	» » 1	—	36 ore	—	+	28,0
17						
18						
19	» » 1	—	48 ore	—	+	64,2
20						
21						
22	» » 1	—	8 giorni	—	+	40,3
23						
24						

In una seconda serie di prove si ripeté l'esperienza sopra descritta, in tre ripetizioni per ognuna, allo scopo di riunire gli estratti e poter meglio identificare i derivati chetonici eventualmente formati anche in tracce nella trasformazione.

Si ridussero anche i tempi di incubazione in modo di seguire nelle prime ore di fermentazione gli eventuali nuovi steroli che si venivano formando. La riduzione in istudio è una trasformazione che avviene con relativa lentezza per cui non si è creduto opportuno di ridurre eccessivamente il tempo fra un controllo ed il successivo. L'accumulo di coprosterolo ci ha chiaramente indicato che i tempi da noi fissati erano esatti.

Riduzione del colestenone a coprosterolo. - Nelle prove *in vitro* riportate e riassunte nella tabella I si può osservare che il colestenone è stato metabolizzato (Tabella I, nn. 2-3-4-5); dopo 5 giorni di incubazione, nelle condizioni

sopra descritte, il colestenone era presente in piccolissime quantità, mentre la maggior parte di esso era recuperabile come coprosterolo (Tabella I, n. 2). Dalle cromatografie eseguite su strato sottile si poterono individuare tracce di un composto con Rf e colore uguali al colesterolo di controllo.

Anche nelle prove nn. 3-4-5 il colestenone è stato completamente metabolizzato; si è qui avuta una rapidissima trasformazione dello sterolo che dopo 2 giorni di incubazione era presente solo in tracce, per non essere più evidenziabile già al 4° e 6° giorno. Quando si valutò quantitativamente il coprosterolo derivante dal colestenone, si poté osservare che, mentre il coprosterolo andava aumentando lentamente col passare dei giorni di incubazione, il colestenone scompariva subito nei primissimi giorni.

Riduzione del colesterolo a coprosterolo. - Incubando la miscela di batteri di origine fecale, di cui sopra, in terreno cervello 1, si ottiene la riduzione del colesterolo a coprosterolo, ma in nessun caso, come si vede dalla Tabella I (nn. 6-24), pur aumentando il liquido colturale estratto e variando i tempi di incubazione, si riuscì in cromatografia su carta o su strato sottile secondo Stahl, a mettere in evidenza tracce benché minime di colestenone, dopo separazione, dall'estratto steroidico totale, della frazione dei β -idrossisteroli per precipitazione con digitonina.

Anche il colesterolo cristallino aggiunto al terreno colturale 2 (Tabella I, n. 1) fu metabolizzato ed in gran parte ridotto a coprosterolo senza poter rintracciare chetoni nei liquidi colturali.

Concludendo, nelle nostre ricerche abbiamo cercato di dimostrare che il colestenone non compare neppure in tracce nelle nostre colture *in vitro* e cioè in ambiente ben diverso dall'intestino animale su cui si erano svolte le prove dei precedenti Autori e dove avvengono numerosissime altre trasformazioni.

I nostri dati sperimentali suggeriscono che vi sono prodotti intermedi nella trasformazione del colestenone a coprosterolo; infatti, mentre il coprosterolo aumenta gradatamente col passare del tempo di incubazione, il colestenone scompare nei primi giorni di fermentazione, ed il colesterolo è rilevabile in cromatografia solo in tracce. Sembrerebbe perciò che il colesterolo sia veramente una tappa nella trasformazione del colestenone a coprosterolo, ma che sussistano altri intermedi, ancora non identificati.

RIASSUNTO.

Dalle esperienze di fermentazione *in vitro* del colestenone e del colesterolo si può stabilire quanto segue:

1° il colestenone può essere ridotto *in vitro* a coprosterolo da una miscela di batteri di origine fecale, che riduce *in vitro* anche il colesterolo a coprosterolo;

2° il colestenone non è tuttavia rintracciabile in nessuna delle colture *in vitro* ove il colesterolo viene ridotto a coprosterolo; perciò si ritiene che detto cheto-sterolo non sia prodotto intermedio nella trasformazione del colesterolo a coprosterolo; pur essendo esso presente nelle feci e nel contenuto intestinale è da ritenere che derivi da altre trasformazioni biologiche;

3° nella riduzione del colestenone a coprosterolo compaiono tracce di un composto che in cromatografia presenta Rf e colore del colesterolo. Dai dati sperimentali si può fare l'ipotesi che oltre al colesterolo si formino altri intermedi ancora non identificati nel corso della idrogenazione del colestenone a coprosterolo.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. WINDAUS, «Ann. Chem.», 453, 101 (1927).
- [2] H. GRASSHOF, «Z. physiol. Chem.», 223, 250 (1934); L. RUZICKA, H. BRUENGGER, E. EICHENBERGER, e J. MEYER, «Helv. chim. acta», 17, 1407 (1934).
- [3] R. SCHONHEIMER, H. DAM e K. VON GOTTBURG, «J. Biol. Chem.», 110, 659 (1935).
- [4] R. SCHOENHEIMER, D. RITTENBERG e M. GRAFF, «J. Biol. Chem.», 111, 183 (1935).
- [5] O. ROSENHEIM e T. A. WEBSTER, «Biochem. J.», 37, 513 (1943).
- [6] O. ROSENHEIM e T. A. WEBSTER, «Biochem. J.», 37, 580 (1943).
- [7] I. H. PAGE e W. MENSCHICK, «Naturwissenschaften», 18, 585 (1930).
- [8] W. MENSCHICK, I. H. PAGE e K. BOSSERT, «Ann. Chem.», 495, 225 (1932).
- [9] V. PRELOG, E. TAGMAN, S. LIEBERMAN e L. RUZICKA, «Helv. chim. Acta», 30, 1080 (1947).
- [10] R. SCHOENHEIMER, «Z. physiol. Chem.», 211, 65 (1932).
- [11] D. M. ROBERTSON, «Biochem. J.», 61, 681 (1955).
- [12] R. S. ROSENFELD, D. K. FUKUSHIMA, HELLMAN LEON e T. F. GALLAGHER, «J. Biol. Chem.», 211, 301 (1954).
- [13] M. ANCHEL e R. SCHOENHEIMER, «J. Biol. Chem.», 125, 23 (1938).
- [14] E. RUSSEL MARKER, E. L. WITTBECKER, R. B. WAGNER e D. L. TURNER, «J. Am. Chem. Soc.», 64, 818 (1942).
- [15] R. S. ROSENFELD, D. K. FUKUSHIMA, HELLMAN LEON e T. F. GALLAGHER, «J. Biol. Chem.», 211, 301 (1954).
- [16] R. SCHOENHEIMER, «Z. physiol. Chem.», 192, 86 (1930).
- [17] E. STAHL (Mitteilung II) «Chemischer Zeitung», 82, 323 (1958).
- [18] C. ARNAUDI, S. CARINI, «La ricerca scientifica», 29, 2111 (1959).