
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ARNALDO CORBELLINI, GIUSEPPE LUGARO, IOLE LUPI

Isolamento del fattore antisecretorìo ed antiulceroso gastrico di origine urinaria allo stato puro

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.6, p. 886–889.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_6_886_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/>

Chimica Biologica. — *Isolamento del fattore antisecretorio ed antiulceroso gastrico di origine urinaria allo stato puro* ^(*). Nota di ARNALDO CORBELLINI, GIUSEPPE LUGARO e IOLE LUPI ^(**), presentata dal Socio A. QUILICO.

In precedenti lavori (Corbellini, Lugaro e Lupi ⁽¹⁾) abbiamo descritto la parziale purificazione dell'Urogastrone, fattore urinario ad attività antisecretoria ed antiulcerosa gastrica, per mezzo dell'elettroforesi (elettrocromatografia secondo Svensson ⁽²⁾) e della cromatografia su colonna d'amido. Come prodotto di partenza si è usato un preparato commerciale, dotato di attività antiulcerosa pari a circa 3000 Unità Ratto Shay (U.R.S.)/gr ed antisecretoria gastrica (130 μ gr per 100 gr di peso corporeo inibiscono del 50% la secrezione gastrica nel ratto adulto maschio, digiuno da 48 ore, nelle due ore successive alla somministrazione endovenosa ed alla legatura pilorica) pari a 7700 Unità Antisecretorie (U.A.S.)/gr.

Con questi metodi elettroforetici e cromatografici l'Urogastrone grezzo può essere frazionato in almeno tre componenti, due di natura peptidica (frazioni A₂ e A₁ nell'elettrocromatografia, riunite nella frazione A nella cromatografia su amido) ed una di natura non proteica (frazione B), non evidenziabile per colorazione nell'elettroforesi su carta, su agar-gel e su amido-gel e neppure nell'elettroforesi libera di *Tiselius*. Tale frazione è caratterizzata da alto contenuto in azoto (circa 30%), basso peso molecolare ed elevato assorbimento nell'U.V. ($\lambda_{\max}$ = 290 e 235 m μ).

Continuando queste ricerche abbiamo studiato il frazionamento dell'Urogastrone mediante gel filtrazione su *Sephadex*. Le numerose esperienze condotte in questo senso (Corbellini, Lugaro e Lupi ⁽³⁾), mediante l'uso di diversi tipi di *Sephadex*, hanno dimostrato che mentre è relativamente facile separare la frazione B non proteica, ritardata notevolmente per il suo basso peso molecolare, le maggiori difficoltà si incontrano nella realizzazione di una buona separazione tra le frazioni A₂ e A₁.

Con l'uso di *Sephadex* G-25 e G-50 nelle diverse caratteristiche (*Fine* e *Coarse*, normale e « *bead form* »), operando in tamponi (glicocollo-idrato sodico secondo *Sørensen*, pH = 9,66 a 20°C, 0,1 e 0,01 M; tampone fosfati primario e secondario secondo *Sørensen*, pH = 7,1 a 20°C, 0,1 e 0,01 M) ed in acqua, pur variando le condizioni sperimentali (dimensioni della colonna,

(*) Istituto di Chimica Organica ed Analitica della Facoltà di Agraria - Università di Milano.

(**) Nella seduta del 17 giugno 1965.

(1) A. CORBELLINI, G. LUGARO, I. LUPI, « *Giorn. Biochim.* », 13, 95 e 120 (1964).

(2) H. SVENSSON, « *I.V.A.* », 25, 252 (1954).

(3) A. CORBELLINI, G. LUGARO, I. LUPI, « *Giorn. Biochim.* », 14, 109 (1965).

concentrazione salina, flusso di eluizione), le due frazioni A₂ e A₁ risultano più o meno sovrapposte oppure la A₁ largamente distribuita. Soltanto con G-25 *Medium* normale in soluzione acquosa (colonna di 24 diametri, 2,5 × 60 (h) cm, flusso di eluizione pari a 30-40 ml/ora) (*) si sono realizzate le condizioni ottimali per frazionare l'Urogastrone nei seguenti componenti, elencati in ordine decrescente di eluizione: A₂, A₁, B₁, B e B₂. Si deve notare che le frazioni pigmentate B₁ e B₂ (la B₁ presenta lo stesso spettro di assorbimento in U.V. caratteristico della frazione A₁ con $\lambda_{\max} = 256 \text{ m}\mu$) si evidenziano soltanto operando in acqua ma non in tampone.

A meno di possibili azioni di ritardo dovute a cause diverse dalla semplice gel filtrazione, la grandezza molecolare delle varie frazioni così separate dovrebbe decrescere nell'ordine indicato. La frazione A₂, ottenuta nelle migliori condizioni di frazionamento, ha un tenore in azoto (13 %) che è inferiore a quello dell'Urogastrone di partenza (16,2 %) e che corrisponde ad un contenuto proteico medio dell'81 %. Essa (Corbellini, Lugaro, Lupi⁽⁴⁾) ha le caratteristiche di un glicopeptide (reazione di *Schiff* positiva) ed il suo contenuto in zolfo (1,8 %) supera quello dell'Urogastrone di partenza (1,2 %); a questo aumento, come vedremo in seguito, corrisponde un incremento delle attività antisecretoria ed antiulcerosa. In soluzione acquosa essa presenta un assorbimento massimo a $\lambda = 277 \text{ m}\mu$.

Si tratta tuttavia di una sostanza non completamente omogenea, come risulta dalla elettroforesi su agar (tampone glicocollo-idrato sodico pH = 9,66, $\mu = 0,4$; tampone potassio cloruro-carbonato sodico-acido borico secondo *Atkins e Pantin*, pH = 10, $\mu = 0,4$) e dalla elettroforesi libera secondo *Tiselius* (tampone glicocollo-idrato sodico, pH = 10,14 a 0°C, $\mu = 0,2$ e 0,1; tampone Veronal sodico secondo *Michaelis*, pH = 8,9 a 0°C, $\mu = 0,1$); l'impurezza presente è caratterizzata da una maggior mobilità anodica che meglio si manifesta ad elevata forza ionica, mentre non si evidenzia anche a pH = 10,14 ma a forza ionica = 0,05. Tale impurezza è molto probabilmente costituita dalla frazione A₁.

Lo studio delle attività antisecretoria ed antiulcerosa di queste frazioni ottenute mediante gel filtrazione dell'Urogastrone non è ancora completo a causa delle esigue quantità delle frazioni A₁, B₁ e B₂ finora ottenute; queste due ultime risultano difficilmente separabili dalla frazione B.

La frazione A₂ (si tratta in realtà di A₂ impura probabilmente di A₁) è quella alla quale va attribuita in massima parte l'attività biologica dell'Uro-

(*) L'eluizione della colonna è regolata mediante una pompa « *Miniflow 4501* » della LKB; l'eluato passa attraverso un analizzatore continuo nell'U.V., tipo « *Uviscan II* » della *Buchler* (registratore lin/log tipo « *Varicord* » della *Photovolt*, con velocità della carta pari a 3 pollici/ora), e su un sistema di misurazione continua della concentrazione salina (elettrodo sensibile ai cationi metallici, « *Cationic Electrodes 39046* » della *Beckman*, collegato ad un registratore « *Recorder DB* » della *Beckman*, velocità della carta pari a 3 pollici/ora). Il « *Void Volume* » della colonna è determinato con blu di destrano (*Pharmacia, Uppsala*) di P.M. = 2.000.000.

(4) A. CORBELLINI, G. LUGARO, I. LUPI, « *Giorn. Biochim.* », 13, 95 (1964).

gastrone. Nell'attuale stato di purezza e con l'approssimazione dei metodi di dosaggio impiegati (Lugaro, Lupi, Corbellini ⁽⁵⁾) l'A₂ presenta un'attività antiulcerosa (4750 U.R.S./gr) superiore del 58% rispetto a quella dell'Urogastrone grezzo di partenza (3000 U.R.S./gr) ed un'attività antisecretoria (10500 U.A.S./gr) superiore del 38% rispetto a quella dello stesso Urogastrone (7700 U.A.S./gr).

Tenendo conto delle quantità delle singole frazioni e delle attività di quelle che è stato possibile analizzare, con un computo puramente orientativo, dovuto anche alla relativa precisione dei metodi di dosaggio biologico

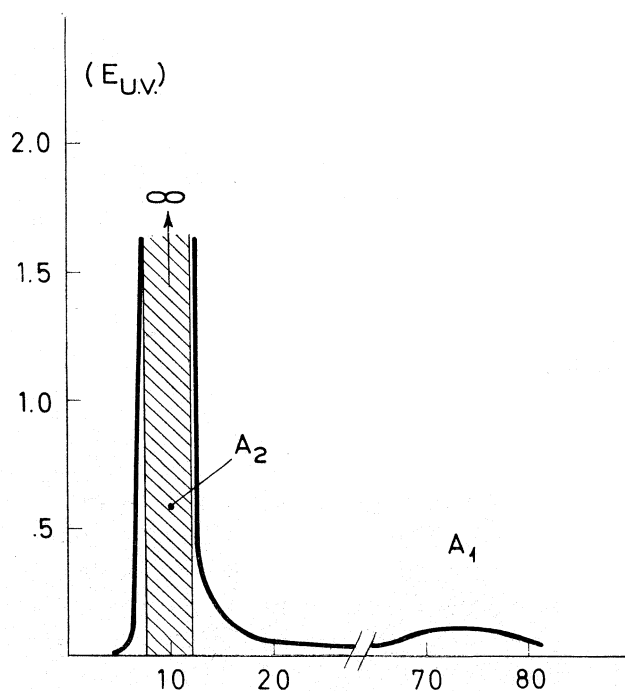


Fig. 1. - Gel filtrazione della frazione A₂ in acido formico 1 M su colonna di Sephadex G-100 (2 × 80 (h) cm).

Eluizione in porzioni di 2 ml ogni 4 minuti. Per la valutazione dell'attività gonadotropica è stata saggiata la porzione tratteggiata del primo picco. In ascisse, il numero delle frazioni raccolte.

usati, risulta che nella frazione A₂ si ritrova circa l'87% dell'attività antiulcerosa dell'Urogastrone grezzo di partenza e circa il 75% della corrispondente attività antisecretoria.

Fondandosi sull'ipotesi che l'impurezza ancora presente nella frazione A₂ fosse costituita da un residuo della frazione A₁, si è pensato di separare i due componenti mediante elettroforesi preparativa, sfruttando cioè la maggiore mobilità anodica della frazione A₁ rispetto a quella della A₂.

(5) G. LUGARO, I. LUPI, A. CORBELLINI, « Giorn. Biochim. », 14, 125 (1965).

Così, dopo i risultati negativi constatati nei tentativi di frazionamento mediante elettroforesi continua su carta a cortina verticale (*Spinco-Beckman*, mod. CPF-2) si è sottoposta la frazione A_2 ad elettroforesi preparativa su colonna d'amido; operando in opportune condizioni (tampone glicocollo-idrato sodico, pH = 9,66, μ = 0,1, 500 Volt per 6 ore; tampone fosfati mono- e bi-sodico, pH = 7,1, μ = 0,1, 500 Volt per 9 ore; colonna di 7,2 cm² × 36 (h) cm) si riesce a realizzare una evidente separazione di una frazione più mobile avente le caratteristiche uguali a quelle della A_1 . La nuova frazione A_2 così ottenuta, desalificata su *Sephadex G-25 Medium* (colonna di 2,5 × 40 (h) cm) ed esaminata elettroforeticamente secondo *Tiselius*, evidenzia però ancora la presenza di una impurezza di tipo A_1 .

Una completa separazione di questa impurezza è stata infine realizzata trattando la frazione A_2 ottenuta mediante gel-filtrazione con acido formico secondo le seguenti modalità: 75 mgr di questa frazione si sciolgono a temperatura ordinaria in 2 ml di acido formico 1 M e la soluzione viene cromatografata su colonna di *Sephadex G-100* avente le dimensioni 2 × 80 (h) cm (40 diametri), equilibrata con acido formico 1 M ed alla velocità di 30 ml/ora. Seguendo l'eluizione si constata una netta separazione in due frazioni (fig. 1); dal primo picco si ottiene per liofilizzazione la frazione denominata Ug G-100, dal secondo una frazione che risulta avere le stesse caratteristiche della A_1 .

La frazione Ug G-100 si dimostra omogenea sia nell'elettroforesi su agar, sia nell'elettroforesi secondo *Tiselius*. La sua attività antiulcerosa è dell'ordine delle 14.000 U.R.S./gr, e quella antisecretoria è intorno a 31.000 U.A.S./gr, cioè tali attività sono circa tre volte superiori a quelle della frazione A_2 ottenuta per gel filtrazione.

Studiando la eventuale attività gonadotropica della frazione Ug G-100 si è constatato che, con i tests condotti sul ratto maschio e femmina impuberi, tale attività non è evidenziabile. Con tests molto più sensibili (deplezione colesterolica ed ascorbica dell'ovaio) si evidenzia una traccia di attività LH (ICSH), inferiore a 0,01 unità per mgr. (per confronto con NIH-LH-S5-Ovino^(*)). Non è dimostrabile un'attività di tipo FSH.

Pertanto l'attività gonadotropa osservata da diversi Autori su campioni di Urogastrone grezzi o non completamente purificati è da attribuirsi alla presenza di gonadotropina corionica contenuta insieme all'Urogastrone nell'urina di donna gravida.

I risultati sperimentali qui riportati dimostrano che la frazione Ug G-100 rappresenta l'ormone proteico puro ad azione antiulcerosa ed antisecretoria presente nell'urina di donna gravida.

È in corso lo studio chimico di questo ormone.

(*) Ricevuto dalla "Endocrinology Study Section" - National Institutes of Health, Washington, D.C. U.S.A., e preparato da tessuto ipofisario di pecora.