



PONTIFICIA
ACADEMIA
SCIENTIARVM

A C T A

Vol. XVI - n. 5

pag. 37-48

SULLA CONSERVABILITÀ DELLE AMINOACIDOSSIDASI ED AMINOSSIDASI DELLA CORTECCIA RENALE (*)

(Con due grafici)

MARCELLO GHIRON

SUMMARIVM — Auctor ex suis ipsius inquisitionibus concludit posse renalis corticis aminoacidoxidasim et aminoxidasim servari, si talis ratio adhibeatur qua et proteicae enzymorum moleculae a qualibet mutatione sint immunes, et enzima in aliquo medio teneatur quod enzymaticam actionem impediat (quod impedimentum iam cessabit, pH medii alisque condicionibus mutatis).

I primi studi sistematici e chiaramente dimostrativi dell'esistenza, della funzione e delle caratteristiche delle aminoacidossidasi sono del KREBS nel 1932-1933 (1-2). Usando il sensibile micrometodo di WARBURG, il KREBS infatti, in una serie di esperimenti, è riuscito ad ottenere un'ossidazione della maggior parte degli aminoacidi da parte di fettine fresche di rene, con formazione di ammoniaca e del rispettivo chetoacido. In queste ricerche il KREBS ha voluto inoltre indagare se gli enzimi ossidanti potessero agire al di fuori della cellula, cioè quando la complessa struttura cellulare sia distrutta, chimicamente o meccanicamente. Una preparazione di tale genere ottenuta dal rene fresco, si rivelò notevolmente attiva in vitro, si poteva quindi affermare che l'azione enzimatica cellulare era conservata almeno per quanto concerne i più comuni aminoacidi mono-amino-mono-carbossilici.

Tale preparazione il Krebs ottenne dopo macinazione finissima del tessuto renale ed estrazione con una soluzione tampone a pH 7,4. Previa centrifu-

(*) Nota presentata dall'Accademico Pontificio S. E. Dante De Blasi il 4-III-1954.

gazione, si otteneva una preparazione la quale, eccettuato per quanto riguarda l'acido glutammico, aveva le stesse caratteristiche aminoacidossidanti delle fettine di rene. Caratteristica di tale preparazione era tuttavia l'estrema labilità nel tempo, sì che nel volgere di poche ore tale attività aminoacidossidante si riduceva a tracce praticamente trascurabili.

Ulteriori ricerche di KREBS e di altri AA. hanno confermato tali esperimenti, chiarendo sia il meccanismo di azione, sia le condizioni ottimali in cui tali enzimi agiscono (3-4-5-6-7) e la struttura molecolare enzimatica. Particolare menzione meritano i lavori di GREEN, BLANCHARD e coll. (4-5-6), i quali attraverso una serie di purificazioni dei preparati enzimatici della corteccia renale, sono riusciti ad isolare in forma molto pura i diversi enzimi aminoacidossidanti, definendo le caratteristiche dei gruppi prostetico e proteico di essi. In base a questi studi infatti si distinguono aminoacidossidasi della serie fisiologica *l*- e della serie *d*-. Queste ultime a loro volta si dividono in aminoacidossidasi aspecifiche con azione sulla maggior parte degli aminoacidi, ed in specifiche con azione su uno solo di essi, quale l'acido glutammico (8-9), la cisteina (10), la prolina e la ossiprolina (11), la fenilalanina e la tirosina (12-13-14), il triptofano, l'istidina. Si differenziano inoltre le aminoacidossidasi agenti sul gruppo aminico in posizione α , da quelle agenti sul gruppo aminico in posizione ω . Quelle ad azione aspecifica generale hanno un gruppo prostetico riboflavinico, mentre il gruppo prostetico dell'aminoacidossidasi dell'acido glutammico è il coenzima I^o.

Come nelle prime esperienze riferite dal Krebs, così in quelle successive fra le quali meritano particolare menzione le ultime, cioè le (4-5-6), si nota la estrema labilità di tali enzimi nelle preparazioni ottenute, sì che nel volgere di breve tempo scompare ogni attività ossidante. Inoltre si può rilevare la labilità di tali enzimi rispetto ai processi di purificazione. Rispetto alle preparazioni grezze, come ad es. le prime eseguite dal Krebs, si nota una lieve maggiore stabilità dopo purificazione: tuttavia le esperienze in tale senso debbono essere sempre eseguite con preparazioni recenti, se non addirittura estemporanee.

Ad analoghe considerazioni si prestano gli studi eseguiti da diversi AA. (15-16-17-18-19-20-21-22-23) sulle caratteristiche di altri enzimi ossidanti presenti nella corteccia renale, i quali hanno un'azione sulle amine. Infatti le aminossidasi, sia le monoaminossidasi che le diaminossidasi, se estratte dal

tessuto renale, sono labili, se pure meno delle aminoacidossidasi, e se in mezzo acquoso, perdono in breve tempo la loro attività. Solo in forma secca (polvere di organo seccata) è possibile mantenere attivi per pochi mesi tali enzimi, quale ad es. la istaminasi.

Si può perciò concludere che a tutt'oggi le ricerche tendenti a rendere stabili e quindi conservabili tali enzimi sono riuscite infruttuose, specie quelle riguardanti le aminoacidossidasi, mentre solo in parte sono coronate da successo quelle sulle aminossidasi.

Mi è sembrato meritevole intraprendere uno studio in tale campo, perchè è senza dubbio notevole l'importanza di estrarre e conservare attivi per lungo tempo tali enzimi ossidanti. La tecnica di estrazione e di conservazione si poteva prestare ad utili ricerche, capaci forse di far meglio conoscere le caratteristiche degli enzimi ossidanti del rene.

Lo studio dei metodi seguiti dagli altri AA. mi aveva convinto che gli enzimi appena estratti dai tessuti fossero dotati di una notevole ed immediata azione, la quale però rapidamente si esaurisse. Nelle prove del KREBS non vi era altro mezzo che una soluzione tampone a pH adatto, la quale ad altro non serviva che ad aumentare le condizioni di massima attività e quindi di più rapido esaurimento. Le fasi di purificazione indicate da GREEN e BLANCHARD (4-5), per l'allontanamento dal mezzo ambiente dei substrati provenienti dal tessuto, mettevano quindi gli enzimi in condizioni tali da non poter agire, ma tali da conservare la loro funzione specifica. E questo è in accordo con quanto affermato dal KREBS (3), che le preparazioni enzimatiche tanto più sono grezze e meno purificate, tanto meno mantengono la loro attività.

Ho pensato quindi di ricorrere ad una metodica che avesse come presupposti: 1) rapidità di estrazione; 2) conservazione degli enzimi estratti in un mezzo che, senza lederli, rendesse praticamente trascurabile la ossidazione spontanea enzimatica, la quale porta al loro esaurimento.

Ho risolto la prima questione ricorrendo non a mezzi chimici, ma a mezzi fisici, che rapidamente mi permettessero di rompere la struttura morfologica cellulare e quindi ottenere gli enzimi non alterati. Tali mezzi si sono rivelati la neve carbonica e l'ossigeno liquido, che per la bassa temperatura determinano un rapidissimo rigonfiamento cellulare con una conseguente rottura, senza alterare o denaturare la struttura delle molecole proteiche. Infatti la struttura cellulare del tessuto scompare all'esame microscopico dopo tratta-

mento di neve carbonica od ossigeno liquido. Ottenuto rapidamente questo effetto, sono passato immediatamente alla triturazione ed estrazione degli enzimi cellulari con una soluzione idroglicerica al 70% a pH 6,4. Con tale mezzo infatti si ottiene l'estrazione, mentre d'altro canto la glicerina esercita un'azione conservativa, forse per un rallentamento dell'attività dei processi enzimatici. Il pH è stato appositamente scelto in modo che da un lato evitasse la precipitazione delle proteine, e dall'altro, essendo lontano dal pH optimum, inibisse l'ossidazione spontanea. A questa fase di estrazione ho fatto seguire le fasi di purificazione che allontanassero dall'ambiente quelle molecole proteiche cui non era legata l'attività enzimatica. Per purificare ho eseguito filtrazioni ripetute con carbone animale, sostanza chimicamente neutra e dotata di alto potere adsorbente. La preparazione veniva ulteriormente purificata con caolino e mediante filtrazione su carta da filtro finemente porosa. Ottennevo così una preparazione limpida, la quale, anche se lasciata lungo tempo a temperatura ambiente, non perdeva tale caratteristica.

Con tale preparazione di rene (PR) ho quindi eseguito le prove sperimentali per stabilire:

- 1) se erano presenti le aminoacidossidasi e le aminossidasi;
- 2) se queste conservassero la loro attività a distanza di mesi dalla loro estrazione.

Ho impiegato come metodo di indagine di tale attività il micrometodo diretto di WARBURG (24),, studiando la quantità di ossigeno assorbito dalla PR sola, ed anche in presenza di aminoacidi ed amine, nonchè il suo variare con l'invecchiamento della PR. Per l'istaminasi ho impiegato anche il metodo di determinazione biologica, come verrà sotto specificato (25-26-27).

Riporto ora le tabelle delle esperienze riguardanti la ossidazione di l-alanina, l-tirosina, tiramina e istamina da parte della PR appena ottenuta. I dati riportati in ogni singola tabella rappresentano la media di quattro esperienze.

Per queste esperienze mi sono servito di manometri forniti di vaschette della capacità media di circa 20 cc. Esse sono costituite da una *cavità principale* nella quale era posta generalmente la soluzione fisiologica tamponata (con fosfato tampone a pH 7,4), contenente o meno l'aminoacido o l'amina a seconda della esperienza, come viene descritto nei protocolli. Al centro della vaschetta vi è una piccola cavità (pozzetto) separata dalla cavità principale

eccetto che in alto, nella quale ponevo l'alcali per assorbire l'anidride carbonica. La vaschetta è munita di un braccio laterale (appendice), nel quale ponevo generalmente la PR in modo da travasarla nella cavità principale solo quando era stato raggiunto nel bagno l'equilibrio di temperatura delle vaschette. Il kO_2 rappresenta la costante manometrica per l'ossigeno in ogni singola vaschetta. h rappresenta la differenza di pressione misurata, espressa in mm. di liquido di Brodie, corretta con i valori del termobarometro. XO_2 è il prodotto di $kO_2 \cdot h$ ed indica il consumo di ossigeno in mmc. Tutte le esperienze sono state eseguite alla T^o di 38^o. Le oscillazioni dei manometri erano di 72 m'.

TABELLA I

| | | | |
|-------------------|---------------------------------------|---|--|
| N. manometro | I | 7 | 4 |
| Cavità principale | 4 cc soluzione fisiologica pH 7,4 | 4 cc soluzione M/20 Tiramina pH 7,4 | 4 cc soluzione M/20 Tiramina pH 7,4 |
| Appendice | cc 0,9 PR | cc 0,9 PR | — |
| Gas ambiente | ossigeno | ossigeno | ossigeno |
| Pozzetto | cc 0,3 NaOH 20% | cc 0,3 NaOH 20% | cc 0,3 NaOH 20% |
| kO_2 | 1,39 | 1,43 | 1,60 |
| h dopo 60' | —9 | —31 | —2 |
| XO_2 (mmc) | —12,51 | —44,33 | —3,20 |
| N. manometro | 8 | 5 | 3 |
| Cavità principale | 4 cc soluzione M/20 putrescina pH 7,4 | 4 cc soluzione M/20 putrescina pH 7,4 | 3 cc soluz. fisiologica pH 7,4 + cc 1,5 PR |
| Appendice | cc 0,9 PR | — | 0,5 istamina (1 mg) |
| Gas ambiente | ossigeno | ossigeno | ossigeno |
| Pozzetto | cc 0,3 NaOH 20% | cc 0,3 NaOH 20% | cc 0,2 NaOH 20% |
| kO_2 | 1,78 | 1,40 | 1,44 |
| h dopo 60' | —54 | —3 | —18 |
| XO_2 (mmc) | —96,12 | —4,20 | —25,92 |
| N. manometro | 10 | 4 | 11 |
| Cavità principale | 4,5 cc soluzione fisiologica pH 7,4 | 4 cc soluzione satura l-tirosina pH 7,4 | 4,9 cc soluz. satura l-tirosina pH 7,4 |
| Appendice | 0,5 cc istam. (1 mg) | 0,9 cc PR | — |
| Gas ambiente | ossigeno | ossigeno | ossigeno |
| Pozzetto | 0,2 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% |
| kO_2 | 1,45 | 1,60 | 1,30 |
| h dopo 60' | —2 | —22 | —2 |
| XO_2 | —2,90 | —35,20 | —2,60 |
| N. manometro | 2 | I | |
| Cavità principale | 4 cc soluzione M/20 l-alanina pH 7,4 | 4,9 cc soluzione M/20 l-alanina pH 7,4 | |
| Appendice | cc 0,9 PR | — | |
| Gas ambiente | ossigeno | ossigeno | |
| Pozzetto | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% | |
| kO_2 | 1,43 | 1,39 | |
| h dopo 60' | —41 | —3 | |
| XO_2 (mmc) | —58,63 | —4,17 | |

Dopo un mese e mezzo da tale esperimento ho nuovamente saggiato l'attività della stessa PR sulla *l*-tirosina, sulla leucil-glicil-glicina, sulla tiramina e sulla putrescina.

Riporto le medie delle osservazioni eseguite nella tabella II^a.

TABELLA II

| N. manometro | 2 | 6 | 8 |
|------------------------|---|--|--|
| Cavità principale | cc 4 soluzione fisiologica pH 7,4 | cc 4 soluzione M/20 tiramina pH 7,4 | cc 4 soluzione M/20 putrescina pH 7,4 |
| Appendice | 0,9 cc PR | 0,9 cc PR | 0,9 cc PR |
| Gas ambiente | ossigeno | ossigeno | ossigeno |
| Pozzetto | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% |
| hO_2 | 1,43 | 1,37 | 1,78 |
| h dopo 60' | -17 | -36 | -27 |
| XO_2 (mmc) | -24,31 | -49,32 | -48,06 |
| N. manometro | 3 | 14 | 1 |
| Cavità principale | cc 4 soluzione saturata <i>l</i> -tirosina pH 7,4 | cc 4 soluzione M/20 leucilglicilglicina pH 7,4 | cc 4 soluzione M/20 leucilglicilglicina pH 7,4 |
| Appendice | 0,9 cc PR | 0,9 cc PR | — |
| Pozzetto | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% |
| Gas ambiente | ossigeno | ossigeno | ossigeno |
| hO_2 | 1,44 | 1,44 | 1,39 |
| h dopo 60' | -26 | -39 | -3 |
| XO_2 (mmc) | -37,44 | -56,16 | -4,17 |

Ad un anno di distanza ho con la medesima PR nuovamente esperimentato l'azione ossidante in vitro sulla *l*-tirosina, *d*-*l*-diossifenilalanina, *l*-alanina, acido *l*-glutammico, glicocola e istamina.

I dati relativi a tali esperimenti vengono riassunti nella tabella III^a.

TABELLA III

| N. manometro | 12 | 10 | 7 |
|------------------------|--|--|---|
| Cavità principale | cc 4 soluzione fisiologica pH 7,4 | cc 4 soluzione M/20 <i>l</i> -alanina pH 7,4 | cc 4 soluzione saturata <i>l</i> -tirosina pH 7,4 |
| Appendice | 0,9 cc PR | 0,9 cc PR | 0,9 cc PR |
| Gas ambiente | ossigeno | ossigeno | ossigeno |
| Pozzetto | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% |
| hO_2 | 1,49 | 1,45 | 1,43 |
| h dopo 60' | -13 | -36 | -22 |
| XO_2 (mmc) | -19,37 | -52,20 | -31,46 |
| N. manometro | 14 | 13 | 4 |
| Cavità principale | 4 cc soluzione M/20 <i>dl</i> -diossifenilalanina pH 7,4 | 4 cc soluzione M/20 <i>dl</i> -diossifenilalanina pH 7,4 | 4 cc soluzione M/20 glicocola pH 7,4 |
| Appendice | cc 0,9 PR | — | cc 0,9 PR |
| Gas ambiente | <i>aria</i> | <i>aria</i> | ossigeno |
| Pozzetto | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% |
| hO_2 | 1,44 | 1,45 | 1,60 |
| h dopo 60' | -20 | -1 | -15 |
| XO_2 (mmc) | -28,80 | -1,45 | -24 |

| N. manometro | 3 | 9 | 8 |
|-------------------|--|--|---|
| Cavità principale | 4,9 cc soluz. M/20 <i>glicocolla</i> pH 7,4 | 4 cc soluzione M/20 <i>ac. l-glutammico</i> pH 7,4 | 4,9 cc soluz. M/20 <i>ac. l-glutammico</i> pH 7,4 |
| Appendice | — | 0,9 cc PR | — |
| Gas ambiente | ossigeno | ossigeno | ossigeno |
| Pozzetto | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% | 0,3 cc NaOH 20% |
| hO_2 | 1,44 | 1,46 | 1,78 |
| h dopo 60' | —2 | —19 | —1 |
| XO_2 (mmc) | —2,88 | —27,74 | —1,78 |

| N. manometro | 2 |
|-------------------|--|
| Cavità principale | 3 cc soluzione fisiologica pH 7,4 + 1,5 PR |
| Appendice | cc 0,5 <i>istamina</i> (1 mg) |
| Gas ambiente | ossigeno |
| Pozzetto | cc 0,2 NaOH 20% |
| hO_2 | 1,43 |
| h dopo 60' | —16 |
| XO_2 (mmc) | —22,88 |

Per la presenza dell'istaminasi ho usato, oltre al metodo di Warburg, anche il metodo biologico, basato sull'azione contrattile dell'istamina sull'intestino di cavia.

METODO DI DETERMINAZIONE BIOLOGICA DELLA ISTAMINASI
(DIAMINO-OSSIDASI)

Ho preparato una soluzione idroglicerica tamponata a pH 7,8 (50% glicerina e 50% tampone fosfato M/5 a pH 7,8), tale che ogni cc della soluzione contenga mg. 0,2 di cloridrato di istamina. Da detta soluzione ho prelevato cc 5 per ogni prova e controllo, in maniera che in tutti vi sia mg. 1 di cloridrato di istamina.

Ho fatto le seguenti prove:

1) cc 5 soluzione di istamina + cc 5 di preparazione renale appena preparata;

2) cc 5 soluzione di istamina + cc 5 di preparazione renale conservata da un mese e mezzo.

Ho fatto i seguenti controlli:

3) cc 5 soluzione di istamina + cc 5 di preparazione renale inattivata in autoclave;

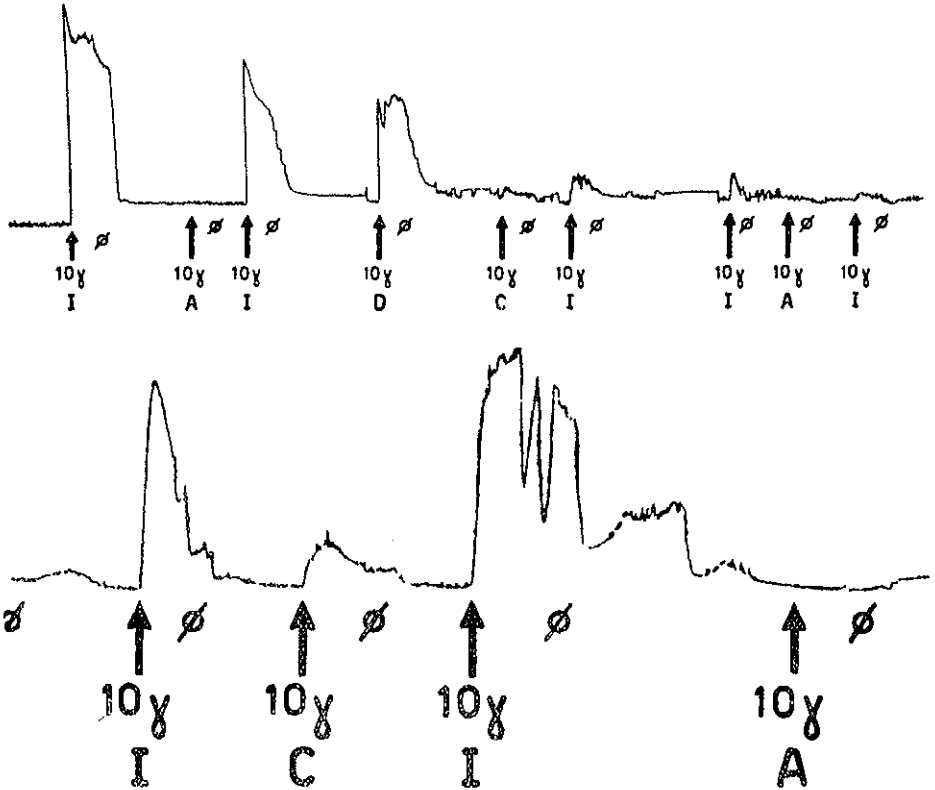
4) cc 5 soluzione di istamina + cc 5 di acqua distillata.

Ho messo le prove ed i controlli in termostato per 20 ore a 38°.

Successivamente ho portato il volume di ogni prova e controllo da cc 10 a cc 100 con acqua distillata, in maniera che ogni cc contenga 10 gamma di istamina cloridrato. Ho saggiato le prove ed i controlli sull'intestino isolato di cavia mantenuto in liquido di Webster.

ILLUSTRAZIONE DEI GRAFICI

Al segno I viene posto cc 1 del controllo n. 4 (10 gamma di istamina) nella vaschetta contenente l'intestino di cavia. Si determina contrazione dell'intestino. Al segno \emptyset si cambia il liquido di Webster nel quale è immerso l'intestino.



Al segno A viene posto cc 1 della prova n. 1 (10 gamma di istamina + preparazione renale fresca) nella vaschetta contenente l'intestino di cavia. *Non* si registra contrazione dell'intestino. Al segno \emptyset si cambia il liquido di Webster.

Al segno D viene posto cc 1 del controllo n. 3 (10 gamma di istamina + preparazione renale inattivata in autoclave) nella vaschetta contenente l'intestino di cavia. Si determina una intensa contrazione dell'intestino, paragonabile a quella determinata da sola istamina. Al segno \emptyset si cambia il liquido di Webster.

Al segno C viene posto cc 1 della prova n. 2 (10 gamma di istamina + preparazione renale ottenuta un mese e mezzo prima) nella vaschetta contenente l'intestino di cavia. Si registra solo una *lieve* contrazione dell'intestino.

Questi grafici dimostrano perciò che la PR se appena preparata è capace di inattivare del tutto l'istamina presente; se essa invece è conservata da un mese e mezzo lo è ancora in grande misura, seppure non nella sua totalità.

In tutte le prove eseguite gli esami batteriologici hanno dimostrato la sterilità della PR e quindi escluso ogni eventuale inquinamento batterico.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti, a mio avviso, dimostrano chiaramente:

1) Con la metodica da me impiegata è possibile ottenere dalla corteccia renale enzimi ad azione ossidante sia sugli aminoacidi che sulle amine. Tale azione scompare se la preparazione renale viene riscaldata (termolabilità), come è bene dimostrato nei grafici delle prove sull'istaminasi. Tale azione ossidante è massima nei primi 20-30 minuti di esperimento, e questo è in accordo con quanto è stato rilevato da altri ricercatori. L'attività ossidante della PR si è rivelata meno accentuata di quanto ad es. non abbia descritto KREBS nelle sue esperienze, pur essendo l'attività non molto inferiore, facendo i rapporti tra peso di tessuto e soluzione idroglicerica impiegati. Infatti il KREBS fa un rapporto tra tessuto e solvente pari a 20/100, mentre nelle mie PR il rapporto è pari a 10/100.

2) A distanza di un mese e mezzo l'attività ossidante su aminoacidi, su amine e su un tripeptide si conserva praticamente immutata. Da rilevare è un aumento dell'attività di ossidazione spontanea nella sola PR.

3) L'attività ossidante su diversi aminoacidi e su amine è notevole anche dopo un anno di conservazione della PR. Si rileva tuttavia una diminuzione dell'assorbimento dell'ossigeno, e soprattutto una diminuita rapidità dell'assorbimento di ossigeno, il quale raggiunge il suo massimo non dopo 20-30 minuti, ma dopo 60-70 minuti. Anche dopo un anno di conservazione la ossidazione spontanea della PR si mantiene eguale a quella conservata dopo un mese e mezzo.

4) Nella PR si trovano presenti: le aminoacidossidasi aspecifiche generali (ossidazione della *l*-alanina), la tirosinossidasi, le monoaminossidasi (ossidazione della tiramina) e le diaminossidasi (ossidazione dell'istamina e della putrescina) e una tripeptidossidasi. È assente invece praticamente l'aminoacidossidasi dell'acido *l*-glutammico. Manca ogni azione sulla glicocola.

BIBLIOGRAFIA

1. KREBS H. A., « Klin. Wochenschr. », 11, 1744 (1932).
2. KREBS H. A., « Z. Physiol. Chem. », 217, 191 (1933).
3. KREBS H. A., « Biochem. J. », 29, 1620 (1935).
4. BLANCHARD M., GREEN D. E., NOCITO V., RATNER S., « J. Biol. Chem. », 155, 421 (1944).
5. BLANCHARD M., GREEN D. E., NOCITO V., RATNER S., « J. Biol. Chem. », 161, 583 (1945).
6. ISELIN B., ZELLER E. A., « Helv. Chem. Acta », 29, 1508, 1973 (1946).
7. TOGGART J. V., KRAKAUR R. B., « J. Biol. Chem. », 177, 641 (1949).
8. ADLER E., DAS N. B., VON EULER H., GUENTHER G., « Zeit. Physiol. Chem. », 254, 61 (1938).
9. MEHLER A. H., KORNBERG A., GRISOLIA S., OCHOA S., « J. Biol. Chem. », 174, 961 (1948).
10. FROMAGEOT C., « Advances in Enzymol. », 7, 369 (1947).
11. WEIL-MALHERBE H., KREBS H. A., « Biochem. J. », 29, 2077 (1935).
12. BERNHEIM E., BERNHEIM M. L. C., « J. Biol. Chem. », 107, 275 (1934).
13. LANG K., WESTPHAL V., « Z. Physiol. Chem. », 276, 179 (1942).
14. TOSIC J., WALTON A., « Biochem. J. », 47, 199 (1950).
15. PUGH C. E. M., QUASTEL J. H., « Biochem. J. », 31, 286, 2306 (1937).
16. BLASCHKO H., RICHTER D., SCHLOSSMANN H., « Biochem. J. », 31, 2187 (1937).
17. HOLTZ P., HEISE R., SPREYER W., « Arch. exper. Path. Pharmacol. », 188, 580 (1938).
18. ZELZE E. A., « Helv. Chem. Acta », 21, 880, 1938, 24, 539 (1941), 21, 1645 (1938).
19. BERNHEIM M. L. C., « J. Biol. Chem. », 93, 299 (1931).
20. RICHTER D., « Biochem. J. », 31, 2022 (1937).
21. KOHN H. I., « Biochem. J. », 31, 1693 (1937).
22. ALLES G. A., HEEGAARD E. V., « J. Biol. Chem. », 147, 487 (1943).
23. LELOIR L. F., GREEN D. E., « Federation Proc. », 5, 144 (1946).
24. WARBURG O., *Ueber den Stoffwechsel der Tumoren*, Berlin, Springer.
25. BEST. C. H., MCHENRY E. W., « J. Physiol. », 70, 249 (1930).
26. DANFORTH D. N., « Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. », 40, 319 (1939).
27. CODE C. F., « J. Physiol. », 89, 257 (1937).