

L'eluizione non riesce con acetone nè con acidi diluiti. Una certa concentrazione del principio attivo si può anche ottenere per congelamento del filtrato colturale e disgelo frazionato. La prima frazione ottenuta per disgelo è diverse volte più attiva del liquido di partenza.

I migliori risultati sono però stati ottenuti mediante estrazione con forti volumi di etere a p_H 6-7.

1 volume di filtrato colturale viene estratto per 6 volte, ogni volta con volume di etere = a quello del filtrato etero.

Si procede poi alla concentrazione dell'estratto mediante distillazione a temperatura non superiore a 45° C — in tal modo si sono ottenuti campioni attivi a 1:10⁶ su tifo. Nella concentrazione si ottengono costantemente alla titolazione biologica attività lievemente superiori alle teoriche. Con le successive concentrazioni si ottiene una sostanza gommosa di color rosso mattone e delle frazioni gialle che aderiscono alla parete del recipiente. La purificazione si è ottenuta mediante cromatografia su adsorbenti vari, il più adatto di questi è l'idrossido Al lavato ed essicato. La cromatografia è effettuata sull'estratto etero opportunamente concentrato; il liquido, con colonne di altezza adatta, filtra incolore, o lievemente colorato in giallo, ed è completamente inattivo.

L'attività è localizzata negli ultimi strati incolori della colonna cromatografica, come si può direttamente constatare portando piccole frazioni essicate della polvere su piastre di agar germi.

L'eluizione della sostanza attiva può essere ottenuta con miscele di etere con il 2% di alcool metilico o etilico. Evaporando questi eluati in presenza di piccoli volumi di acqua si possono ottenere delle sospensioni incolori fortemente attive.

La sostanza attiva presente nei filtrati colturali viene distrutta per riscaldamento a 80° C per 30', i concentrati sospesi in acqua perdono il 50% dell'attività per riscaldamento a 100° C per 15'.

Mediante dialisi attraverso cellofan o pergamena parte della sostanza passa nel dialisato. Una lieve alcalinità è sufficiente a produrre la distruzione della sostanza che resiste invece agli acidi a freddo fino a p_H 1,5-2.

La conservazione dei filtrati colturali a 0° C è di circa 10 gg; gli estratti si conservano per un periodo maggiore; su carbone l'attività si conserva per un lungo periodo anche a temperatura ambiente.

Proprietà biologiche

L'antibiotico non è inattivato da brodo di carne, peptone, siero; è invece inattivato da lievi spostamenti del p_H verso l'alcalinità. Non è emolitico verso i globuli rossi di montone anche ad alte concentrazioni. È notevolmente tossico: dell'estratto grezzo bastano poche gocce iniettate per via parenterale nel topino bianco per provocare la morte istantanea con convulsioni, alterazioni del respiro e del ritmo cardiaco.

Estratti purificati mediante due cromatografie, sospesi in H₂O o in soluzione fisiologica attivi a 1:2000, provocano la morte entro le 24 h con emorragie ed edemi polmonari se iniettati parenteralmente, alla dose di 0,5 cm³.

L'azione dell'antibiotico sui germi del tifo è prevalentemente batteriostatica.

Spettro di attività, determinato mediante estratto cromatografato ad attività sul tifo 1/4000 determinato secondo il metodo delle diluizioni in brodo insemato con 0,1 cm³ di un'agar-cultura di 24 h sospesa in 10 cm³ di brodo.

+++ sta ad indicare inibizione completa dello sviluppo.

	1/2000	1/3000	1/4000
Coli	—	—	—
Paratifo A	—	—	—
Paratifo B	—	—	—
Tifo	+++	+++	+++
FLEXNER	—	—	—
Hiss	—	—	—
Carbunchio	+++	+++	++
Melitense	+++	+++	+++
Stafilo 114	—	—	—
Stafilo albo	—	—	—
Streptococco piogeno .	—	—	—
Meningococco	—	—	—

Siamo grati al Prof. BALDACCIO dell'Università di Pavia per gli studi compiuti nell'identificazione della muffa; al Prof. MAMOLI del nostro Laboratorio, per l'assistenza dataci nei saggi di estrazione.

A. DI MARCO

Laboratorio ricerche «Farmitalia», sezione biologica, Milano, il 25 settembre 1946.

Résumé

Les cultures d'un *Penicillium*, probablement identique à *P. expansum*, fournissent des filtrats dont l'action antibiotique sur le Bacille d'Eberth a été étudiée. La substance active, concentrée par extractions successives, a été purifiée par des procédés chromatographiques. Par ses propriétés, cette substance diffère des antibiotiques déjà connus: son action est remarquablement sélective et sa haute toxicité ne laisse pas espérer d'application thérapeutique.

Istamina «condizionatore positivo» dell'azione purgativa di alcuni drastici

È ormai acquisito come le «sostanze attive tessutali» (gruppo non omogeneo e comprensivo di sostanze, deputate in genere a espletare mansioni di «regolazioni locali») possano, in quanto insite in tutti i tessuti e proprie di tutti i tessuti, fungere da «mediatrici» e «condizionatrici», «positive» o «negative» (DI MATTEI¹), di fenomeni fisiologici, di fenomeni patologici e di fenomeni farmacologici che nei tessuti stessi abbiano luogo e possano anche essere, a loro volta, influenzate da agenti esterni di ogni genere, ma soprattutto da farmaci, nei loro processi, fisiologici e patologici, di liberazione e di inattivazione.

La più interessante, la più importante e la più studiata delle sostanze attive tessutali è senza dubbio l'istamina, identificata ormai ad opera di tutta una serie di indagini i cui risultati possono essere considerati definitivi come il «condizionatore positivo» dello choc anafilattico e peptonico, come il «condizionatore positivo» e il «mediatore» di parte o di tutte le azioni farmacologiche

¹ P. DI MATTEI, Romania medicala, 1 mai 1941.

spiegate sulla pelle da svariati revulsivi cutanei, sulle vie aeree da gas e vapori irritanti, sull'intestino dal sublimato corrosivo, sui muscoli striati dal curaro, sui muscoli lisci dalla tripsina e dall'estratto ipofisario, sul cuore dall'efedrina e dall'adrenalina, nonché delle azioni generali provocate dal benzolo, dalla tripsina, da sostanze piretogene, dal veleno dei serpenti ecc.

Già nel 1940 uno di noi (ERSPAMER¹) aveva avanzata l'ipotesi che anche nel meccanismo d'azione dei purganti drastici potesse avere una qualche parte la messa in libertà di istamina.

Che cos'è infatti e come agisce un purgante drastico? Purgante drastico è definito dal MAGNUS² «un purgante con azioni collaterali infiammatorie che, a forti dosi, provoca una violenta gastroenterite». Il drastico agisce su tutto l'intestino (ZUNZ)³ e purga sia attraverso un aumento della peristalsi, sia attraverso una stimolazione delle secrezioni. Il purgante drastico iperemizza sempre, sempre dà luogo a fenomeni di ipersecrezione e di ipercinesi; a forti dosi poi, o per contatto prolungato, le manifestazioni sconfinano nettamente nel patologico con enorme iperemia diffusa, secrezioni di liquido ematico, focolai emorragici, ulcerazioni ecc.

Possono essere questi fenomeni imputabili almeno in parte, almeno nella loro fase iniziale, a liberazione di istamina, la sostanza che per eccellenza dilata i vasi, incrementa la permeabilità capillare, stimola le secrezioni?

Per risolvere il quesito si offrivano varie vie: la più diretta sarebbe stata quella della titolazione dell'istamina nelle anse intestinali prima e dopo l'azione del drastico, analogamente a quanto ha fatto ad esempio il HAAS⁴ nello studio dei revulsivi cutanei.

Noi abbiamo scelto un altro metodo, più semplice, altrettanto attendibile e più fruttuoso di conclusioni: quello basato sull'impiego degli «antiistaminici», specialmente proficuo dopo che per merito del BOVET e coll.⁵ e del HALPERN⁶ noi attualmente disponiamo di prodotti forniti di relativamente scarsa tossicità e di altissima efficacia specifica «antiistaminica», tali da poter essere utilizzati nella diagnosi differenziale delle attività istaminiche da quelle dovute a altre sostanze attive tessutali.

Le nostre ricerche sono state condotte su 120 ratti di ambo i sessi, del peso di 70–200 g. I purganti finora presi in considerazione furono quattro, tutti forniti di energica azione sull'alvo del ratto, già ben nota in base a precedenti esperienze: elaterio bianco, coloquintide, olio di ricino e *Globularia Alypum*.

Elaterio bianco e coloquintide (frutti decorticati, privati dei semi, ridotti in polvere) vennero sospesi in acqua + gomma adragante 1%, della *Globularia* venne impiegato il decotto concentrato, l'olio di ricino venne opportunamente diluito con olio di oliva. La quantità di liquido somministrata con sonda fu, in tutti i casi, sempre la stessa: 0,5 cm³/100 g ratto.

Dopo 8–15 giorni di riposo le esperienze possono essere ripetute sugli stessi gruppi di animali. Si osserva però ben presto l'instaurarsi di cospicui fenomeni di

assuefazione, specialmente evidenti se le dosi purgative somministrate erano state elevate.

Come antiistaminico è stata usata esclusivamente la N-dimetilaminoetil-N-benzil-anilina o *dimetina* LEPETIT, corrispondente all'*antergan* francese.

Il preparato sciolto in acqua o, allo scopo di prolungarne l'azione, sospeso in olio, venne costantemente iniettato sottocute prima della somministrazione del purgante, a dosi di 0,5 cm³ di liquido per 100 g ratto. In vari casi le iniezioni furono ripetute.

Poi si seguì con attenzione il comportamento dell'alvo registrando il momento della comparsa eventuale della diarrea: feci in genere poltacee fluide o fluide con muco, più raramente, per evacuazioni tardive, semplicemente poltacee.

In esperienze preliminari venne stabilita, su gruppi di 6–10 animali, la dose minima attiva sull'alvo, la dose cioè capace di purgare almeno la metà degli animali in esame. Essa risultò di 0,05–0,1 cm³/100 g per l'olio di ricino, di 0,25 mg/100 g per l'elaterio, di 2,5 mg/100 g per la coloquintide e di 50 mg/100 g per la *Globularia*.

I risultati ottenuti nelle esperienze con l'antiistaminico sono riassunti nelle tabelle I–III.

Come appare dalle tabelle, l'antiistaminico influenza l'azione purgativa solo a dosi notevolmente elevate, in nessun caso inferiori a $\frac{1}{10}$ della dose letale (per la dimetina in soluzione acquosa = 100–150 mg/100 g ratto). Con 50 mg/100 g in acqua o 250 mg/100 g in olio talvolta si sono avuti tremori e in qualche singolo caso, con la sospensione oleosa, anche convulsioni generalizzate.

Poteva sorgere legittimamente il dubbio che la dimetina iniettata a forti dosi agisse non nella sua qualità di «antiistaminico» ma come farmaco dotato di una sua propria azione depressiva sul tono e sui movimenti intestinali.

È stata pertanto saggiata l'azione esplicata sull'alvo dall'antiistaminico da solo, raccogliendo e pesando di due in due ore le feci (fresche e dopo completa essiccazione in termostato) evacuate da due grossi gruppi di ratti (50 animali per gruppo) dei quali l'uno, tenuto come controllo, iniettato con soluzione fisiologica, l'altro iniettato con 50 mg/100 g di dimetina in soluzione acquosa.

Diciamo subito che i risultati in tal modo ottenuti non hanno permesso di apprezzare alcuna sicura differenza nel comportamento dell'alvo fra i due gruppi di animali, per quanto nel gruppo trattato con l'antiistaminico sia apparsa una certa maggior abbondanza nella massa delle feci evacuate nelle prime ore dopo l'iniezione e una maggiore scarsità nelle feci evacuate più tardi.

La dimetina ritarda dunque o sopprime l'azione purgativa dei più potenti drastici che abbiamo, anche quando essi vengano somministrati a dosi parecchie volte superiori a quella attiva, proprio in virtù delle sue proprietà «antiistaminiche».

Quando sia stata iniettata una sola dose, sia pure elevata, di dimetina in soluzione acquosa noi abbiamo quasi sempre solo un ritardo nell'azione purgativa. Ed è naturale che sia così. L'antiistaminico abbandona l'organismo o viene inattivato in un tempo assai minore di quello che non sia richiesto al purgante, convogliato inerte dal contenuto intestinale, per raggiungere il retto e l'esterno.

E cessata l'azione protettiva dell'antiistaminico, il purgante potrà evidentemente irritare ancora l'intestino nel punto in cui si trova e potrà così scatenare la consueta azione drastica.

¹ V. ERSAMER, Arch. ital. Sci. farmacol. 9bis, 35 (1942).

² R. MAGNUS, Drastische Abführmittel, in: Heffters Handbuch der exp. Pharmakologie, II. Bd., 2. Hälfte. J. Springer, Berlin 1934.

³ E. ZUNZ, Éléments de Pharmacodynamie spéciale. Masson, Paris 1932.

⁴ H. T. A. HAAS, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 197, 161 (1941) e 199, 637, 656 (1942).

⁵ D. BOVET et F. WALTHER, Annales pharm. franç. 2 (1944). — D. BOVET, R. HORCLOIS et J. FOURNEL, C. r. Soc. Biol., Paris 138, 99, 165 (1944).

⁶ B. N. HALPERN, Arch. int. Pharmacodyn. et Thér. 68, 339 (1942).

Tabella 1 (Elaterio)

Dose di elaterio	Dose di dimetina ¹ (in soluzione acquosa)	N. ^o animali	Risultati ²
1 mg/100 g	—	9	az. purgativa dopo 2 h 4'
2 mg/100 g	50 mg/100 g	3	az. purgativa dopo oltre 11 h
1 mg/100 g	50 mg/100 g	6	az. purgativa dopo 6 h 45'
1 mg/100 g	25 mg/100 g	6	az. purgativa dopo 3 h 24'
1 mg/100 g	25 mg/100 g		
	(dose ripetuta dopo 2 h 30')	3	az. purgativa dopo 5 h 3'
1 mg/100 g	20 mg/100 g		
	(ripetuta dopo 2 h 30' e 5 h)	3	az. purgativa dopo 5 h
1 mg/100 g	15 mg/100 g		
	(ripetuta ogni 90')	6	az. purgativa dopo 6 h 30'
1 mg/100 g	10 mg/100 g	3	az. purgativa dopo 2 h 20'
1 mg/100 g	10 mg/100 g	3	az. purgativa dopo 2 h 12'
	(ripetuta ogni 60')		
0,5 mg/100 g	—	9	az. purgativa dopo 2 h 45'
0,5 mg/100 g	50 mg/100 g	3	az. purgativa dopo 6 h 42'
0,5 mg/100 g	15 mg/100 g		
	(ripetuta ogni 90')	3	az. purgativa solo in 1 ratto dopo 3 h 20'
0,5 mg/100 g	10 mg/100 g	3	az. purgativa solo in due ratti dopo 2 h 7' e dopo 3 h 42'
	(ripetuta ogni 90')		

Tabella 2 (Coloquintide e Globularia)

Dose del purgante	Dose di dimetina ¹	N. ^o animali	Risultati ²
Coloquintide	—	5	az. purgativa dopo 2 h 27'
10 mg/100 g			
10 mg/100 g	50 mg/100 g in acqua	5	az. purgativa dopo 5 h 42'
Globularia	—	5	az. purgativa dopo 3 h 14'
250 mg/100 g			
250 mg/100 g	250 mg/100 g in olio	5	az. purgativa dopo 6 h in 4 ratti; nel 5° azione mancante

Tabella 3 (Olio di ricino)

Dose di olio di ricino	Dose di dimetina ¹	N. ^o animali	Risultati ²
0,5 cm ³ /100 g	—	12	az. purgativa dopo 56'
0,5 cm ³ /100 g	50 mg/100 g in acqua	10	az. purgativa dopo 4 h 36'
0,5 cm ³ /100 g	25 mg/100 g in acqua	9	az. purgativa dopo 1 h 45'
0,5 cm ³ /100 g	250 mg/100 g in olio	5	az. purgativa solo in 2 ratti (dopo 60' e 65')
0,25 cm ³ /100 g	—	10	az. purgativa dopo 68'
0,25 cm ³ /100 g	50 mg/100 g in acqua	4	az. purgativa dopo 3 h 50'
0,25 cm ³ /100 g	250 mg/100 g in olio (3 h prima del purgante)	6	az. purgativa solo in 1 ratto (dopo 9 h)
0,25 cm ³ /100 g	250 mg/100 g in olio (6 h prima del purgante)	9	az. purgativa solo in 1 ratto (dopo 2 h 45')
0,25 cm ³ /100 g	250 mg/100 g in olio (9 h prima del purgante)	6	az. purgativa solo in 3 ratti (dopo 1 h 15', 1 h 20' e 2 h 30')
0,20 cm ³ /100 g	—	6	az. purgativa dopo 69'
0,20 cm ³ /100 g	50 mg/100 g in acqua	5	az. purgativa solo in 1 ratto (dopo 1 h 14')
0,20 cm ³ /100 g	25 mg/100 g in acqua	5	az. purgativa dopo 1 h 35' (mancante in 1 ratto)
0,20 cm ³ /100 g	250 mg/100 g in olio	5	az. purgativa solo in 1 ratto (dopo 10 h)
0,20 cm ³ /100 g	125 mg/100 g in olio	5	az. purgativa dopo 50' in 3 ratti, man- cante in 2 ratti
0,10 cm ³ /100 g	—	3	az. purgativa dopo 47'

¹ Quando non sia specificato altrimenti, la dimetina in soluzione acquosa s'intende iniettata 30 min prima della somministrazione del purgante, quella in sospensione oleosa 90 min prima.

² I valori indicati sono, quando non risulti chiaro altrimenti, dei valori medi.

Possiamo avere invece una totale soppressione dell'azione purgativa se l'antiistaminico, o perché dato, in soluzione acquosa, a dosi ripetute, o perché sospeso in olio, resta nell'organismo in carica sufficientemente elevata fino a che il purgante è scomparso dall'intestino o perché espulso all'esterno o anche perché assorbito. Dopo 250 mg/100 g di dimetina in olio l'azione antipurgativa è evidente anche somministrando l'olio di ricino a distanza di 9 h dall'antiistaminico.

Il fatto degno di rilievo è in conclusione questo: che bloccando l'azione dell'istamina noi ritardiamo o sopprimiamo l'azione purgativa.

L'affermazione dell'esistenza di un nesso di causa ad effetto fra istamina e azione drastica non sembra gratuita.

Il purgante drastico, o quale è stato ingerito o dopo di avere subito trasformazioni di vario genere ad opera dei succhi digestivi, ha la evidente capacità di portare sulle cellule intestinali uno stimolo irritativo. E fin qui nulla di nuovo.

Ma in base alle attuali esperienze si deve ammettere che la cellula risponda all'irritazione fra il resto con messa in libertà di istamina che diffonderebbe rapidamente, irriterebbe a sua volta, iperemizzerebbe, aumenterebbe la permeabilità cellulare e capillare e quindi creerebbe le premesse per una facile trasudazione e secrezione di liquido nel lume intestinale.

È in tal modo iniziata l'azione purgativa: che viene completata dall'iperemesi.

Non sappiamo se anche questa sia conseguenza diretta della messa in libertà di istamina o non ne sia piuttosto una conseguenza indiretta, dovuta ai perturbamenti circolatori. Quello che sappiamo è che l'antiistaminico sembra bloccare ipersecrezione e iperemesi.

Una più ampia disamina critica e una più completa discussione dei nostri reperti sarà fatta nel lavoro definitivo.

Qui ci basti d'aver messo in luce la verosimile esistenza di un almeno parziale «condizionamento istaminico» dell'azione purgativa di un gruppo di purganti e d'aver portato qualche elemento per quella che forse potrà essere una classificazione dei purganti in base al loro meccanismo d'azione.

V. ERSPAMER e A. PAOLINI

Istituto di Farmacologia dell'Università di Roma, il 1° agosto 1946.

Summary

By the aid of a synthetic antihistaminic drug (dimethylamino-ethyl-benzylaniline) the Authors succeeded in demonstrating that the purgative action of various drastic agents (*Oleum Ricini*, *Elaterium*, *Colocynthis*, *Globularia Alypum*) is, at least partially, to be accounted to a release of histamine.

Antihistaminic drugs are indeed able, in quantities by themselves ineffective on the alimentary canal, to delay or even to abolish the purgative action of very large doses of the examined drastics.

Sur les liens de la phosphatase alcaline avec les nucléoprotéides du noyau cellulaire et des granules cytoplasmiques

L'emploi de plus en plus fréquent de la méthode de GOMORI pour la détection cytochimique des phosphatases a montré dans un grand nombre de cas l'existence d'une corrélation entre l'abondance de ces ferments dans

le noyau et le cytoplasme et la teneur de ceux-ci en acides nucléiques (Bibl. dans MOOG¹). Pareille corrélation s'explique peut-être par le rôle que les phosphatases paraissent jouer dans le métabolisme des acides nucléiques ainsi que l'indique, tout au moins dans le cas de l'acide thymonucléique, le parallélisme existant entre l'abondance des phosphatases dans le noyau et la vitesse de renouvellement du P de ce corps (BRACHET et JEENER²). Une part importante des phosphatases du cytoplasme étant incluses dans les granules à acide ribonucléique (BRACHET et JEENER, KABAT³), il paraissait indiqué de rechercher les relations qui pourraient exister entre ces ferments et les éléments constitutifs du noyau.

¹ Des érythrocytes nucléés en régénération provenant de sang de poules ayant subi quelques jours auparavant une injection de phénylhydrazine présentent une réaction de la phosphatase alcaline suivant GOMORI strictement limitée aux noyaux. Les noyaux de ces érythrocytes, isolés par une méthode antérieurement décrite et dissous dans une solution de KCl 0,6 M à p_H 8,2 donnent naissance à une solution présentant une forte rigidité (JEENER⁴). Après un traitement mécanique qui supprime irréversiblement cette rigidité la solution est soumise à une ultracentrifugation de 5 minutes (10^5 g au fond des tubes) qui provoque la sédimentation d'une fraction protéique de propriétés très différentes de celle restant en solution (JEENER⁵). Ces deux fractions seront appelées respectivement fraction insoluble et fraction soluble dans KCl 0,6 M.

La fraction soluble présente les caractères physiques et chimiques des solutions de thymonucléohistone préparées par MIRSKY⁶ et, indépendamment, par nous-mêmes; 55% de l'azote total qu'elle contient sont constitués par l'azote de l'acide thymonucléique; la cystéine et le tryptophane n'y existent qu'à l'état de traces.

La fraction insoluble, qui contient 28% de l'azote total du noyau est également insoluble dans NaOH 0,1 N. L'acide thymonucléique n'y existe vraisemblablement qu'à l'état d'impureté (5% du N total appartient au maximum à ce corps). Sa teneur en tryptophane est de 0,5%, en cystéine de 1% environ.

Les deux fractions, mises en présence de glycérophosphate de soude et de $MgCl_2$ à p_H 9, libèrent en trois heures des quantités d'ions orthophosphoriques proportionnelles pour chaque fraction aux quantités de protéines mises en œuvre. L'activité phosphatasique ainsi déterminée par rapport au poids sec des protéines est 4 à 5 fois plus grande dans la fraction insoluble que dans la fraction soluble. Que cette fraction protéique insoluble caractérisée par sa richesse en phosphatase alcaline présente des liens étroits avec la thymonucléohistone dans le noyau normal paraît découler du fait que l'ultracentrifugation de fragments de foie de grenouille (10^5 g, 20 min.) provoque le déplacement simultané et total vers le pôle centrifuge du noyau de la chromatine et de la phosphatase alcaline mise en évidence par la réaction de GOMORI. De même l'intense réaction phosphatasique des chromosomes (Bibl. dans MOOG¹) plaide en faveur de la présence dans ceux-ci

¹ F. MOOG, Biol. Rev. 21, 41 (1946).

² J. BRACHET et R. JEENER, C. r. Soc. biol. Paris (sous presse).

³ J. BRACHET et R. JEENER, Acta biol. Belg. 1, 476 (1941) et Enzymologia 11, 196 (1943). — E. A. KABAT, Science 1, 43 (1941).

⁴ R. JEENER, C. r. Soc. biol. Paris 138, 1050 (1944) et *idem* (mars 1945, sous presse).

⁵ R. JEENER, C. r. Soc. biol. Paris (janvier 1946, sous presse).

⁶ A. E. MIRSKY et A. W. POLLISTER, Proc. nat. Acad. Sci. 28, 344 (1942).