

D'autre part, le gradient d'indice, dans le très court espace qui correspond à une frontière séparant deux milieux d'indices différents, ne subit pas une variation régulière, ce qui se traduit, dans un tracé du type LONGSWORTH par exemple, par l'aspect dissymétrique des deux flancs du tracé (aspect bien étudié par TISELIUS et HORSFALL¹ à propos d'un travail sur les hémocyanines). Le flanc dirigé du côté de la solution tampon est toujours plus abrupt, surtout du côté descendant.

Mais, lorsqu'il s'agit de solutions de très grande viscosité (tel est le cas des myosines dont nous avons fait beaucoup d'études électrophorétiques), il existe une autre cause d'asymétrie qui peut donner lieu à certaines méprises. Ici, la cohésion moléculaire est élevée, la diffusion est faible; les frontières, au départ, apparaissent sous la forme d'une strie sombre très fine, à épaisseur presque constante, quelle que soit, dans l'enregistrement optique du type LONGSWORTH, la position du couteau. L'aspect du tracé est représenté fig. 1, A.

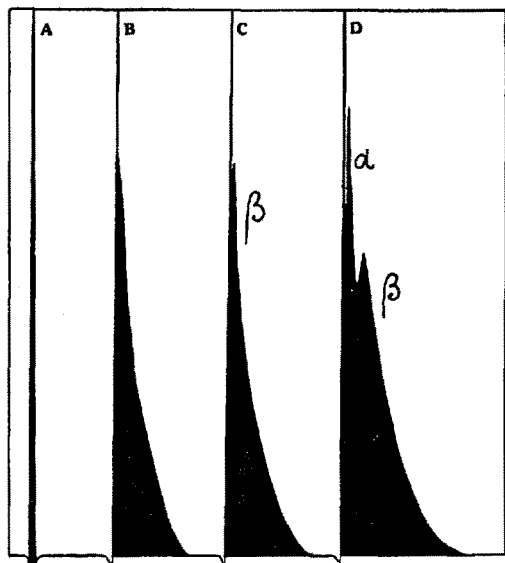


Fig. 1. Tracés électrophorétiques, enregistrement du type TISELIUS-LONGSWORTH, frontières ascendantes se déplaçant de droite à gauche, dans le dessin.

A. Aspect, au départ, d'une frontière séparant une solution de protéine très visqueuse d'une solution tampon. Le gradient est particulièrement élevé.

B. Après un certain temps d'électrophorèse, une frontière commence à se détacher d'une fine strie verticale, laquelle correspond à un phénomène de réflexion partielle.

C. Electrophorèse plus prolongée (même échantillon): le gradient correspondant à la substance β est maintenant nettement détaché de la strie de réflexion.

Les figures A, B et C se rapportent à une myosine d'EDSALL de muscles de lapin préalablement faradisés.

D. Cas de la myosine d'EDSALL du muscle normal de lapin, où, après une électrophorèse très prolongée, les deux composantes α et β sont nettement individualisées, tandis que subsiste la strie de réflexion dont la finesse et la constance de la largeur ne permettent pas qu'on l'interprète comme représentant le gradient d'indice d'une troisième composante.

Après un certain temps de transport électrique, l'asymétrie cathode/anode et la dissymétrie de chacune des frontières est devenue considérable, et l'aspect de la limite ascendante est atypique (fig. 1, B): au lieu que le

¹ A. TISELIUS et F. L. HORSFALL, Arch. Kemi, mineral et geol., 1, 13 (1939).

gradient d'indice subisse des variations progressives, ce qui dans le tracé se manifesterait par un *élargissement régulièrement progressif* du tracé considéré de haut en bas, celui-ci, de largeur *constante* sur la partie supérieure de son trajet, s'élargit ensuite assez brusquement, présentant un flanc incliné tourné vers la solution de protéine et un flanc vertical du côté de la solution tampon. Plus tard, à l'endroit où précédemment apparaissait un élargissement, se détache un gradient dont la forme devient bientôt classique, tandis que subsiste la strie très fine, de largeur homogène. L'aspect superficiel du tracé fait croire à l'existence de deux composantes, dont la plus rapide serait exceptionnellement homogène. Il n'en est rien: cette strie n'est que l'expression d'une *réflexion partielle* des rayons lumineux qui viennent frapper une frontière dont le gradient d'indice est si élevé qu'il existe une véritable discontinuité de phase, se comportant comme une surface réfléchissante. Rien de semblable ne s'observe à la frontière descendante, sauf au début de l'électrophorèse, lorsque les différences de champs électriques dont nous avons rappelé l'origine au début, n'ont pas encore réduit à suffisance le gradient d'indice.

Lorsque, dans un tracé électrophorétique, on se trouve en présence de semblables aspects, il peut donc être délicat de décider s'il s'agit d'une strie de réflexion partielle ou d'un gradient d'indice élevé, image d'une composante réelle. Seules des électrophorèses prolongées et un examen minutieux des clichés permettent d'en décider.

M. DUBUISSON

Laboratoire de Biologie générale, Université de Liège, et Chaire d'Actualités scientifiques, Université d'Alger, le 24 juillet 1946.

Summary

When electrophoretic studies are made on protein solutions of high viscosity, the beam of light used in the « Schieren » scanning method is partially reflected by the very sharp boundaries which leads to very asymmetric pictures taken by the TISELIUS-LONGSWORTH method.

Presenza di enteramina o di una sostanza enteraminosimile negli estratti gastrointestinali e splenici dei pesci e negli estratti gastroenterici delle Ascidie

La presenza di enteramina, o di sostanze enteraminosimili, risulta finora sicuramente dimostrata nella mucosa del tubo gastroenterico e nel tessuto splenico dei Mammiferi^{1,2} oltre che nelle ghiandole salivari posteriori dei Cefalopodi^{3,4} e nella ghiandola della porpora dei Muricidi⁵.

Di frequente l'esistenza della sostanza ci si è rivelata, già all'esame istochimico di materiale fissato in formolo, con il reperto, più o meno abbondante, di cellule a inclusi dotati di cromaffinità, di argentaffinità, di fluorescenza in luce di WOOD e di capacità di copulare, in ambiente alcalino, coi sali di diazonio: cellule entero-

¹ V. ERSPAMER, Naunyn-Schmiedeberg Arch. 196, 343, 366 (1940); Boll. Soc. ital. Biol. sper. 15, 828 (1940) e Naunyn-Schmiedeberg Arch. 196, 391 (1940).

² M. VIALI e V. ERSPAMER, Arch. Sci. Biol. 28, 101, 122 (1942).

³ M. VIALI e V. ERSPAMER, Arch. Fisiol. 40, 239 (1940).

⁴ V. ERSPAMER, Arch. Sci. Biol. 26, 296 (1940).

⁵ V. ERSPAMER (in corso di stampa).

cromaffini della mucosa gastroenterica dei Mammiferi, cellule cromaffini delle ghiandole salivari posteriori di *Octopus vulgaris* e di *Eledone moschata*, cellule cromaffini della zona mediana dell'organo ipobranchiale dei Muricidi.

Sembrirebbe pertanto giustificata l'illazione che ovunque esistano cellule a tipo enterocromaffinico, cellule cioè fornite delle caratteristiche reazionali dianzi specificate, ivi esista anche enteramina, pur non valendo invece assolutamente il contrario (tessuto splenico dei Mammiferi e degli Uccelli).

E anche per controllare l'attendibilità di questo modo di vedere che si è qui indagato sul contenuto enteraminico di estratti gastroenterici e splenici di Selaci e di Teleostei, nonché di estratti gastrointestinali di Ascidia.

Lo studio dei Vertebrati più bassi, dopo quello dei Mammiferi, non è senza interesse per documentare per nuove vie la presenza e l'identità dell'enteramina in tutta la serie dei Vertebrati; la contrapposizione dei Selaci ai Teleostei è stata deliberatamente voluta in quanto che i primi sono forniti di tipiche cellule enterocromaffini¹, nel mentre che nei secondi il sistema enterocromaffine è rappresentato esclusivamente dalle cellule «preenterocromaffini argentofili», da elementi cioè che non contengono enteramina sotto forma istochimicamente dimostrabile².

L'estensione poi delle indagini agli estratti gastrointestinali di Ascidia, giustificata dal reperto, nello stomaco di *Ciona intestinalis*, di elementi cellulari omologati dallo scopritore, il LISON³, alle cellule enterocromaffini dei Vertebrati, era quanto mai opportuna sia come controllo dell'attendibilità dell'asserto dell'A. belga, sia come contributo alle nostre conoscenze sulla diffusione del sistema enterocromaffine e dell'enteramina al di fuori dei Vertebrati.

Materiale

Le ricerche sono state condotte sul seguente materiale:

1) *Ascidia*. a) Due estratti alcoolici di tubo intestinale («stomaco» e prima metà dell'intestino) di *Tethium plicatum* allestiti il primo (*Tethium* I) da 24 animali (= 15 g di tessuto fresco), l'altro (*Tethium* II) da 90 animali (= 50 g di tessuto fresco);

b) due estratti alcoolici di *Ciona intestinalis* dei quali l'uno allestito dallo «stomaco» di 145 esemplari (= 21,7 g di tessuto fresco), l'altro dall'intestino di 126 esemplari (= 27,28 g di tessuto fresco).

2) *Selacio*. a) Estratto alcoolico del tubo gastroenterico, mucosa e muscolare, di un esemplare di *Scyllium canicula* (= 9 g di tessuto);

b) tre estratti alcoolici, rispettivamente di mucosa gastrica (= 90 g di tessuto), mucosa intestinale (= 50 g di tessuto) e milza (= 13 g di tessuto) ottenuti da vari esemplari di *Mustelus canis*.

3) *Teleosteo*. a) Due estratti alcoolici, rispettivamente di tubo gastrointestinale (= 40 g di tessuto) e milza (= 3,3 g di tessuto) allestiti da 2 esemplari di merluzzo;

b) un estratto alcoolico di tubo gastroenterico, mucosa e muscolare, allestito da 4 esemplari di sgombrò (= 30 g di tessuto).

Tutti gli estratti vennero preparati con alcool 95°: 5 cm³ di solvente per ogni g di tessuto fresco. Il materiale sottoposto ad estrazione fu sempre freschissimo, ad eccezione di quello di merluzzo e sgombrò prelevato da animali pescati da alcune ore. Dopo contatto per 48 h gli estratti vennero filtrati, l'alcool svaporato a depressione e i liquidi acquosi sgrassati con etere di petrolio e poi portati a secco. Il residuo venne ripreso con poca acqua + alcool + acetone in modo che ad ogni cm³ di liquido corrispondessero 1-2 g di tessuto fresco.

Su porzioni di questi liquidi estemporaneamente svaporate e riprese con acqua distillata vennero eseguiti i saggi chimici e farmacologici.

Come estratto di paragone venne utilizzato un estratto alcoolico di milza di bue.

Reazioni chimiche colorate

Non ha potuto, a mezzo delle consuete reazioni colorate¹ (reazione di GEBAUER-FULNEGG, reazione all'iodato di potassio, reazione di fluorescenza in luce di WOOD) essere dimostrata la presenza di enteramina in nessuno degli estratti di Ascidia e di Teleosteo presi in considerazione, neanche trattando liquidi di cui 1 cm³ corrispondeva a 2 g di tessuto fresco. Analoghi risultati negativi si sono avuti con l'estratto di milza di *Mustelus canis*.

Sono invece risultate positive tutte le reazioni, seppure molto deboli (la jodica è proprio ai limiti della sensibilità) e con tonalità di colore parzialmente atipiche, nell'estratto gastrico e ancor più nell'estratto intestinale di *Mustelus canis*, nonché in quello gastrointestinale di *Scyllium canicula*. Il primo dà reazioni quasi 20 volte meno intense dell'estratto campione di milza di bue, i due ultimi reazioni circa 10 volte meno intense.

Attività farmacologica

È stata saggiata esclusivamente sull'utero atropinizzato di topo in estro (animale castrato portato in estro con follicolina)². Tutti gli estratti vennero attivati³ prima della titolazione, trattandoli, a pH 7, per 5 min a 100° C.

Ecco i risultati conseguiti:

		Estratto splenico di bue
Estratto gastrointestinale di <i>Tethium</i>	I = 7-8%	
» » » »	II = 5-6%	
» gastrico » <i>Ciona</i>	= 4-5%	
» intestinale » »	= 2-2,5%	
» gastrointestinale » <i>Scyllium</i>	= 5%	
» gastrico » <i>Mustelus</i>	= 3%	
» intestinale » »	= 5%	
» splenico » »	= 1% circa	
» gastrointestinale » merluzzo	= 1% »	
» splenico » »	= 1% »	
» gastrointestinale » sgombrò	= 1% »	

L'attività farmacologica è stata quindi, come si vede, in ogni caso assai modesta.

Non bisogna però dimenticare che gli estratti di Ascidia sono stati allestiti da tessuti oltremodo ricchi in acqua e che essi non sono stati ottenuti dalla sola mucosa. Per gli estratti di *Mustelus* è poi da tenere in conto il loro contenuto (dimostrato sperimentalmente

¹ P. DE FILIPPI, Boll. Soc. med.-chir. Pavia 44, 441 (1930).

² B. UGGERI, Z. Zellforsch. 28 (1938).

³ L. LISON, C. r. Soc. Biol. Paris 112, 1237 (1933).

¹ M. VIALI e V. ERSFAMER, Arch. Sci. Biol. 28, 101, 122 (1942).

² V. ERSFAMER, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 196, 343, 366 (1940).

³ V. ERSFAMER, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 200, 60 (1942).

su uteri poco sensibili all'enteramina) in sostanze ad azione antagonista a quella dell'enteramina, depressiva sul tono e sui movimenti spontanei.

Dobbiamo ritenere sicuramente provato che l'azione eccitante sull'utero esplicata dagli estratti di *Tethium*, di *Ciona stom.*, di *Scyllium*, di *Mustelus int.* e *Mustelus stom.* è dovuta all'enteramina od a una sostanza enteraminosimile: detta azione è infatti abolita o notevolmente indebolita (del 90–95%) in seguito a trattamento dei liquidi con jodato di potassio o con sale di diazonio della paranitroanilina in ambiente alcalino (fig. 1 e 2).

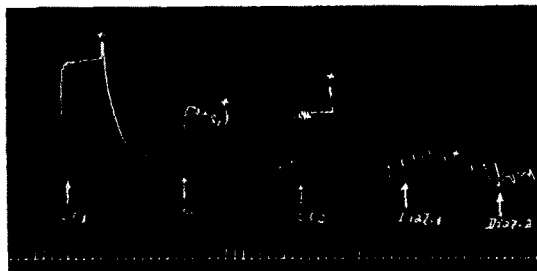


Fig. 1. Utero di topo in estro sospeso in 8 cm³ di liquido di Tyrode atropinizzato a 1:1000000.

St₁ = estratto di *Tethium* (STYELA) II: 0,4 cm³ 2/1.

St₂ = *idem*: 0,2 cm³ 2/1.

M = estratto di milza di bue: 0,2 cm³ 1/10.

Diaz₁ = estratto di *Tethium* II trattato con sale di diazonio della paranitroanilina: 0,2 cm³ 6/1.

Diaz₂ = *idem*: 0,6 cm³ 6/1.

1 cm³ di estratto 1/1 = ovunque a 1 g di tessuto fresco. Tempo: 15 sec.

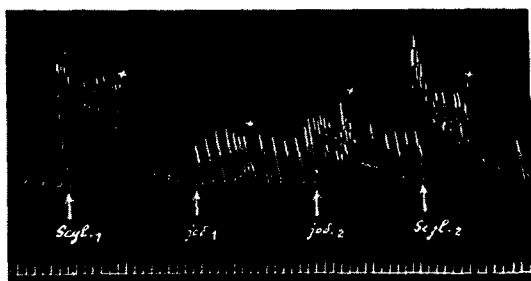


Fig. 2. Utero di topo in estro, atropinizzato.

Scyl₁ = estratto di *Scyllium*: 0,15 cm³ 1/2.

Scyl₂ = *idem*: 0,1 cm³ 1/2.

jod₁ = estratto di *Scyllium* trattato con jodato: 0,2 cm³ 1/1.

jod₂ = *idem*: 0,5 cm³ 1/1.

1 cm³ di estratto 1/1 = ovunque a 1 g di tessuto fresco. Tempo: 15 sec.

Non è stato possibile risolvere il quesito se la debolissima attività spiegata dagli estratti di *Teleosteo* possa o no essere attribuita all'enteramina. La presenza, in quasi tutti i più disparati estratti d'organo, di una modestissima azione eccitante sull'utero lo farebbe legittimamente escludere.

Conclusioni

1) Gli estratti di tubo gastroenterico di *Tethium plicatum* e di *Ciona intestinalis* contengono quantità apprezzabili di enteramina o di una sostanza enteraminosimile. In *Ciona* lo stomaco ne è più ricco dell'intestino. La natura enteraminica della sostanza attiva è

provata dalla sua labilità di fronte a trattamento con jodato e con il sale di diazonio della paranitroanilina.

L'enteramina è quindi presente anche nel tubo digerente dei Tunicati e le cellule descritte dal LISON¹ nello stomaco di *Ciona intestinalis* devono essere considerate perfettamente omologabili alle cellule enterocromaffini dei Vertebrati.

2) Anche gli estratti di mucosa gastrica e, ancor più, quelli di mucosa intestinale di *Selacio* contengono enteramina. La sostanza non sembra invece presente negli estratti gastrointestinali di *Teleosteo*. Questi fatti confermano l'esistenza di strettissimi rapporti d'interdipendenza fra cellule enterocromaffini e enteramina gastroenterica.

3) L'identificazione di sempre nuove localizzazioni dell'enteramina e nei Vertebrati e negli Invertebrati costituisce evidentemente un elemento di primo ordine in favore dell'attribuzione alla sostanza di una notevole importanza biologica.

V. ERSPAMER

Istituto di Farmacologia dell'Università di Roma e Centro di Biologia del C. N. R. presso la Stazione zoologica di Napoli, 24 luglio 1946.

Summary

It was possible to demonstrate, by means of chemical and biological reactions, the presence of enteramine or of an enteramine-like substance in gastro-intestinal extracts of two *Ascidia*, *Tethium plicatum* and *Ciona intestinalis*.

The same substance was also found in gastric and still more in intestinal extracts of *Selacia*, but seems not to be present in the spleen of *Selacia* nor in the alimentary canal of *Teleostea*.

¹ L. LISON, C. r. Soc. Biol. Paris 112, 1237 (1933).

Variations in Ca and Mg contents in *Arbacia* eggs as a result of fertilization

According to MAZIA¹ a certain amount of Ca in the eggs of *Arbacia* would pass from a bound to an ionic condition soon after fertilization. Later on, Å. and M. ÖRSTRÖM² were able to state the presence of a KMnO₄-reducing substance in sea water in which sea urchin eggs had been fertilized; a substance which, according to the A.S. is Ca released from the eggs, as a result of insemination.

In view of the great importance of the mineral ions equilibrium in the life processes in general and in the "Entwicklungserregung" in particular, an investigation on the behaviour of the mineral components of sea urchin eggs at fertilization and during the one-cell stage is being carried on. A preliminary account is given here about some variations I was able to find in the Ca and Mg contents of the eggs during the first hour after fertilization; data concerning the other inorganic components will be reported in a later paper.

Eggs of *Arbacia pust.* were collected at various intervals after fertilization, washed in M-urea, rapidly centrifuged and dried at 100°–120° C: the same washing and drying procedure was applied to unfertilized eggs. The dry matter was ashed (at 500°–600° C) and the ashes

¹ D. MAZIA, J. cell. a. comp. Physiol. 10, 291 (1937).

² Å. et M. ÖRSTRÖM, Protopl. 36, 475 (1941/42).