

Activité antistaphylococcique comparée de pénicilline G et de mélanges pénicilline G + sel métallique

Produit utilisé	Rapport atomes de métal / mol pénicilline	Diamètres des halos* (mm)				
		Plaque I**	Plaque II	Plaque III	Plaque IV	Plaque V
		FeCl ₃	AgNO ₃	CuSO ₄	AuCl ₃	UO ₂ SO ₄
Pénicilline (sel sodique)	0	16	17	17	15	17
Sel de métal + pénicilline.	1	16	17	17	15	17
Sel de métal (même quantité) . . .		0	0	0	0	0
Sel de métal + pénicilline.	10	16	17	17	15	16
Sel de métal (même quantité) . . .		0	0	0	0	0
Sel de métal + pénicilline.	100	16	17	17	15	16
Sel de métal (même quantité) . . .		0	0	0	0	0
Sel de métal + pénicilline.	1000	10	18	6	15	17
Sel de métal (même quantité) . . .		0	10	0	7	0

* Diamètre total moins le diamètre du disque de papier.

** Voir fig. 1.

Clinique dermatologique et Laboratoire de chimie pharmaceutique universitaires, Pharmacie de l'Hôpital cantonal de Genève, le 6 mars 1948.

Summary

The authors show the antibiotic activity of water-insoluble salts of hydrosoluble antibiotics in the case of penicillin G (salts of iron, copper, silver, gold, and uranium) and streptomycin (oleate).

Osservazioni preliminari, chimiche e farmacologiche, sulla murexina¹

1.º Preparazione e caratteristiche di alcuni sali puri di murexina.

Estratti alcolici o acetonicci di zona mediana di organo ipobranchiale di *Murex trunculus*^{1,2} vengono svaporati e il residuo oleoso ripreso con quantità di acqua distillata sufficienti a discioglierlo completamente.

L'aggiunta a campioni di questi liquidi di soluzioni acquose sature di acido picrico, acido picrolonico, acido stifnico, acido flavianico o sale di Reinecke determina un loro forte intorbidamento e il successivo depositarsi di abbondanti precipitati amorfi o cristallini.

I precipitati ottenuti con gli acidi picrico, picrolonico, stifnico e flavianico possono essere purificati per ricristallizzazione dall'acqua bollente, previa aggiunta di un po' di carbone animale che adsorbe,

¹ V. ERSPAMER e F. DORDONI, Arch. int. Pharmacodyn. 74, 263 (1947).

² V. ERSPAMER, Arch. int. Pharmacodyn. 74, 113 (1947).

fra il resto, impurezze di odore fecaloide derivanti dalla truncolopurpurina. Il reineckato grezzo viene purificato attraverso sua dissoluzione in acetone e riprecipitazione a mezzo di cauta aggiunta di acqua.

Tutti i prodotti puri così ottenuti sono sali di murexina. Eccone alcune caratteristiche:

Picratato di murexina: lamelle più o meno allungate e fini aghi intrecciati. P. f. 221–222°.

Picrolonato di murexina: tavole quadrangolari. P. f. 242° (con decomposizione) (fig. 1).

Flavianato di murexina: lunghi aghi, spesso intrecciati. P. f. 320° (con decomposizione).

Stifnato di murexina: tozzi aghi lanceolati e incurvati. P. f. 217° (con decomposizione) (fig. 2).

Reineckato di murexina: formazioni amorfe con aggregati cristallini drusiformi. P. f. 186–188° (con decomposizione).

Sono stati allestiti anche il cloraurato, il cloroplatino, l'ossalato e il cloruro di murexina, quest'ultimo assai igroscopico.

Trattando con soluzioni acquose sature di acidi picrico, picrolonico o stifnico estratti ipobranchiali previamente riscaldati a 100° per 10 min con NaOH n e poi neutralizzati non si ha più formazione di alcun precipitato. L'aggiunta di soluzione aquosa di sale di Reinecke determina invece subito la comparsa e il depositarsi di numerosissime, sottili lamelle iridescenti, facilmente solubili in acetone. Per cauta aggiunta alla soluzione acetonica di acqua calda sedimentano subito, o dopo raffreddamento, delle belle lamelle esagonali che fondono con decomposizione a 268–270°.

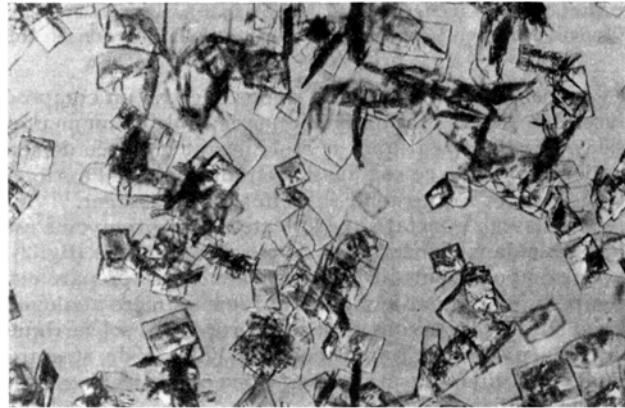


Fig. 1. Picrolonato di murexina, ricristallizzato dall'acqua.

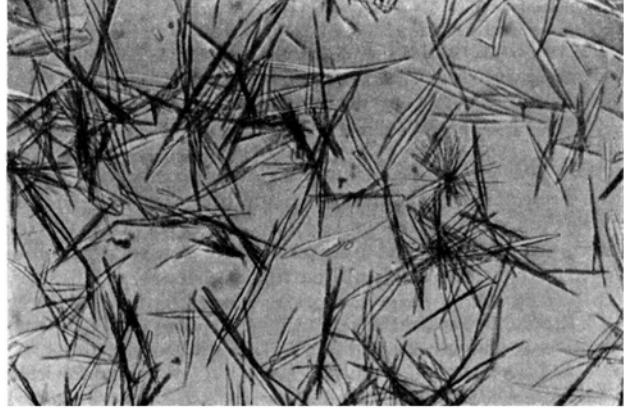


Fig. 2. Stifnato di murexina, ricristallizzato dall'acqua.

I caratteri cristallografici e il p. f. delle lamelle coincidono esattamente con quelli riscontrabili per il reineckato di colina, preparato dal cloruro.

La miscela del reineckato di colina e del reineckato del prodotto di idrolisi alcalina della murexina fonde a 268–270°.

Risulta così dimostrato che la murexina è un derivato della colina.

La possibilità, ammessa nel precedente lavoro, che si trattasse del derivato di una colina omologa viene pertanto a cadere.

È in corso lo studio microanalitico del picrato e dell'ossalato di murexina.

2.º Contenuto in murexina dell'organo ipobranchiale di *Murex trunculus*, *Murex brandaris* e *Tritonalia erinacea*.

È stato determinato il contenuto in murexina, espresso in picrato, di numerosi estratti alcoolici e acetonici di organo ipobranchiale di *Murex trunculus*, *Murex brandaris* e *Tritonalia erinacea*.

Reattivo biologico: muscolo retto dell'addome di rana non eserinizzato.

I risultati ottenuti sono riassunti in forma tabellare.

Tipo di estratto*	Residuo secco lasciato dall'estratto corrispondente a 1 g di tessuto fresco	Equival. in picrato di murexina dell'estratto corrispondente a 1 g di tessuto fresco
<i>Trunculus</i> MP, settembre 45 (151)	114 mg	125 mg
<i>Trunculus</i> MA, settembre 45 (124)	60 mg	45 mg
<i>Trunculus</i> B, settembre 45 (132)	24 mg	3,2 mg
<i>Trunculus</i> R, settembre 45 (242)	31 mg	2,8 mg
<i>Trunculus</i> MP, settembre 46 (50)	—	90 mg
<i>Trunculus</i> MA, settembre 46 (50)	—	30 mg
<i>Trunculus</i> M, aprile 46 (110)	96 mg	60 mg
<i>Trunculus</i> M, settembre 46 (1350)	85 mg	56 mg
<i>Trunculus</i> M, ottobre 46 (120)	—	45 mg
<i>Trunculus</i> M, dicembre 46 (2000)	80 mg	70 mg
<i>Trunculus</i> M porpora, aprile 46 (50)	100 mg	18 mg
<i>Trunculus</i> M porpora, settembre 46 (1000)	—	23 mg
<i>Brandaris</i> M, aprile 46 (22) . . .	50 mg	3,5 mg
<i>Brandaris</i> M, settembre 46 (8) . .	—	5,3 mg
<i>Brandaris</i> MP, aprile 46 (19) . .	—	0,3 mg
<i>Erinacea</i> totale II, aprile 46 (19)	—	30 mg
<i>Erinacea</i> totale III, settembre 46 (8)	—	12 mg

* Le cifre tra parentesi indicano il numero degli organi ipobranchiali sottoposti a estrazione. MP = organo ipobranchiale, zona media posteriore; MA = zona media anteriore; B = zona brancale; R = zona rettale; M = zona media totale; totale = organo ipobranchiale totale. Per precisi ragguagli sulle ragioni della suddivisione dell'organo ipobranchiale in varie zone si rinvia ai lavori di ERSPAMER¹ e ERSPAMER e DORDONI².

Dai dati esposti nella tabella risultano anzitutto confermate in pieno le precedenti conclusioni sulla distribuzione della murexina nelle varie zone dell'organo ipobranchiale e sul contenuto relativo in sostanza degli organi ipobranchiali di *Murex trunculus*, *Murex brandaris* e *Tritonalia erinacea*.

¹ V. ERSPAMER, Pubblicaz. Staz. zool. Napoli 20, 91 (1946).

² V. ERSPAMER e F. DORDONI, Arch. int. Pharmacodyn. 74, 263 (1947).

Ma ciò che maggiormente impressiona è il contenuto, veramente enorme, in murexina della zona media dell'organo ipobranchiale di *Murex trunculus* e *Tritonalia erinacea*.

Si consideri che l'estratto corrispondente a 1 g di tessuto fresco *Trunculus* MP settembre 45, che lascia un residuo secco di 114 mg, contiene quantità di sostanza equivalenti a ben 125 mg di picrato!

Non sappiamo ancora con precisione a quanta murexina base corrisponda il picrato: certo a non meno del 25%. Non meno del 25% del residuo secco e non meno del 3% del tessuto fresco *Trunculus* MP settembre 45 risulta pertanto costituito da murexina base.

3.º Tossicità della murexina.

Vere e proprie ricerche tossicologiche, seppure anche queste con solo carattere orientativo, sono state condotte nel topo con ossalato di murexina. Per via sottocutanea la D. 1. 0 si è aggirata attorno ai 150 mg/kg; la D. 1. 100 attorno ai 300 mg/kg. Per via endovenosa sono letali dosi 10–20 volte inferiori. La morte avviene sempre per asfissia ed è frequentemente seguita da contrazioni fascicolari e fibrillari a carico di quasi tutti i muscoli. Il cuore continua a battere per vari minuti dopo l'arresto del respiro.

La sostanza sembra 3–5 volte più tossica nel ratto e almeno 10 volte più tossica nel coniglio (via sottocutanea).

4.º Alcune azioni farmacologiche della murexina¹.

a) Sistema nervoso centrale.

La murexina a piccole dosi eccita fortemente il centro respiratorio, a forti dosi lo paralizza. L'azione eccitante è particolarmente ben apprezzabile nella depressione respiratoria da morfina o da barbiturici. Anche gradi elevatissimi di depressione, preparalitici o addirittura paralitici, possono essere quasi istantaneamente rimossi da iniezioni endovenose di appropriate quantità di sostanza.

Il centro vasomotore bulbare sembra essere assai meno influenzabile dalla murexina.

Gatti e cani non anestetizzati, mantenuti in vita con la respirazione artificiale, presentano, dopo iniezione endovenosa di forti dosi di estratto di organo ipobranchiale di *Murex trunculus*, un quadro di completa paralisi dell'asse cerebro-spinale, almeno per ciò che riguarda tutte le manifestazioni della vita di relazione. Si ha totale abolizione della coscienza e totale scomparsa di tutti i riflessi cutanei e mucosi.

Sono in corso molteplici ricerche dirette soprattutto a localizzare i punti di attacco della murexina e a sceverare nella complessa sindrome paralitica indotta dalla sostanza eventuali componenti imputabili alla sua azione periferica curariforme.

b) Apparato cardiovascolare.

Il cuore sembra essere scarsissimamente interessato dalla murexina. Solo concentrazioni, nel liquido nutritivo, dell' $1/1000$ di picrato esplicano sull'organo isolato di rana una modesta e fugace azione inotropa negativa, non influenzata dall'atropina. Le osservazioni in nostro possesso ci inducono a ritenere che anche il cuore di mammifero si comporti in modo analogo.

Non sappiamo finora se la base agisca direttamente sulle fibrocellule muscolari lisce delle pareti vasali.

Dopo iniezione endovenosa nell'animale integro e, in modo assai più costante e spiccato, nell'animale decapitato la murexina provoca una netta, fugace risposta ipertensiva.

Nel gatto spinale l'aumento di pressione è da presumersi dovuto, in massima parte almeno, a una scarica di adrenalina da parte non solo del sistema cromaffine ma anche delle terminazioni autonome adrenergiche: l'effetto ipertensivo persiste infatti, in parte, anche dopo

¹ Data la scarsa solubilità in acqua, inferiore all' $1/1000$, del picrato di murexina e la scarsa disponibilità di ossalato, si sono ripetutamente utilizzati, nelle esperienze sull'animale *in toto*, estratti grezzi di organo ipobranchiale di *Murex trunculus*. Le azioni farmacologiche di tali estratti registrate nella presente nota sono sicuramente e esclusivamente dovute alla murexina.

ablazione delle surrenali e dopo trattamento con diidroergotamina.

c) *Occhio.*

Occhio enucleato. L'occhio enucleato di *Eledone moschata* o di *Octopus vulgaris* immerso in acqua di mare satura di picrato di murexina presenta una rapida e intensa midriasi. Contemporaneamente si ha pronta ed energica espansione dei cromatofori dell'iride con conseguente forte accentuazione nella pigmentazione dell'organo.

Netta azione midriatica ha il picrato di murexina anche sull'occhio enucleato di rana e di rospo.

Occhio in situ. Nel gatto e nel cane, anestetizzati e non anestetizzati, l'iniezione endovenosa di dosi elevate di estratto ipobranchiale di *Murex trunculus* (respirazione artificiale!) provoca intensa ma fugace miosi che dura all'incirca quanto l'ipertensione. Esiste anche una netta retrazione dei globi oculari.

Fenomeni in tutto analoghi si osservano nell'*Eledone moschata* in seguito a iniezione di estratti in un cuore branchiale. Miosi intensissima che giunge fino alla completa scomparsa della pupilla, scoloramento dell'iride, retrazione dei globi oculari sono i fenomeni iniziali; midriasi e ricomparsa della pigmentazione iridea sono eventualmente fenomeni finali, forse asfittici.

d) *Secrezioni.*

La secrezione lacrimale non risulta modificata, nel cane e nel gatto, neanche da dosi più volte letali di estratto ipobranchiale. Costante è invece una conspicua, transitoria scialorrea che si ripete ad ogni iniezione endovenosa dell'estratto. Il fenomeno è abolito dall'atropina.

e) *Organi a muscolatura liscia.*

Persino a concentrazioni $1/10,000$ il picrato di murexina esplica solo una modestissima e incostante azione eccitante sull'intestino isolato di rana, piccione, cavia, cane, gatto, coniglio, ratto e sull'utero isolato di cavia, gatto, cane, ratto e coniglio. Questa azione non è per nulla modificata dall'atropina.

f) *Muscolatura scheletrica.*

Sul muscolo retto dell'addome di rana e sul muscolo dorsale di sanguisuga il picrato di murexina ha intensa azione contratturante, che viene solo di poco rinforzata dall'eserina ed è antagonizzata da forti dosi di aneurina.

Sull'animale *in toto* (rane e pesci) gli estratti ipobranchiali di *Murex trunculus* e di *Tritonalia erinacea* spiegano intensa azione curariforme; assai meno quelli di *Murex brandaris*.

Estratti concentrati, fatti gocciolare sulle braccia recise di *Eledone* o di *Octopus*, provocano fulminea e intensissima espansione dei cromatofori e la comparsa di violenti movimenti vermicolari e di attorcigliamento, seguiti, più tardi, da paralisi.

Ringrazio vivamente la dott. M. SPINA dell'Istituto di Farmacologia dell'Università di Roma e la dott. M. MARZADRO dell'Istituto Superiore di Sanità in Roma per il valido aiuto prestatomi nell'esecuzione delle presenti ricerche.

V. ERSPAMER

Istituto di Farmacologia dell'Università di Bari e Centro per la Biologia del C. N. R. presso la Stazione Zoologica di Napoli, il 5 aprile 1948.

Summary

(1) Murexine, a new choline derivative found in the hypobranchial body of *Murex trunculus*, *Murex brandaris*, and *Tritonalia erinacea*, was isolated as picrate, picrolonate, styphnate, flavianate, and reineckate. Some preliminary characteristics of these salts are given.

(2) The murexine content of the median zone of the hypobranchial body of *Murex trunculus* is extremely high: murexine picrate equivalents of 45–70 mg per g fresh tissue are commonly observed.

(3) Murexine manifests intense nicotinic and curariform actions, but is practically wanting in any muscarinic activity.

The central nervous system is strongly affected by the substance: at first stimulation seems to prevail, but later on, with larger doses, a deep depression regularly develops.

In decapitated cats and dogs murexine causes a significant rise in blood pressure, which is due, at least partially, to a liberation of epinephrine from the adrenal medulla and from the adrenergic nerve terminals.

On the enucleated eye of frogs and *Octopoda* the substance acts to cause mydriasis and expansion of the iris chromatophora.

Comportamento dell'allossana *in vivo*

Per la conoscenza del meccanismo d'azione dell'allossana nella patogenesi del diabete è di fondamentale importanza conoscere il comportamento ed il destino di questa sostanza quando viene iniettata.

Le sole ricerche esistenti in letteratura su questo argomento, per quanto mi risulta, sono quelle di KARRER¹ e di LEECH e BAILEY², le quali dimostrerebbero che l'allossana scompare rapidamente dal sangue già dopo cinque minuti dall'iniezione.

La scarsità dei dati si deve probabilmente al fatto che non esiste ancora in letteratura un metodo di dosaggio sicuro che possa essere applicato ai tessuti ed ai liquidi biologici *in vivo*.

I metodi finora proposti per la determinazione di questa sostanza si riferiscono quasi esclusivamente a determinazioni eseguite su soluzioni pure di allossana o su liquidi biologici ed estratti di organo cui si aggiungono *in vitro* quantità variabili di allossana³.

In precedenti ricerche ho elaborato un micrometodo, fondato sulla reazione di questa sostanza con l'o-fenilendiamina (una delle reazioni più sensibili dell'allossana) che rende possibile la determinazione di piccole quantità di allossana nel sangue e nei tessuti⁴.

In questa nota riporto i risultati di ricerche eseguite allo scopo di studiare il comportamento dell'allossana nel sangue e nei tessuti di animali (ratti) trattati con dosi diabetogene.

Descrivo brevemente la tecnica impiegata in questo esperimento.

A ratti albini del peso medio di 160 g si iniettano endovenosa da 20 a 40 mg di allossana (dose diabetogena). A vari intervalli di tempo gli animali vengono sacrificati per decapitazione. Si determina subito il contenuto in allossana del sangue e degli organi nel seguente modo:

Sangue: ad 1 cm³ di sangue reso incoagulabile per aggiunta di ossalato di sodio (0,5 g per 100 cm³ di sangue) si aggiungono 0,35 cm³ di una soluzione in glicerolo di o-fenilendiamina al 4%; 1 cm³ di una soluzione tampone a p_H 4, costituita da una miscela in parti uguali di acido acetico (2,45 g per litro) e di acetato sodico (0,64 g per litro); 0,3 cm³ di NaOH n/10; 4 cm³ di ZnSO₄ al 2%. Si agita e si filtra in un tubo contenente 0,2 cm³ della soluzione glicericia di o-fenilendiamina.

¹ P. KARRER, F. KOLLER und H. STÜRZINGER, Helv. chim. acta 28, 1529 (1945).

² R. S. LEECH e C. C. BAILEY, J. Biol. Chem. 157, 525 (1945).

³ S. BANERJEE, K. DITTMER et E. DU VIGNEAU, Science 101, 647 (1945). — R. M. ARCHIBALD, J. Biol. Chem. 158, 347 (1946). — G. BRUCKMANN, J. Biol. Chem. 165, 103 (1946).

⁴ N. SILIPRANDI, in corso di pubblicazione.