

univoca. Mentre infatti l'intervento di un fattore umorale sembra ben confermato dall'azione protettiva svolta dalle sostanze aventi effetto antiistaminico, appare talora problematica in varie forme la partecipazione del fattore emodinamico o del fattore nervoso; anche le recenti ricerche condotte da PAOLINI tenderebbero ad esempio ad escludere l'intervento del sistema nervoso simpatico nella patogenesi dell'edema polmonare acuto da tiourea o da salicilato di metile, intervento che lo stesso autore ritiene dimostrato nell'edema polmonare acuto da adrenalina¹.

Allo scopo di mettere in evidenza l'eventuale presenza di un meccanismo nervoso nella patogenesi dell'edema polmonare acuto sperimentale ottenibile nei conigli con la somministrazione per via endovenosa di una soluzione di cloropicrina, abbiamo condotto una serie di ricerche intese a stabilire l'influenza degli alcaloidi diidrogenati della segale cornuta su questa particolare varietà di edema polmonare acuto sperimentale. Le ricerche sono state effettuate su conigli di razza nostrana, di ambo i sessi e di media taglia, ai quali venivano somministrate per via endovenosa dosi variabili di Hydergin Sandoz e successivamente a queste una dose sicuramente edematigena di cloropicrina. Parallelamente un gruppo di animali da esperimento è stato trattato esclusivamente con le stesse dosi di cloropicrina.

Riportiamo nelle seguenti tabelle i dettagli dell'esperimento:

Tabella Ia

Numero	Peso in kg	Hydergin in mg/kg	Cloropicrina in mg/kg	Durata della sopravvivenza	Peso dei polmoni in g
1	1,9	0,10	15	45 m	20
2	1,5	0,10	15	2 h	19
3	1,8	0,15	15	12 h	22
4	1,5	0,15	15	vive	—
5	1,3	0,15	15	18 m	12
6	1,7	0,15	15	12 h	17
7	1,7	0,15	15	10 h	17
8	1,7	0,15	15	2 h	16
9	2,0	0,15	15	6 h	20
10	1,4	0,15	15	18 m	13
11	1,4	0,15	15	50 m	23
12	1,8	0,15	15	20 m	19
13	1,5	0,30	15	31 m	9
14	1,3	0,30	15	18 m	13
15	1,5	0,30	15	30 m	21
16	1,6	0,30	15	50 m	14
17	1,7	0,30	15	1 h	21
18	1,5	0,30	15	2 h	18
19	1,4	0,30	15	1 h	23
20	1,8	0,30	15	50 m	20
21	1,6	0,30	15	30 m	17
22	1,6	0,30	15	40 m	18
23	1,5	—	15	35 m	18
24	1,3	—	15	20 m	13
25	2,0	—	15	50 m	17
26	1,3	—	15	50 m	17
27	1,9	—	15	30 m	18
28	1,6	—	15	4 h	21
29	1,5	—	15	2 h	29
30	1,8	—	15	1 h	22
31	1,5	—	15	50 m	24
32	1,6	—	15	2 h	17
33	1,7	—	15	6 h	20
34	1,4	—	15	15 m	23
35	1,5	—	15	20 m	25
36	1,4	—	15	20 m	22
37	1,3	—	15	30 m	19

¹ A. PAOLINI, Exper. 6, 234 (1950).

Tabella II^a

Conigli trattati	Hydergin (mg/kg)	Cloropicrina (mg/kg)	ESITO	
			morti	sopravviventi
15	—	15	15	—
2	0,10	15	2	—
10	0,15	15	9	1
10	0,30	15	10	—

Dall'esame dei dati riportati nelle tabelle si può concludere che gli alcaloidi diidrogenati della segale cornuta contenuti nell'Hydergin non hanno esercitato, con le dosi e nelle condizioni da noi adottate, alcun effetto protettivo sull'edema polmonare acuto da cloropicrina nel coniglio.

I nostri risultati ci portano a ritenere che in questa varietà di edema polmonare acuto sperimentale non si abbia alcuna partecipazione del sistema nervoso simpatico, contrariamente a quanto è stato dimostrato per altre varietà e particolarmente per l'edema polmonare acuto da adrenalina.

F. TESTONI e V. MOSCATO

Istituto di Patologia speciale Medica e Metodologia Clinica dell'Università di Roma, il 4 ottobre 1952.

Zusammenfassung

Die im Hydergin enthaltenen dihydrierten Mutterkornalkaloide zeigen keine Schutzwirkung gegen das experimentelle akute Lungenödem durch Chloropikrin beim Kaninchen. Diese Feststellung schliesst die Teilnahme des sympathischen Nervensystems in der Pathogenese dieser Art von akutem experimentellem Lungenödem aus.

Ricerche sull'A.C.T.H. del sangue: Attività dell'ultrafiltrato

Recenti ricerche di BORNSTEIN e TREWHELLA¹ e nostre² eseguite con differenti tecniche hanno concordemente dimostrato che il sangue di uomo normale possiede attività corticotropa. Analoga attività è stata messa in evidenza del tutto recentemente da SYDNOR e SAYERS³ anche per il sangue di ratto con la tecnica della separazione ed arricchimento su ossicellulosa, già indicata da ASTWOOD⁴ per l'isolamento dell'ormone corticotropo dall'ipofisi.

Sulla natura dell'A.C.T.H. ematico non si ha, a tutt'oggi, a differenza di quello ipofisario, alcuna nozione.

Noi tuttavia abbiamo potuto osservare che la sostanza corticotropa del sangue non viene integralmente precipitata dall'acetone ad alta concentrazione (94%), fatto questo confermato da SYDNOR e SAYERS³; inoltre abbiamo potuto stabilire che la scomparsa totale dell'attività corticotropa naturale del plasma (conservato alla temperatura ambiente di 20°C circa) avviene in circa 12 ore a differenza dell'A.C.T.H. ipofisario addizionato

¹ J. BORNSTEIN e P. TREWHELLA, Lancet 2, 678 (1950).

² L. MONTANARI, M. MARTINELLI, C. A. ROSSI e G. MORUZZI, J. A.M.A. 147, 525 (1951).

³ K. L. SYDNOR e G. SAYERS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 79, 432 (1952).

⁴ E. B. ASTWOOD, M. S. RABEN, R. W. PAYNE e A. B. GRADY, J. Amer. Chem. Soc. 75, 2929 (1951).

Esperimento N°	Soggetto in esperimento	N° dei ratti usati per il saggio			Diminuzione media dell'acido ascorbico tra surrenale sinistra e destra (mg per 100 g di organo fresco)		
		Plasma	Ultrafiltrato	Residuo ultra- filtrazione	Plasma	Ultrafiltrato	Residuo ultrafiltrazione
1	normale	3	3	4	35,1 ± 7,2	41,9 ± 8,6	2,3
2	normale	3	3	—	30,6 ± 5,8	34,0 ± 6,8	—
3	normale	2	3	3	47,4 ± 8,0	56,6 ± 7,1	4,6
4	normale	4	3	—	26,3 ± 5,2	45,1 ± 7,7	—
5	normale	3	3	3	38,6 ± 6,7	55,5 ± 4,8	3,8
6	normale	3	3	—	13,9 ± 6,2	22,7 ± 9,1	—
7	normale	3	4	—	36,3 ± 9,1	39,5 ± 5,3	—
8	normale	3	2	—	21,3 ± 4,8	29,6 ± 6,6	—

al plasma (seppure a 37°C) che scompare in pochi minuti¹.

Queste osservazioni ci hanno indotto a supporre che l'A.C.T.H. del sangue fosse di struttura chimica differente da quello ipofisario a p.m. 20000², e probabilmente più semplice.

D'altra parte le preparazioni attive con strutture peptidiche presumibilmente molto semplici sono state ottenute anche dall'ipofisi per ultrafiltrazione di opportuni estratti (CORTIS-JONES e collaboratori³; MORUZZI e collaboratori⁴) o per dialisi di un idrolisato con pepsina dell'ormone ipofisario (BRINK e collaboratori⁵), o addirittura per estrazione dei liquidi tricloroaceticci usati per la precipitazione dello stesso ormone (GESCHWIND e collaboratori⁶). L'attività ormonale si deve quindi ritenere collegata non all'intera molecola proteica, ma ad una frazione di essa costituita da pochi (sette od otto) aminoacidi (LI⁷; BRINK e collaboratori⁸; MORUZZI e collaboratori⁹).

Le ricerche sull'attività corticotropa del plasma umano e del relativo ultrafiltrato che riferiamo hanno appunto lo scopo di stabilire se l'A.C.T.H. presente nel sangue ha una struttura semplice come quella suaccennata e tale da poter ultrafiltrare.

Parte sperimentale. Gli esperimenti sono stati eseguiti su sangue d'individuo normale tra i 20 e i 45 anni di età. L'attività corticotropa del plasma e relativo ultrafiltrato venne determinata con il test dell'acido ascorbico nel ratto ipofisectomizzato¹⁰ con il metodo da noi già indicato¹¹ iniettando in ogni caso 0,5 cm³ di liquido. L'ultrafiltrazione veniva effettuata ad una pressione di 15 atmosfere in gas inerte (azoto) a +2°C attraverso una membrana di cellophan in un ultrafiltro appositamente costruito e che permette di ultrafiltrare rapidamente ed a

¹ M. REISS, F. E. BADRICK, I. D. K. HALKERSTON e C. PLAICE, *Nature* 168, 206 (1951).

² C. H. LI, H. M. EVANS e M. E. SIMPSON, *J. Biol. Chem.* 149, 413 (1943).

³ B. CORTIS-JONES, A. C. CROOKE, A. A. HENLY, P. MORRIS e C. J. O. R. MORRIS, *Biochem. J.* 46, 173 (1950).

⁴ G. MORUZZI, L. MONTANARI, C. A. ROSSI, A. RABBI e G. JACOLI, *Boll. Soc. it. Biol. sper.* 26, 1567 (1950).

⁵ N. G. BRINK, M. A. P. MEISINGER e K. FOLKERS, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 1040 (1950).

⁶ J. I. GESCHWIND, G. P. HESS, P. G. CONDLIFFE, H. M. EVANS e M. E. SIMPSON, *Science* 112, 436 (1950).

⁷ C. H. LI, *Pituitary-Adrenal Function*, edited by RUTH C. CHRISTMAN, Amer. Ass. Adv. Sci. (Washington, 1950).

⁸ N. G. BRINK, M. A. P. MEISINGER e K. FOLKERS, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 1040 (1950).

⁹ G. MORUZZI, L. MONTANARI, C. A. ROSSI, A. RABBI e G. JACOLI, *Boll. Soc. it. Biol. sper.* 26, 1567 (1950).

¹⁰ M. A. SAYERS, G. SAYERS, and L. A. WOODBURY, *Endocrinology*, 42, 379 (1948).

¹¹ L. MONTANARI, M. MARTINELLI, C. A. ROSSI e G. MORUZZI, *I. c.*

bassa temperatura, ad evitare perdite di attività corticotropa¹. L'ultrafiltro è in bronzo nichelato e le sue caratteristiche appaiono dalla figura 1. La parte centrale poggia su di un disco di plexiglas di mm 6 di spessore (E) e munito di fori del diametro di 1 mm. Sul plexiglas si pone un disco di carta da filtro e quindi uno di cellophan per dialisi.

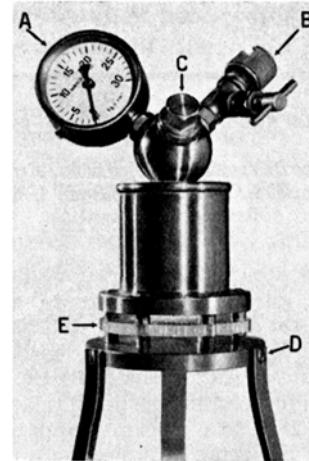


Fig. 1. Ultrafiltro semiperto. ø interno mm 48, altezza mm 50; A = manometro per pressione; B = raccordo per immissione del gas, C = foro a vite per introduzione del liquido, D = fondo acciaio inossidabile, E = disco di plexiglas.

Immerso il plasma (foro C) e quindi il gas inerte fino a pressione di 15 atmosfere, si chiude il rubinetto B e si pone l'apparecchio in ghiacciaia a +2°C. Usando 8 cm³ circa di plasma si ottiene, in 60-90 min, una quantità di ultrafiltrato sufficiente per i saggi su almeno 3 animali. L'ultrafiltrato è incolore, limpido, non intorbida né al calore, né per aggiunta di acido tricloroacetico o di altri reattivi dealbuminanti.

In tre casi si è sagggiata pure l'attività del residuo dell'ultrafiltrato; a tale scopo il residuo veniva ripreso con una quantità di soluzione fisiologica corrispondente al plasma ultrafiltrato. I risultati riguardanti plasma ed ultrafiltrato di otto individui normali (uomo) sono riportati nella tabella.

Controlli eseguiti con soluzione fisiologica (0,5 cm³ per 100 g di peso corporeo) hanno dato diminuzioni dell'acido ascorbico di minima entità e corrispondenti a quelle osservate con il residuo dell'ultrafiltrato.

Per una valutazione quantitativa dell'A.C.T.H. ematico in Unità Internazionali abbiamo tracciato una curva

¹ L. MONTANARI, M. MARTINELLI, C. A. ROSSI e G. MORUZZI, *J. A.M.A.* 147, 525 (1951).

con la preparazione standard Internazionale¹ della quale 1 mg = 1 unità. I saggi sull'animale ipofisectomizzato sono stati eseguiti con 1-0,5-0,25 mu (milliunità) ed i risultati sono riportati nel grafico della figura 2.

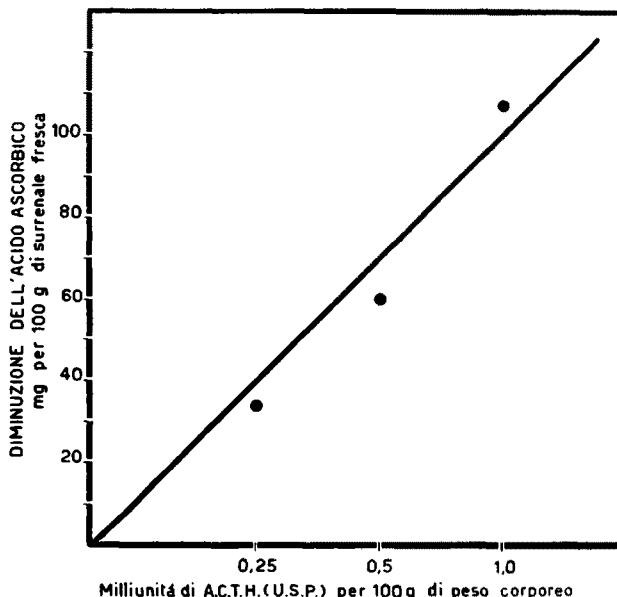


Fig. 2. Diminuzione dell'acido ascorbico nelle surrenali per somministrazione endovenosa di A.C.T.H. (Provisional U.S.P. Corticotropin Reference Standard).

Tenendo presente che la diminuzione media dell'acido ascorbico nelle surrenali determinata da $0,5 \text{ cm}^3$ di plasma è di $31,18 \pm 3,73$ e quella dell'ultrafiltrato è di $40,6 \pm 4,19$, si può dedurre in base al grafico della figura 2 che il contenuto di A.C.T.H. è di 40 mu per 100 cm^3 di plasma e di 52 mu per 100 cm^3 di ultrafiltrato.

Conclusioni. Dai dati riportati appare innanzitutto confermato che il plasma di individuo normale possiede attività corticotropa. Anche se le diminuzioni di acido ascorbico nelle surrenali osservate con la nostra tecnica (iniettando $0,5 \text{ cm}^3$ di plasma fresco per 100 g di peso corporeo) non sono molto elevate, purtuttavia noi riteniamo che questi dati siano sufficientemente significativi, tanto più se si tengono presenti i risultati ottenuti nelle prove in bianco usando soluzione fisiologica. D'altra parte col nostro ceppo di ratti, tali dati corrispondono a quelli ottenuti usando 0,25-0,50 mu della preparazione standard Internazionale.

Una tecnica d'arricchimento, che permetta cioè di concentrare l'A.C.T.H. ematico prima del saggio, come quella prospettata recentemente da SYDNOR e SAYERS², noi la riteniamo consigliabile qualora si osservino abbassamenti dell'acido ascorbico nelle surrenali molto limitati. A questo riguardo ricerche comparative sono in corso da parte nostra.

Per i soggetti esaminati (tabella) il plasma presenta un'attività corticotropa corrispondente ad un valore medio di 40 mu di A.C.T.H. per 100 cm^3 , mentre per l'ultrafiltrato è di 52 mu per 100 cm^3 e cioè lievemente superiore. Senza voler per ora attribuire un significato

¹ Ringraziamo l'American Committee University of Bologna di New York che ci ha gentilmente procurato il Provisional U.S.P. Corticotropin Reference Standard.

² K. L. SYDNOR e G. SAYERS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 79, 432 (1952).

a questa differenza che potrebbe rientrare nei limiti di errore sperimentale, risulta chiaramente, che la sostanza corticotropa del plasma è totalmente ultrafiltrabile. Ciò appare non solo dal valore medio, ma anche dai dati singoli riferentisi a ciascun plasma. Una conferma si ha nell'osservazione che i residui della ultrafiltrazione esaminati non presentano alcuna attività.

In base pertanto ai risultati ottenuti, noi siamo portati a confermare che: il sangue di uomo normale ha un'attività corticotropa ed a precisare che l'A.C.T.H. ematico è in forma relativamente semplice e tale da poter ultrafiltrare.

C. A. ROSSI, L. MONTANARI,
M. MARTINELLI e G. MORUZZI

*Istituto di Chimica biologica dell'Università di Bologna,
il 15 ottobre, 1952.*

Summary

Corticotropic activity of human plasma as well as of the relative ultrafiltrates has been assayed by the ascorbic acid depletion test on hypophysectomized rats.

It is further confirmed that human plasma displays a corticotrophic activity (40 mu per 100 cm^3), and that blood A.C.T.H. is totally ultrafiltrable (52 mu per 100 cm^3).

This may lead to the conclusion that A.C.T.H. may be present in blood in a relatively simple form.

New Method of Staining of Bacterial Capsules in Films and Sections

It is well known that many polysaccharides are present in bacterial cells. Such polysaccharide substances are more or less directly related to infectious or immunological phenomena.

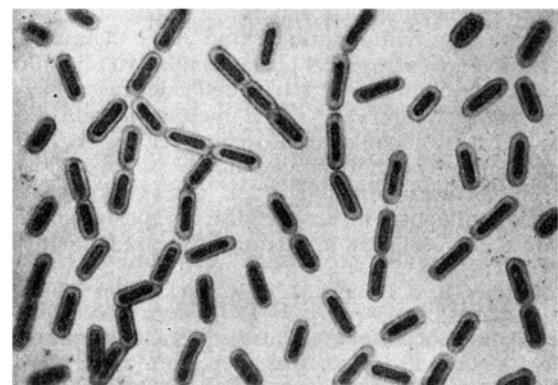


Fig. 1.—*Klebsiella pneumoniae*. Alcian Blue – Carabolic Fucsin. 1:2000.

Very interesting are the polysaccharides which form a capsule to some of the bacterial cells. The importance of this capsule lies in the fact that it is connected with virulence and specificity of germs. However, the practical demonstration of bacterial capsules in films and sections is very difficult; several staining procedures have been devised, but the results obtained have not been satisfactory. Good results have now been obtained from the following process, with which I have succeeded in demonstrating the bacterial capsules in films and sections.