

Wirkung von Crotonölextrakten auf die Auswanderung von
Hühnerleukozyten *in vitro*.

		10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Petroläther	1a-1c	Ø	Ø	Ø
Benzol	2a-2c	Ø	Ø	Ø
Chloroform	3a	+	+	Ø
	3b	+	+	Ø
	3c	+	+	+
Äther	4a-4c	(+)	Ø	Ø
Aceton	5a-5c	Ø	Ø	Ø
Alkohol	6a	+	+	+
	6b	+	Ø	Ø
	6c	+	Ø	Ø

+ = Förderung der Auswanderung 16 h

Ø = Keine Wirkung

leukozytotaktische Substanzen vorhanden sind, deren Natur vorläufig noch nicht abgeklärt ist, und weiterhin im Vergleich mit den Untersuchungen von DANNEEL, dass im Crotonöl mehrere offenbar chemisch verschiedene Substanzen mit hochspezifischer biologischer Wirkung vorliegen.

B. SCHÄR und R. MEIER

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel, den 15. August 1955.

Summary

Various croton oil fractions were studied with regard to their *in vitro* effect on leucocytes and their irritative action. It was discovered that there exist fractions exerting a stimulating effect on leucytic migration and an irritative action and other fractions having a leucocytic stimulating effect without pronounced irritative action. The co-carcinogenic fractions of DANNEEL have no promotory effect on the migration of leucocytes.

Identificazione della 5-OH-Triptamina nei trombociti degli uccelli

Il fattore vasocostrittore¹ nelle piastrine dei mammiferi è stato identificato da BRACCO e CURTI² e susseguentemente da ZUCKER, RAPPORT e FRIEDMAN³ con la 5-OH-triptamina, sostanza scoperta da RAPPORT⁴ nel siero di bue. La 5-OH-triptamina non è presente in altri elementi del sangue al di fuori delle piastrine, e compare nel siero quando avviene la coagulazione⁵.

Nel sangue degli uccelli le funzioni piastriniche si suppone siano svolte dai cosiddetti trombociti, cellule nucleate morfologicamente differenti dalle piastrine dei mammiferi. Lo scopo di questa ricerca è quello di dimostrare la presenza di 5-OH-triptamina nei trombociti del sangue degli uccelli.

¹ M. B. ZUCKER, Amer. J. Physiol. 148, 275 (1947).

² M. BRACCO e P. C. CURTI, Haematologica 37, 721 (1953); Exper. 10, 71 (1954).

³ M. B. ZUCKER, B. K. FRIEDMAN e M. RAPPORT, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 85, 282 (1954).

⁴ M. RAPPORT, J. biol. Chem. 180, 961 (1949).

⁵ M. BRACCO e P. C. CURTI, Ann. Villaggio Sanat. Sondalo 1, 180 (1953). – M. B. ZUCKER e J. BORRELLI, J. appl. Physiol. 7, 425, 432 (1955).

Gli esperimenti sono stati condotti usando sangue di pollo e di oca. Il sangue prelevato dalla vena dopo iniezione di eparina con ago e siringa siliconati, veniva diluito in 3 volumi di una soluzione preparata mescolando 5 parti di NaH₂PO₄ 0,2 M, 5 parti di Na₂HPO₄ 0,2 M e 2 parti di ossalato di sodio al 4%, mantenuta a bassa temperatura (4–6°C). I trombociti venivano separati per centrifugazione frazionata in una centrifuga refrigerata e lavati 2 volte con 3 volumi di soluzione fisiologica.

Era così possibile ottenere una sospensione di trombociti ben conservati e praticamente purificati da altri elementi (Fig. 1).

Estratti di trombociti venivano preparati per le determinazioni chimiche e farmacologiche nel seguente modo. 30–60 mg di trombociti freschi venivano sospesi in 5 volumi di etanolo e lasciati in frigorifero per 12 h. Dopo agitazione per 10 min la miscela veniva centrifugata e il sopranatante limpido veniva prelevato e tirato a secco sotto vuoto. Il residuo veniva ripreso con 0,5 ml di acqua, di cloroformio e di etanolo e trasferito su carta Whatman N° 4 in 5 distinte macchie. Sulla stessa carta veniva posta una macchia di controllo di 15 µg di 5-OH-triptamina. La separazione cromatografica veniva eseguita a mezzo di irrigazione ascendente con una miscela di cloroformio, etanolo e acqua nel rapporto 80:50:20. Dopo una corsa del fronte del solvente di 20 cm, la carta veniva asciugata in aria ambiente. La striscia del controllo e una striscia dell'estratto venivano spruzzate con acido sulfanilico diazotato ed esposte a vapori di ammoniaca: in ambedue compariva una macchia rossa con Rf = 0,43, cangiante al violetto dopo esposizione a vapori di HCl. Una seconda striscia dell'estratto, spruzzata con *p*-dimetilaminobenzaldeide e seccata a 80°C, mostrava una macchia violetta con lo stesso Rf della 5-OH-triptamina. Una macchia blu nella stessa posizione veniva dimostrata in una terza striscia dell'estratto con il reattivo di Folin-Ciocalteu (Fig. 2). Le porzioni corrispondenti della quarta e quinta striscia dell'estratto venivano eluite in 4 ml di HCl N/500 con agitazione per ½ h. Lo spettro di assorbimento nell'ultravioletto di questo eluito risultò del tutto simile a quello riportato nella Figura 4. Con una piccola quantità dell'eluito si saggiava l'attività sull'utero di ratto, isolato 24–30 h dopo iniezione di 10

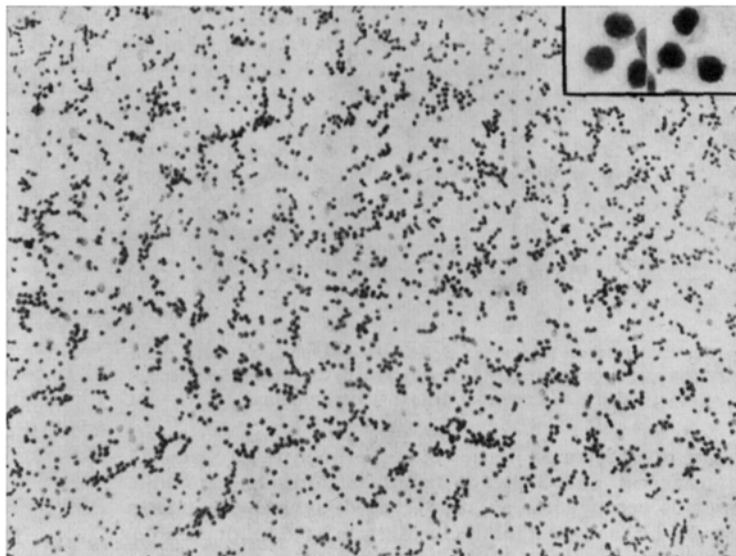


Fig. 1.—Trombociti separati dal sangue di pollo, colorati con May-Grünwald-Giemsa, × 90. All'angolo superiore destro gli stessi elementi, × 900.

$\mu\text{g}/100\text{ g}$ di dietilstilbestrolo, e sull'intestino isolato di cavia. Ambedue gli organi presentarono contrazione come con la 5-OH-triptamina.

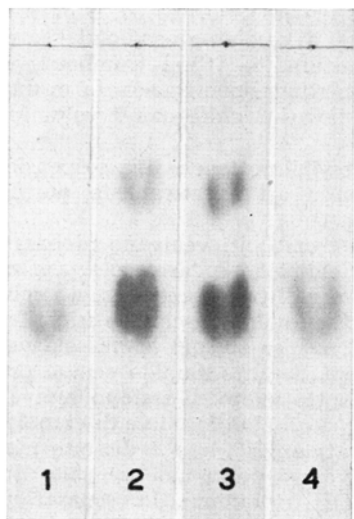


Fig. 2.-Cromatografia su carta. 1 5-OH-triptamina, con acido solfanilico diazotato; 2 estratto di trombociti, con acido solfanilico diazotato; 3 estratto di trombociti con Folin-Ciocolteau; 4 estratto di trombociti con *p*-dimetilaminobenzaldeide.

La quantità restante dell'eluato veniva tirata a secco; il residuo veniva ripreso con 0,5 ml di HCl *N*/500 e posto su carta Whatman N° 4 in un'unica macchia. Sulla stessa carta si poneva una macchia di controllo di 10 μg di 5-OH-triptamina. Si eseguiva separazione elettroforetica per 4 h in tampone acetato a pH 5,1 con 200 V e 0,28 mA/cm. La carta veniva seccata in aria ambiente e spruzzata con acido solfanilico diazotato. Sia la striscia di controllo che la striscia dell'estratto presentavano un'unica macchia rossa (Fig. 3).

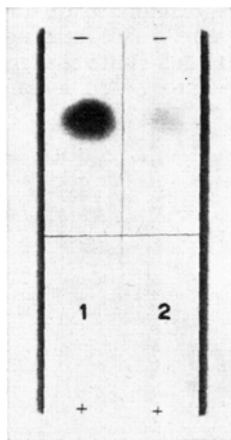


Fig. 3. Elettroforesi su carta: 1 5-OH-triptamina; 2 eluito della porzione del cromatogramma di estratto di trombociti corrispondente alla macchia della 5-OH-triptamina.

In una seconda serie di esperimenti gli estratti etanolici di 30-60 mg di trombociti freschi venivano tirati a secco sotto vuoto. Il residuo veniva estratto con 2 ml di acqua, 2 ml di cloroformio e 0,5 ml di etanolo con agitazione per 10 primi. La miscela veniva centrifugata e il sopranatante limpido privo di lipidi veniva aspirato e tirato a secco sotto vuoto. Il residuo veniva

ripreso con 0,5 ml di HCl *N*/500 e posto su carta Whatman in un'unica macchia. Una macchia di controllo di 10 μg di 5-OH-triptamina veniva posta sulla stessa carta. Si eseguiva elettroforesi in tampone acetato pH 5,1, 200 V e 0,28 mA/cm per 4 h. La carta veniva asciugata in aria ambiente. La striscia di controllo veniva spruzzata con *p*-dimetilaminobenzaldeide e seccata a 80°C. La porzione della striscia dell'estratto, corrispondente alla macchia violetta sulla striscia di controllo, veniva eluita con 5 ml di HCl *N*/500 agitando per $\frac{1}{2}$ h. Lo spettro di assorbimento nell'ultravioletto di questo eluito è riportato nella Figura 4, unitamente allo spettro di una soluzione di 5-OH-triptamina. Le deviazioni della curva dell'estratto di trombociti da quella della 5-OH-triptamina sono lievi e corrispondono alle variazioni osservate negli estratti di piastrine di mammiferi⁶.

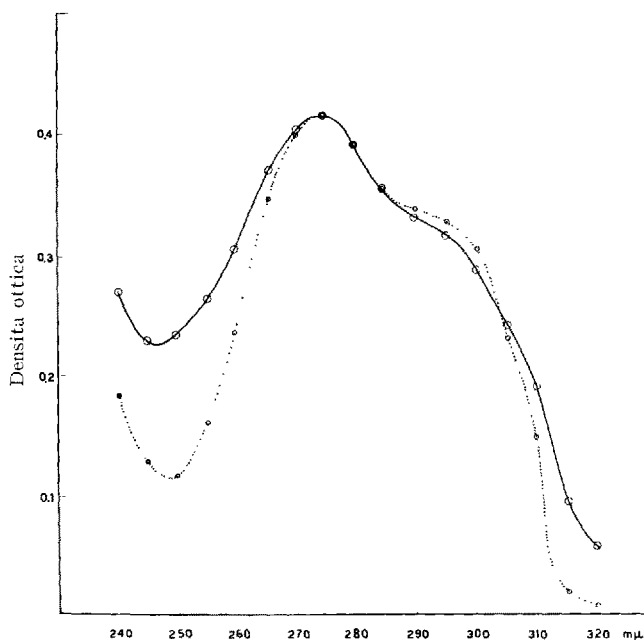


Fig. 4.-Spettri di assorbimento nell'ultravioletto di 5-OH-triptamina (linea punteggiata) e dell'eluato della porzione della striscia elettroforetica corrispondente alla macchia di 5-OH-triptamina (linea solida).

Il contenuto in 5-OH-triptamina degli estratti così preparati, calcolato dalla loro densità ottica a 2750 Å in riferimento a una soluzione standard di 5-OH-triptamina⁷, era di circa 350 μg per grammo di trombociti freschi di oca. Valori simili si ottenevano anche con determinazioni colorimetriche secondo la tecnica da noi proposta per il dosaggio quantitativo della 5-OH-triptamina nel sangue di uomo⁷.

In estratti di plasma di globuli rossi e di globuli bianchi completamente purificati dalle piastrine non è stato possibile dimostrare la presenza di 5-OH-triptamina.

In conclusione gli esperimenti riferiti dimostrano senza alcun dubbio che è possibile estrarre dai trombociti di pollo e di oca una sostanza che corrisponde perfettamente nelle sue caratteristiche chimiche spettrofotometriche e biologiche alla 5-OH-triptamina. Di conseguenza i trombociti degli uccelli, per quanto riguarda

⁶ M. B. ZUCKER, B. K. FRIEDMAN e M. RAPPORT, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 85, 282 (1954).

⁷ M. BRACCO, P. C. CURTI e V. GIULIANO, Il Farmaco 10 (1955).

il fattore vasocostrittore, devono essere considerati funzionalmente identici alle piastrine dei mammiferi.

M. BRACCO, P. C. CURTI e V. GIULIANO

*Istituto di Patologia Medica, Università di Genova, e
Laboratorio Centrale Villaggio Sanatoriale di Sondalo, il
17 giugno 1955.*

Summary

From extracts of purified bird thrombocytes, obtained by differential centrifugation of chicken and goose blood, it has been possible to separate a material which corresponds perfectly in chemical, spectrophotometric, and biological properties to 5-OH-tryptamine. Bird thrombocytes, therefore, as far as the vasoconstrictor factor is concerned, are physiologically identifiable with mammalian platelets.

La pression intrarénale chez l'homme

L'hypothèse qu'une augmentation de pression intrarénales (p.i.r.), interférant avec l'irrigation sanguine de l'organe et la formation de l'urine, puisse jouer un rôle au cours de diverses néphropathies n'a jamais été étayée par des mesures objectives. Elle est néanmoins défendue par certains auteurs¹ qui recommandent de traiter les anuries aiguës et les néphrites interstitielles chroniques par la décapsulation.

La p.i.r. globale a été mesurée chez l'animal normal par quelques investigateurs². Elle est en moyenne de 14 mm de mercure chez le lapin³ et de 21⁴ ou 25 mm⁵ chez le chien. Elle dépend de la diurèse, de la pression artériolaire, de la pression veineuse et peut-être de la pression interstitielle. Elle ne varie pas sensiblement au cours de néphropathies expérimentales comme l'intoxication au tartrate de soude, au sublimé, au ferri-cyanure de potassium, ou la glomérulonéphrite de Masugi³.

¹ U. HEIM, *Helv. chir. Acta* 21, 18 (1954). — O. SPÜHLER, *Schweiz. med. Wschr.* 1953, 145. — H. U. ZOLLINGER, *Anurie bei Chromoproteinurie* (Thieme, Stuttgart 1952).

² C. W. GOTTSCHALK, Amer. J. Physiol. 169, 180 (1952). — B. E. MILES et H. E. DE WARDENER, J. Physiol. 123, 131 (1954). — F. REUBI, C. r. Soc. hélv. Sci. nat. (sous presse). — E. G. SWANN *et al.*, J. exper. Med. 92, 625 (1950); Amer. J. Physiol. 168, 637 (1952).

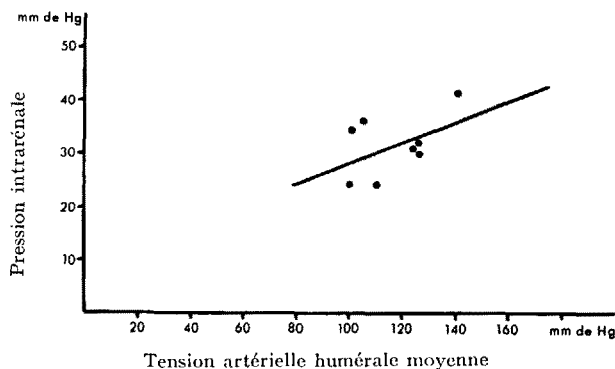
³ F. REUBI, C. r. Soc. hélv. Sci. nat. (sous presse).

⁴ B. E. MILES et H. E. DE WARDENER, *J. Physiol.*, 123, 131 (1954).

⁵ E. G. SWANN *et al.*, J. exper. Med. 92, 625 (1950); Amer. J. Physiol. 168, 637 (1952).

A notre connaissance, la p.i.r. n'avait jamais été, jusqu'ici, déterminée chez l'homme. Nous l'avons mesurée dans une première série de 8 cas en utilisant la technique suivante:

P. I. R. = 0,19 Tension artérielle moyenne + 9,0



Pression intrarénale et tension artérielle chez 8 patients.

Notre appareil se compose d'un manomètre capillaire à mercure relié par une tubulure semi-rigide à une seringue et à une aiguille à ponction lombaire. La tubulure et la seringue sont remplies de NaCl isotonique contenant 3% de Liquémine Roche. Grâce à un robinet séparateur on peut relier à volonté la seringue au manomètre ou à l'aiguille et le manomètre à l'aiguille. — Les mesures sont pratiquées sur un sujet assis, comme lors d'une ponction-biopsie du rein. La situation du rein droit a été précisée auparavant par une urographie. Après anesthésie locale, l'aiguille pourvue de son mandrin est introduite depuis l'angle costolombaire dans la direction voulue, jusqu'à ce que l'on sente une résistance élastique que l'on surmonte en enfonçant encore l'aiguille d'1-2 cm. A ce moment, le segment libre de l'aiguille décrit avec chaque mouvement respiratoire un trajet ellipsoïde caractéristique prouvant que son extrémité se trouve dans le parenchyme rénal. On retire le mandrin, on relie l'aiguille à la tubulure. On impose au manomètre une pression de 50 mm de mercure et on le met en communication avec l'aiguille. Le niveau du mercure s'abaisse alors lentement jusqu'à une certaine valeur, puis s'immobilise. Le zéro de l'appareil est obtenu en retirant complètement l'aiguille.

Les résultats obtenus chez 8 patients (Tableau) donnent des valeurs comprises entre 23,5 et 41,5 mm de mercure, sans qu'il apparaisse de différence significative entre diverses affections rénales et des reins à peu près normaux. C'est le cas en particulier de 2 anuries aiguës

Pression intrarénale chez 8 patients

N°	Age	Diagnostic	Tension artérielle mm de Hg	Azote non protéique mg%	Pression intrarénale mm de Hg
1	55	Néphroangiosclérose discrète	170/ 95	25	32
2	33	Pyélonéphrite chronique discrète	125/ 85	31	24
3	14	Glomérulonéphrite subaiguë	130/ 80	25	34,5
4	20	Glomérulonéphrite chronique	150/ 80	49	36
5	18	Glomérulonéphrite chronique	170/120	156	41,5
6	24	Anurie posttransfusionnelle	150/110	104	31
7	31	Anurie post partum	170/ 95	252	30
8	43	Pyélonéphrite hémotogène chronique	135/ 95	304	23,5 *
					24,5**

* Avant décapsulation

** Après décapsulation