

similar one another; in fact, with chromatography its sub-division into three portions can be obtained.

E. GHISLANDI

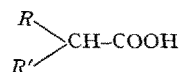
Clinica del Lavoro dell'Università di Milano, February 11, 1959.

Riassunto

Le urine di un paziente affetto da melanoma maligno sono state analizzate con la tecnica cromatografica per studiare il pigmento melanico in esse contenuto. Usando come rivelatore la *p*-dimetilaminobenzaldeide di Ehrlich sono state riconosciute tre chiazze che si ritiene di attribuire alla melanina, composto poco solubile e separabile dal resto mediante sedimentazione.

Studio farmacologico di un nuovo coleretico derivato dall'acido α -cicloesil butirrico

MAILLARD, BENARD e MORIN¹ avevano per primi notato le eccezionali proprietà coleriche di una serie di acidi la cui formula generale era:

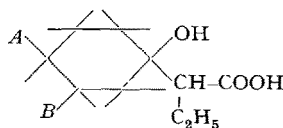


ove *R* era un nucleo ciclopentile o cicloesile tal quale o recante un gruppo metile, mentre *R'* era un alchile a basso numero di atomi di carbonio o un fenile.

I prodotti con migliore indice terapeutico si rivelarono quelli contenenti un ossidril nella posizione 1 del nucleo cicloesilico. Dal lavoro di MAILLARD *et al.*¹ risultava come l'attività dei suddetti composti aumentasse con l'introduzione del metile nel nucleo cicloesilico.

Basandoci su questa osservazione, al fine di studiare molecole recanti al nucleo cicloesilico un sostituito aromatico, abbiamo preparato i derivati con un gruppo fenilico in posizione 3 e 4 del nucleo 1-ossi-cicloesilico e *R'* = C₂H₅.

Essi sono stati ottenuti facendo reagire secondo Reformatsky rispettivamente il 3- e 4-fenilcicloesano con α -bromo-butirrato d'etile e saponificando quindi in ambiente alcalino gli esteri etilici degli α -ossi-acidi.



A = C₆H₅; *B* = H = M. G. 4833 — p. f. 157

A = H; *B* = C₆H₅ = M. G. 4834 — olio

Alcune prove di orientamento hanno dimostrato per entrambe le sostanze una notevole attività coleretica, maggiore per l'M. G. 4833; su questo composto si è perciò condotta la maggior parte degli esperimenti.

L'attività coleretica è stata indagata misurando ogni 15 min (e ogni 30 min nei ratti), il volume della bile defluita da una fistola temporanea del coledoco, incannulato con un tubicino di politene, in animali di varie specie (ratti, conigli e cani) digiuni da 12–18 h, narcotizzati con 0,25 ml/kg di una soluzione acquosa, contenente ogni 100 ml 20 g di uretano, 3 g di pentobarbital, 5 g di Dial.

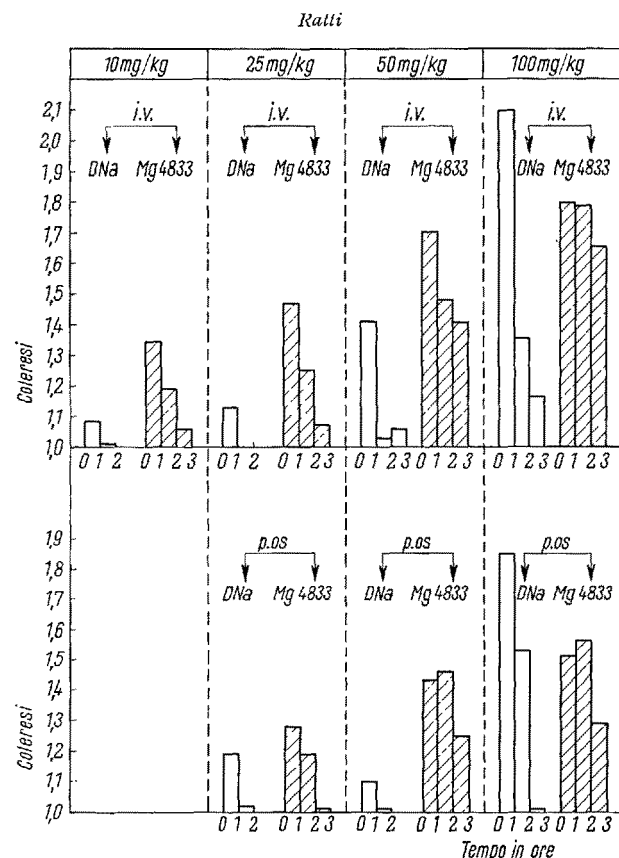


Fig. 1. Coleresi (rapporto fra il flusso biliare nelle ore successive al trattamento e il flusso biliare di controllo posto = 1). (DNa = deidrocolato sodico.)

Nei conigli e nei cani veniva pure legato il dotto cistico per eliminare un eventuale effetto delle sostanze sulla colecisti; un altro tubo di politene inserito nel moncone periferico

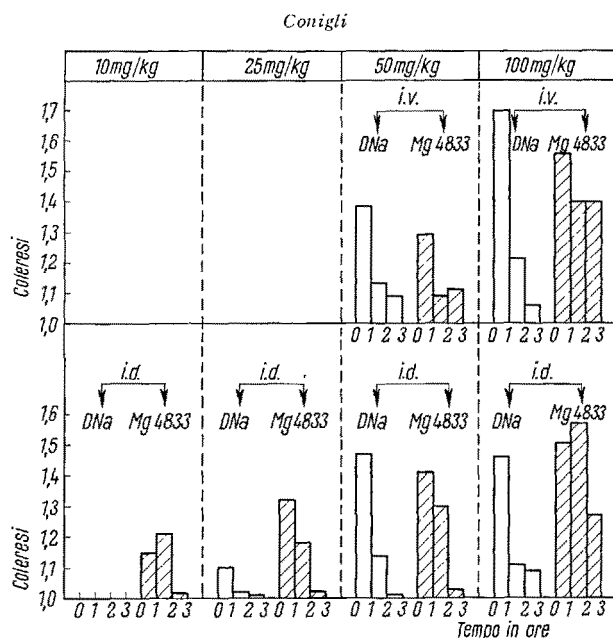


Fig. 2. Coleresi (rapporto fra il flusso biliare nelle ore successive al trattamento e il flusso biliare di controllo posto = 1). (DNa = deidrocolato sodico.) (i. d. = intraduodeno)

¹ J. MAILLARD, M. BENARD e R. MORIN, Bull. Soc. Chim. France 1958, 244.

Tabella

	Cane trattato con M. G. 4833 25 mg/kg intraduodeno		Variazione %	Cane trattato con M. G. 4833 50 mg/kg intraduodeno		Variazione %
	Prima del trattamento	Dopo il trattamento		Prima del trattamento	Dopo il trattamento	
Flusso biliare in ml	5,7 (30 min)	11	+ 92	1,75	5	+ 186
Residuo secco in % del peso di bile fresca	5,57	5	— 11	3,59	2,14	— 40
Colesterolo mg/100 cm ³ di bile . .	16,25	8,50	— 48	20,41	16,25	— 20

del coledoco verso il duodeno o una sonda gastrica applicata attraverso l'esofago nei ratti serviva per la somministrazione dei farmaci per via gastroduodenale; tutti gli animali ricevevano ogni mezz'ora per via gastrointestinale circa $\frac{1}{3}$ del volume della bile emessa e ogni ora, a partire dalla fine dell'intervento operatorio, 5 ml/kg di soluzione salina isotonica sotto cute.

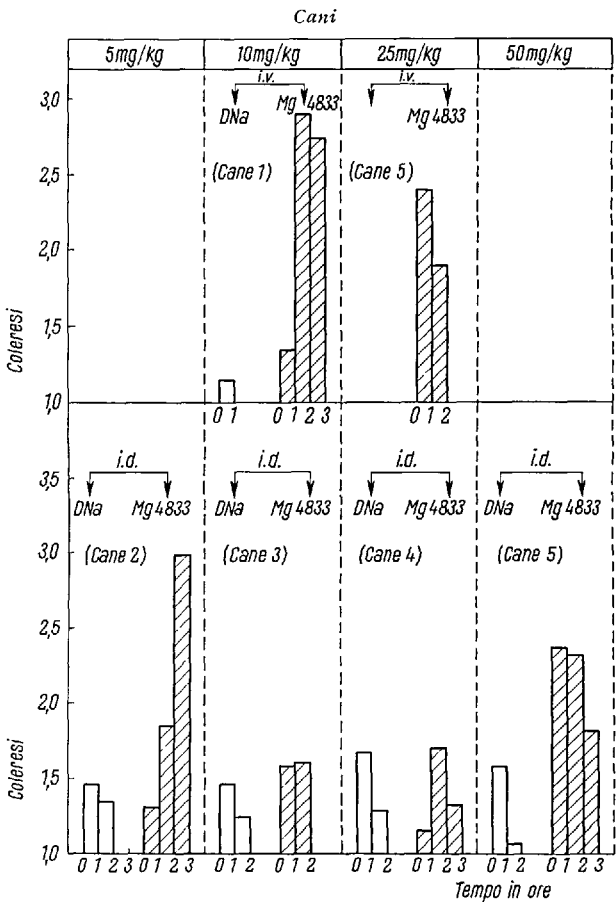


Fig. 3. Coleresi (rapporto fra il flusso biliare nelle ore successive al trattamento e il flusso biliare di controllo posto = 1). (DNa = deidrocolato sodico.) (i. d. = intraduodeno)

Il flusso biliare normale veniva controllato per almeno 2 h prima del trattamento; per ogni dose delle sostanze e tipo di trattamento vennero impiegati gruppi di 6–8 ratti e di 3–4 conigli; gli esperimenti su cani furono eseguiti complessivamente su 5 animali, mantenuti alla

stessa dieta per 8–10 giorni prima del trattamento; gli esperimenti di confronto con deidrocolato sodico vennero condotti alternando nello stesso cane dosi uguali di questa sostanza e di M. G. 4833.

L'aumento della coleresi fu riscontrato nei ratti e nei conigli da dosi di 10 mg/kg sia per via gastroduodenale che endovenosa e, nei cani, negli esperimenti finora compiuti, da dosi di 5 mg/kg. Nelle figure 1, 2, 3 i risultati sono espressi ponendo uguale ad 1 il flusso biliare di controllo per ora: da questi si rileva che l'M. G. 4833 è nettamente più attivo del deidrocolato sodico, soprattutto a basse dosi, ed ha una durata d'azione sensibilmente più lunga in tutte le specie animali studiate ed in ogni tipo di esperimento.

Per l'M. G. 4833 è stata inoltre determinata, col metodo di LITCHFIELD e WILCOXON² la DL_{50} acuta in topi albini, che risulta essere di 420 mg/kg per via endovenosa (lim. fid. per $P = 0,05$ 445–396) e 950 mg/kg per os (lim. fid. 1020–879).

L'esame istologico del fegato, rene, cuore, milza e surrene al termine di prove di tossicità prolungata, condotte su conigli trattati con 50 mg/kg per os al dì per 60 giorni, non ha rivelato alterazioni degne di nota rispetto ai controlli. Sottoponendo parte degli animali, al termine di questo trattamento, a prove di funzionalità epatica (eliminazione della bromosulfaleina) e calcolando l'indice di ritenzione secondo THOMSON³ non si sono ottenuti dati diversi dai controlli; l'indice di ritenzione percentuale essendo in tutti gli animali minore del 5%.

L'effetto coleretico è solo in parte dovuto alla diluizione della bile, poichè i dati della Tabella dimostrano come la diminuzione percentuale del residuo secco e del contenuto in colesterolo della bile sia notevolmente inferiore all'aumento percentuale del flusso biliare dopo trattamento con M. G. 4833. Ciò potrebbe significare che la sostanza esaminata favorisce anche una maggior produzione dei componenti specifici della bile da parte della cellula epatica.

In prove compiute su preparati di vescichetta isolata di cavia in bagno di liquido di Tyrode, concentrazioni di sostanza di 1:10 000 e 1:5 000/ml di liquido del bagno non provocano la minima contrazione né modificazione del tono della muscolatura liscia della cistifellea, né alterano la sua reattività di fronte a sostanze quali l'acetilcolina e il $BaCl_2$. In maniera del tutto analoga si comporta un preparato di intestino tenue di cavia.

² J. T. LITCHFIELD e F. J. WILCOXON, J. Pharm. exp. Théor. 96, 99 (1949).
³ R. A. E. THOMSON, D. B. MCKAIG e S. M. MICHAELSON, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 95, 243 (1957).

L.M.G. 4833 può quindi essere classificato fra i coleretici puri.

Ringraziamo il Sig. E. GRASSI e la D^{ssa} A. CATTANEO per la fattiva collaborazione prestata.

M. CARISSIMI, F. RAVENNA,
E. MILLA e E. GRUMELLI

Laboratori Ricerche Maggioni & C., Milano, il 16 marzo 1959.

Summary

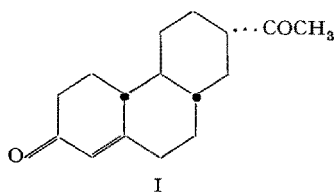
α -(1-Hydroxy-4-phenyl-cyclohexyl)butyric acid (M.G. 4833) and α -(1-hydroxy-3-phenyl-cyclohexyl) butyric acid (M.G. 4834) have been synthesized; both substances were endowed with choleretic activity.

M.G. 4833 is the more active; it acts at lower doses and for a longer time than sodium dehydrocholate on rats, rabbits and dogs submitted to temporary fistulization of the bile-duct.

Hemmung der experimentellen, testosteronbedingten Epidermisproliferation an der weiblichen Ratte durch ein synthetisches Phenanthrenderivat mit antiandrogener Wirkung

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über Angriffs-orte von Cortison führten STUDER¹ sowie STUDER und FREY² unter anderem eine Reihe von Versuchen an der proliferierenden Epidermis der Ratte durch. Sie konnten dabei zeigen, dass nicht nur Vitamin A, sondern in noch stärkerem Masse auch Testosteronpropionat die Epidermis der Versuchstiere zur Proliferation anregte. Intramuskulär verabreichte Tagesdosen von 2×40 mg/kg dieses Androgens riefen – offenbar auf Grund einer anabolen Wirkung – eine ausgeprägte Mehrschichtigkeit mit Akanthose, eine erhebliche Verbreiterung aller epithelialen Zellschichten sowie eine signifikante Vermehrung der Mitosen hervor.

Nachdem PINCUS und DORFMAN³ schon früher über Testosteronantagonisten berichtet hatten, ist es neuerdings GOLDBERG und SCOTT⁴ gelungen, ein Phenanthrenderivat mit antiandrogenem Effekt zu synthetisieren. Für diese Substanz, Ro 2-7239 (I), wurde folgende Strukturformel ermittelt:



2-Acetyl-7-oxo-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,9,10,10a-dodecahydrophenanthren.

Wie RANDALL und SELITTO⁵ feststellten, vermag dieses neue Phenanthrenderivat die durch Testosteronpropionat provozierbare Hypertrophie der Samenblase und Prostata

sowie des Musculus levator ani an der juvenilen, kastrierten Ratte zu verhindern. Die antiandrogene Wirkung von I gegenüber exogenem Testosteron wurde von DORFMAN⁶ am Hahnenkamm-Test bestätigt. Unter diesen Umständen erschien uns die Prüfung dieser chemischen Verbindung im vorhin skizzierten Modell nach STUDER sinnvoll. Als Kriterien dienten uns die Dicke der Epidermis sowie die in der Haut pro Masseinheit auftretenden Mitosezahlen.

Versuchsordnung. Um endogen produzierte Androgene als Versuchsfaktor zu eliminieren, wählten wir als Testobjekt weisse Ratten weiblichen Geschlechts aus eigener Zucht. 4 Gruppen zu je 6 Tieren im Gewicht von 110 bis 120 g erhielten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen zweimal 40 mg/kg/die Testosteronpropionat intraperitoneal verabreicht. Dazu kamen simultan folgende intraperitoneale Applikationen:

- Gruppe 1: 2×40 mg/kg Cortison –
- Gruppe 2: 2×40 mg/kg I in 25%igem Propylenglycol
- Gruppe 3: 2×20 mg/kg I in 25%igem Propylenglycol
- Gruppe 4: 25%iges Propylenglycol in adäquaten Mengen.

Weitere 6 Ratten dienten als unbehandelte Kontrollen (Gruppe 5).

Am 5. Versuchstage wurde sämtlichen Tieren zwecks Blockierung der Mitosen 1 mg/kg Colchizin subkutan verabreicht (DUSTIN-Reaktion⁷). Tötung der Tiere 9 bis $9\frac{1}{2}$ h später. Zur histologischen Untersuchung gelangte von jedem Tier ein Stück Haut aus der Rückengegend. Nach einstündiger Fixation in Susa und Einbettung in Paraffin wurden möglichst senkrecht zur Oberfläche 5 μ dicke Schnitte hergestellt und mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Im Mikroskop erfolgte dann die Messung der Epidermisdicke ohne Stratum corneum an je 20 verschiedenen Stellen mittels Okularmikrometers sowie die Auszählung der Mitosen in der Epidermis (20 Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 1:200).

Ergebnisse. Die Durchschnittswerte der Mess- bzw. Zählergebnisse sind in Tabelle I und II aufgeführt. Dieser Zusammenstellung kann entnommen werden, dass die Applikation von täglich zweimal 40 mg/kg Testosteronpropionat intraperitoneal allein (Gruppe 4) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Gruppe 5) eine beträchtliche Verbreiterung der Epidermis im Sinne einer Akanthose sowie eine erhebliche Vermehrung der Mitosen bewirkte. Beide Veränderungen sind statistisch hoch signifikant und dürfen somit als Bezugsbasis für die Interpretation der in den Gruppen 1–3 erhobenen Befunde herangezogen werden. Vergleichend ergeben sich dabei folgende Relationen:

1. Die experimentell hervorgerufene «Akanthose» wurde durch täglich 2×40 mg/kg Cortison (Gruppe 1) nicht nur gehemmt, sondern es kam darüber hinaus zu einer beträchtlichen Verschmälerung der Epidermis gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren der Gruppe 5. Dies gilt grundsätzlich auch für das Phenanthrenderivat I, wobei diese Verbindung die Proliferationswirkung von Testosteronpropionat bei gewichtsgleicher Dosierung (Gruppe 2) signifikant stärker antagonisierte als Cortison und selbst die Dosis von zweimal 20 mg/kg/Tag (Gruppe 3) noch immer einen mindestens ebenso deutlichen Hemmeffekt zeigte wie 2×40 mg/kg Cortison.

2. Gleichsinnige Tendenzen kamen auch in bezug auf die Mitoseaktivität zum Ausdruck. Während Cortison in

¹ A. STUDER, Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 8, 60 (1952).

² A. STUDER und J. R. FREY, Dermatologica (Basel) 104, 578 (1952).

³ G. PINCUS und R. I. DORFMAN, Fed. Proc. 14, 115 (1955).

⁴ M. W. GOLDBERG und W. E. SCOTT, unveröffentlicht.

⁵ L. O. RANDALL und J. J. SELITTO, Endocrinology 62, 693 (1958).

⁶ R. I. DORFMAN, Endocrinology 64, 464 (1959).

⁷ A. P. DUSTIN, C. R. Soc. Anat. 1938, 205.