

ARCHIVIO DI SCIENZE BIOLOGICHE

ORGANO UFFICIALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI BIOLOGIA SPERIMENTALE

Fisiologia - Farmacologia - Patologia sperimentale

FONDATO DA
FILIPPO BOTTAZZI

E PUBBLICATO DA
GINO BERGAMI (Napoli) - GIULIO C. PUPILLI (Bologna)
G. QUAGLIARIELLO (Napoli) - SABATO VISCO (Roma)

Vol. XXXI - 1946



BOLOGNA - LICINIO CAPPELLI - EDITORE

RICERCHE FARMACOLOGICHE SULL'ENTERAMINA. VII. ENTERAMINA E INDOLALCHILAMINE DEL VELENO DI ROSPO. Di V. ERSFAMER.

(Dall'Istituto di Farmacologia dell'Università di Roma,
diretto dal Prof. Pietro Di Mattei).

(Pervenuto in Redazione il 28 marzo 1946)

A seguito di ricerche istochimiche comparative condotte sulle cellule enterocromaffini dei Vertebrati VIALLI ed io (1) avevamo, accostandoci in ciò alle vedute di HAMPERL (2), LISON (3), CLARA (4), FEYRTER (5) e altri AA., accolta l'ipotesi della presenza nei granuli di dette cellule di una sostanza di- o polifenolica recante, verosimilmente in posizione para, una catena laterale non meglio precisabile.

Anche nelle ghiandole salivari posteriori di *Octopus vulgaris* (6) noi avevamo creduto di essere riusciti a identificare, sempre per via istochimica, una nuova localizzazione di- o polifenolica.

Le nostre opinioni sulla natura della sostanza specifica dei granuli delle cellule enterocromaffini dei Vertebrati e dei granuli delle cellule cromaffini delle ghiandole salivari posteriori di *Octopus* ci parvero confermate da tutta una serie di ricerche chimiche condotte, a mezzo di reazioni colorate e della reazione di fluorescenza, su estratti acetonicici di mucosa gastroenterica contenenti l'enteramina (7), e su estatti acetonicici di ghiandole salivari posteriori di *Octopus vulgaris*, contenenti una sostanza enteraminosimile (8).

Poichè parte dell'enteramina dimostrabile negli estratti di mucosa gastroenterica a mezzo delle reazioni chimiche colorate e della reazione di fluorescenza è sicuramente identificabile col secreto specifico dei granuli delle cellule enterocromaffini e parte della sostanza enteraminosimile rivelabile negli estratti di ghiandola salivare posteriore di *Octopus* è altrettanto sicuramente identificabile col secreto specifico dei granuli delle cellule cromaffini, così noi avevamo ritenuto logico utilizzare

¹⁾ Le prime sei note sono comparse nel Naunyn-Schmiedebergs Arch. (vedi Bibliografia, 15).

i dati dell'istochimica in appoggio a quelli offertici dalle reazioni chimiche colorate ottenute sugli estratti e, reciprocamente, questi ultimi in appoggio ai dati dell'istochimica.

I primi dubbi sui limiti di specificità e sul reale significato delle reazioni istochimiche dei granuli delle cellule enterocromaffini dei Vertebrati e delle cellule cromaffini di *Octopus* e quindi sull'attendibilità delle deduzioni che noi avevamo ritenuto di poterne trarre in merito alla natura chimica della sostanza specifica di detti granuli, vennero affacciati, a dir vero, già in un lavoro pubblicato dal VIALLI nel 1935 (9) ma solo parecchio più tardi, a seguito di ulteriori ricerche dell'A., presero solida consistenza.

Così nel 1940 il VIALLI (9) in base ai risultati di alcuni saggi chimici condotti su un campione di flavianato di bufotenidina inviatogli dal CHEN ha espressamente ammessa la possibilità che in qualche caso alcune sostanze caratterizzabili istochimicamente come di- o polifenoli secondo le vedute del LISON (3), possano invece in realtà essere sostanze del tipo della bufotenina, cioè derivati indolici.

Accogliendo queste prudenti riserve, VIALLI ed io nella nostra 1^a nota (7) sulle reazioni chimiche colorate dell'enteramina, sostenevamo l'opportunità di condurre uno studio accurato sulle reazioni colorate e sulla reazione di fluorescenza presentate da campioni di bufotenina pura di WIELAND (i flavianati allestiti da JENSEN e CHEN (11) non possono, secondo WIELAND, KONZ e MITTASCH (12) essere considerati come sostanze sicuramente unitarie) e concludevamo affermando che « qualora i risultati ottenuti con la bufotenina pura dovessero essere quali le ricerche del VIALLI sembrano indicare, non solo sarebbe necessario uno studio dei possibili rapporti fra l'enteramina e le sostanze a nucleo indolico, ma potrebbe darsi anche che le congetture sulla costituzione chimica dell'enteramina dovessero subire una parziale revisione e segnare, nello stesso tempo, un sensibile progresso ».

Per la cortesia del Prof. H. WIELAND, VIALLI (14) ha potuto saggiare chimicamente campioni di bufotenina, di bufotenidina e di bufotionina ed io ho potuto, su altri campioncini delle stesse sostanze, ripetere le prove chimiche e condurre tutta una serie di ricerche farmacologiche (13).

Scopo di questa nota vuole per l'appunto essere quello di procedere a un raffronto dei risultati ottenuti in quest'ultimo gruppo di indagini coi risultati ottenuti a suo tempo coll'enteramina (7, 15) e di giungere così a una presa di posizione più precisa in merito al problema dei rapporti tra enteramina e derivati indolici del veleno di rospo e di

conseguenza anche in merito al problema della costituzione chimica dell'enteramina.

Sarà qui evidentemente di particolare interesse il prendere in considerazione i punti di contatto e le discrepanze rilevabili, fra enteramina e indolalchilamine del veleno rospino, nei riguardi di quelle caratteristiche chimiche e farmacologiche che noi avevamo già ritenute peculiari e specifiche dell'enteramina.

A questo ci si limiterà nel presente lavoro non senza aver prima, di proposito, fatto rilevare che mentre tutti i risultati concernenti la bufotenina, la bufotenidina e la bufotionina sono stati ottenuti con sostanze pure, i risultati concernenti l'enteramina sono stati conseguiti su estratti grezzi complessi.

CARATTERISTICHE CHIMICHE.

1) *Reazione di copulazione col sale di diazonio della paramitroanilina.*

a) *Indolalchilamine del veleno di rospo.* — In ambiente acido la diazoreazione è negativa per tutte e tre le sostanze saggiate, in ambiente alcalino continua a essere negativa per la bufotionina, ma è invece intensamente positiva per la bufotenina e per la bufotenidina.

Il derivato azoico, di un bel color rosso violaceo percepibile fino a diluizioni 1/2.000.000 circa, possiede la caratteristica di essere in totalità e facilmente estraibile per dibattimento con alcool amilico (reazione di GEBAUER-FULNEGG) e di rispondere a trattamento con HCl concentrato con un forte scoloramento iniziale e un successivo rincupimento di colore e viraggio verso tonalità violacee.

b) *Enteramina.* — Il derivato azoico dell'enteramina non è in alcun modo distinguibile, né per tonalità di colore né per comportamento di fronte a dibattimento con alcool amilico e a acidificazione, dagli azoderivati della bufotenina e della bufotenidina.

2) *Reazione di ossidazione con jodato di potassio.*

Tanto la bufotenina e la bufotenidina quanto l'enteramina danno origine, per trattamento a caldo con jodato di potassio, a un bel color

violaceo. Per le due indolalchilamine la reazione è percepibile fino a diluizioni 1/100.000.

La bufotionina non dà alcuna reazione colorata.

3) Reazione di fluorescenza in luce di Wood.

a) *Indolalchilamine del veleno di rospo*. — Soluzioni di bufotionina, bufotenina e bufotenidina in acqua distillata non presentano alcuna fluorescenza in luce di Wood né immediata né tardiva. I risultati non variano acidificando anche fortemente le soluzioni.

Ben diverso è invece il comportamento delle soluzioni di bufotenina e bufotenidina in seguito a forte alcalinizzazione. Compare in questo caso una intensa fluorescenza azzurro argentea (con sfumatura verde alle diluizioni maggiori) che inizia dopo 6-10 ore, raggiunge un massimo d'intensità dopo 72 ore e persiste, pressoché invariata, persino per 3-4 settimane. La reazione è percepibile fino a diluizioni 1/2.000.000 circa.

Per la bufotionina manca, anche in ambiente alcalino, qualsiasi accenno a fluorescenza.

b) *Enteramina*. — Anche per l'enteramina la reazione di fluorescenza in ambiente acido o in ambiente neutro è presumibilmente negativa. In ambiente fortemente alcalino la sostanza presenta invece una intensa fluorescenza giallo verdastra che, come nel caso della bufotenina e della bufotenidina, compare con grande lentezza e raggiunge il massimo della vivacità solo dopo 48-72 ore, restando quindi pressoché inalterata per settimane.

Se, separatamente per la bufotenina, la bufotenidina e l'enteramina, si volesse procedere a una approssimativa comparazione della sensibilità reciproca delle varie reazioni colorate allora si potrebbe constatare che la reazione jodica ha per la bufotenina una sensibilità 20 volte minore della GEBAUER-FULNEGG, per la bufotenidina una sensibilità circa 15 volte minore e per l'enteramina una sensibilità 8-12 volte minore e che la reazione di fluorescenza è all'incirca della stessa intensità della GEBAUER-FULNEGG per la bufotenina e la bufotenidina ma è 2-3 volte più sensibile per l'enteramina. Si potrebbe cioè dimostrare che mentre per le indolalchilamine del veleno di rospo la reazione più sensibile sembra quella di GEBAUER-FULNEGG per l'enteramina la reazione più sensibile sembra essere rappresentata (con le inevitabili riserve

imposteci dall' avere a che fare con estratti tessutali bruti) dalla reazione di fluorescenza.

4) *Comportamento di fronte a trattamento con alcali e con acidi.*

Fra le ulteriori svariate caratteristiche chimiche che sono possedute in comune dalla bufotenina e bufotenidina e dall'enteramina, va segnalato in modo particolare il comportamento di fronte a trattamento con acidi e con alcali.

A questo riguardo giova però rilevare che mentre di fronte agli acidi tutte e tre le sostanze si comportano in modo pressoché identico (l'attività residua dopo 20 min di ebollizione con HCl N è per la bufotenina = 45-65 %, per la bufotenidina = 55-60 %, per l'enteramina e le sostanze enteraminosimili = 50-70 %) di fronte agli alcali bufotenina e bufotenidina sembrano essere assai più labili che non l'enteramina. Dopo 20 min di ebollizione con NaOH N, infatti, l'attività residua è per la bufotenina = 10-15 %, per la bufotenidina = < 5 % mentre per gli estratti contenenti enteramina tale attività è praticamente rimasta inalterata, cioè = 90-100 %.

Ciò appare con tutta evidenza per gli estratti privi o quasi privi di enteramina I, per i quali non sussiste la possibilità che la resistenza dell'enteramina al trattamento alcalino sia simulata da eventuali contemporanei processi di attivazione.

CARATTERISTICHE ISTOCHIMICHE.

Anche le localizzazioni istochimicamente dimostrabili dell'enteramina e delle sostanze enteraminosimili (cellule enterocromaffini dei Vertebrati, cellule cromaffini delle ghiandole salivari posteriori di *Octopus vulgaris*) e le probabili localizzazioni della bufotenina o sostanze bufoteninosimili (cellule cromaffini delle ghiandole cutanee degli anfi) presentano in comune un certo numero di caratteristiche che sono nettamente diverse dalle caratteristiche delle localizzazioni di- o polifenoliche finora sicuramente note (cellule del sistema cromaffine surrenale).

Fra esse ricordiamo soprattutto la fissabilità a mezzo di formolo, con la possibilità di ottenere sul materiale così fissato la diazoreazione, la reazione argentaffine, le reazioni colorate di ossidazione e una reazione di fluorescenza e ricordiamo anche il lento procedere della reazione cromaffine e in genere di tutte le reazioni colorate di ossidazione.

CARATTERISTICHE FARMACOLOGICHE.

1) *Azione sull'utero di ratto in estro.*

Il reattivo non risponde in alcun modo neanche a concentrazioni 10^{-5} di bufotionina o di bufotenidina; è invece assai sensibile alla bufotenina, dimostrabile fino a diluizioni 5.10^{-7} . La risposta consiste in un aumento nella frequenza e nell'ampiezza dei movimenti ritmici o nella loro comparsa se essi precedentemente mancavano e inoltre, per concentrazioni superiori, in un incremento del tono.

Anche all'enteramina l'utero di ratto in estro è notevolmente sensibile (è sicuramente attivo l'estratto ottenuto da 3-5 mg di mucosa fresca di fondo gastrico di coniglio) e la reazione è qualitativamente assai simile a quella prodotta dalla bufotenina. Con alcune nette differenze però: la risposta all'enteramina è più pronta che non quella alla bufotenina e assai più pronto è anche il ritorno dell'organo a condizioni di riposo dopo lavaggio con liquido di Tyrode fresco. Per di più la sensibilità dell'utero all'enteramina si conserva assai più a lungo che non alla bufotenina di fronte alla quale l'organo si comporta come di fronte a sostanza decisamente estranea e tossica.

A parità di intensità della reazione di GEBAUER-FULNEGG gli estratti enteraminici sembrano forniti di attività biologica superiore a quella spiegata da soluzioni di bufotenina.

2) *Azione sul duodeno di ratto.*

Sul duodeno fresco a riposo bufotenina e bufotenidina esplicano una modesta azione eccitante (percepibile, nella migliore delle ipotesi, fino a diluizioni delle sostanze $1/2.000.000-1/6.000.000$) che suole manifestarsi con un brusco, seppure spesso non immediato, aumento di tono seguito da un rilasciamento più o meno rapido. In questa fase è anche frequente la comparsa di vivaci movimenti ritmici.

La bufotionina è del tutto inattiva persino a concentrazioni $1/50.000$.

Anche verso il duodeno di ratto peraltro, in modo ancor più visibile che verso l'utero, bufotenina e bufotenidina si comportano come sostanze estranee e tossiche provocando rapidissime diminuzioni nella sensibilità e un rapido esaurimento dell'organo. Non infrequente è

anche, specialmente per la bufotenidina, il caso che l'azione eccitante sia preceduta da una fugace fase depressiva.

Diversamente stanno le cose per l'enteramina. Per questa sostanza il duodeno di ratto si rivela di una sensibilità superiore a quella dell'utero (la risposta si ha persino con l'esigua quantità di enteramina contenuta in 0,3-0,5 mg di mucosa fresca di fondo gastrico di coniglio) e l'aumento di tono è sempre pronto e immediato, mai preceduto da fasi depressive. L'organo poi, pur non costituendo certo un reattivo biologico ideale per l'enteramina come non lo è per nessun'altra sostanza, conserva assai più a lungo la sua sensibilità e non mostra fenomeni che si possano supporre di natura tachiflattica o tossica.

3) *Azione sull'intestino tenue di coniglio.*

Il reattivo risponde alla bufotenina e ancor più alla bufotenidina con aumento di tono e accentuazione dei movimenti ritmici. La sensibilità si spinge fino a diluizioni 1/100.000.000 nel caso della bufotenina, fino a diluizioni quattro volte maggiori nel caso della bufotenidina. Del tutto inefficace è, come al solito, la bufotonia, anche a concentrazioni 1/50.000.

Per ciò che concerne l'enteramina noi non possiamo per ora escludere, non disponendo della sostanza allo stato puro ma solo di estratti grezzi complessi, che essa esplichi una qualche azione eccitante sull'intestino tenue di coniglio. Per varie ragioni possiamo peraltro ritenere che detta azione debba essere, sempre naturalmente supposto che sussista, piuttosto modesta e non paragonabile come intensità a quella spiegata dalla bufotenina e dalla bufotenidina.

4) *Comportamento di fronte ad inattivazione fermentativa.*

Per trattamento con fermenti a tipo aminossidastico la bufotenina e l'enteramina vengono totalmente inattivate, la bufotenidina conserva invece inalterata la sua attività farmacologica.

CONCLUSIONI.

a) L'insieme delle reazioni chimiche colorate già considerato probativo della natura di- o polifenolica dell'enteramina, è risultato positivo anche per due derivati indolici biogeni, la bufotenina e la bufotenidina.

La reazione di fluorescenza dell'enteramina s'accosta assai più per le sue caratteristiche, soprattutto per la tardività della sua comparsa, al tipo di reazione offerto dalle indolalchilamine che non a quello presentato dall'adrenalina o altri derivati fenolici.

Se a questo aggiungiamo che anche per la sua resistenza di fronte a trattamento con alcali l'enteramina è assai più vicina ai derivati indolici che non ai derivati difenolici o polifenolici e che, viceversa, nessun particolare carattere la sostanza possiede che deponga preferibilmente per una sua natura di- o polifenolica, dobbiamo concludere che le nostre precedenti illazioni sulla probabile struttura chimica dell'enteramina debbano essere modificate.

Conclusioni definitive potranno evidentemente essere tratte solo quando si possiederà la sostanza allo stato di purezza: già fin d'ora però è lecito affermare che i dati in nostro possesso tendono ad orientarci assai più verso una derivazione indolica dell'enteramina che non verso una sua derivazione di- o polifenolica.

Le opinioni qui estrinsecate sono naturalmente applicabili non solo all'enteramina della mucosa gastroenterica [Vertebrati (7, 15) e Tunicati (23)] ma anche alle sostanze enteraminosimili della milza (15) e delle ghiandole salivari posteriori degli Octopodi (*Octopus vulgaris*, *Eledone moschata*) (8, 16) nonché alle svariate localizzazioni istochimiche dell'enteramina (cellule eterocromaffini del tubo intestinale dei Vertebrati e dei Tunicati (18), cellule enterocromaffini del timo degli Uccelli (20, 19), cellule enterocromaffini dell'ovidotto di lucertola (21) e della vescica urinaria di rana (22), cellule cromaffini delle ghiandole salivari posteriori di *Octopus vulgaris* (6) e di *Eledone moschata* (17).

b) Anche istochimicamente sussistono maggiori analogie fra enteramina e indolalchilamine del veleno di rospo che non fra enteramina e ferilalchilamine (ad es. adrenalina),

c) Oltre che da un punto di vista chimico ed istochimico l'enteramina sembra rivelare molteplici punti di contatto con la bufotenina e la bufotenidina anche da un punto di vista farmacologico: vogliamo qui specialmente alludere all'azione eccitante posseduta in comune dalle tre sostanze sugli organi isolati a muscolatura liscia.

d) Tutto quanto si è finora detto non significa però in alcun modo che l'enteramina debba o possa identificarsi con qualcuna delle indolalchilamine del veleno di rospo qui prese in esame.

Sono soprattutto i risultati della ricerca farmacologica quelli che ci

forniscono i criteri più sicuri per una precisa distinzione delle varie sostanze che ci interessano.

Basta infatti considerare, limitandoci all'utilizzazione di pochi reattivi biologici facilmente accessibili, che:

1) l'enteramina ha intensa azione eccitante sul duodeno di ratto e sull'utero di ratto in estro e modesta o nulla azione sull'intestino tenue di coniglio;

2) la bufotenina eccita modestamente il duodeno di ratto e intensamente l'utero di ratto in estro e l'intestino tenue di coniglio;

3) la bufotenidina non ha alcuna azione sull'utero di ratto in estro, eccita modestamente il duodeno di ratto e assai intensamente l'intestino tenue di coniglio;

4) la bufotionina è inattiva su tutti i reattivi biologici saggiati.

Enteramina e bufotenidina si differenziano poi nettamente tra loro per l'opposto comportamento di fronte a trattamento con sistemi fermentativi a tipo aminossidatico: l'enteramina viene infatti completamente inattivata, la bufotenidina non viene invece per nulla modificata.

Ulteriori dati in favore della natura indolica dell'enteramina sembrano scaturire anche da ricerche, in corso, su estratti alcoolici e acetonicici di ghiandola della porpora di *Murex trunculus* e *Murex brandaris*.

RIASSUNTO

L'enteramina non è distinguibile dalle indolalchilamine del veleno di rospo (bufotenina, bufotenidina, bufotionina) né a mezzo di reazioni chimiche colorate né in base a caratteristiche istochimiche. Anche dal punto di vista farmacologico esistono fra enteramina e indolalchilamine molteplici punti di contatto: ciò però non significa che, proprio per via biologica, enteramina da una parte e bufotenina, bufotenidina e bufotionina dall'altra non possano essere nettamente distinte tra loro.

In conformità dei dati di fatto qui messi in luce è ritenuta accettabile l'ipotesi di una derivazione indolica dell'enteramina.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Vialli E. e V. Erspamer - *Z. Zellforsch.*, 1933, 19, 743.
- (2) Hamperl H. - *Z. mikrosk. anat. Forsch.*, 1925, 2, 506.
- (3) Lison L. - *Archives Biol.*, 1931, 41, 344; *Histochimie animale*. Paris, Gauthier-Villars, 1936.
- (4) Clara M. - *Erg. Anat.*, 1933, 30, 240.

- (5) Feyrter F. - Ueber diffuse endokrine epitheliale Organe. Leipzig, J. A. Barth, 1938; *Erg. Pathol.*, 1934, 28, 305.
- (6) Vialli M. e V. Erspamer - *Mikrochemie*, 1938, 24, 253.
- (7) Idem, idem - Questo *Archivio*, 1942, 28, 101, 122.
- (8) Idem, idem - *Arch. di Fisiol.*, 1940, 40, 293.
- (9) Vialli M. - *Boll. di Zool.*, 1935, 6, 147.
- (10) Idem - *Ibidem.*, 1940, 11, 119.
- (11) Jensen H. a. K. K. Chen - *J. biol. Chem.*, 1930, 87, 741; *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 1932, 65, 1310; *J. Pharmacol. (Amer.)*, 1931, 43, 13; *Ibidem*, 1933, 47, 307; *Ibidem*, 1933, 49, 503, 514, 526, 541.
- (12) Wieland H., W. Konz u. H. Mittasch - *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 1931, 64, 2099.
- (13) Erspamer V. - Questo *Archivio*, 1946, 31, 62.
- (14) Vialli M. - (Ricerche in corso di stampa).
- (15) Erspamer V. - *Naunyn-Schmiedebergs Arch.*, 1940, 196, 343, 366, 391; *Ibidem*, 1942, 200, 43, 60; *Ibidem*, 1943, 201, 377; Questo *Archivio*, 1940, 26, 296.
- (16) Erspamer V. - (Ricerche in corso).
- (17) Vialli M. - *Boll. Soc. ital. Biol. sp.*, 1946, 21.
- (18) Lison L. - *C. r. Soc. Biol. Paris*, 1933, 112, 1237.
- (19) Ciaccio C. - *Boll. Soc. ital. Biol. sp.*, 1942, 17, 619.
- (20) Reggiani M. - *Ibidem*, 1946, 21.
- (21) Vialli M. e G. Ceriotti - *Anat. Anz.*, 1939, 88, 387.
- (22) Idem, idem - *Mon. zool. ital.*, 1940, 51, 29.
- (23) Erspamer V. - *Experientia*, 1946, 2.