

Inventario Nr. 650

ARCHIVIO DI SCIENZE BIOLOGICHE

(ORGANO UFFICIALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI BIOLOGIA SPERIMENTALE)

Fisiologia - Farmacologia - Patologia sperimentale

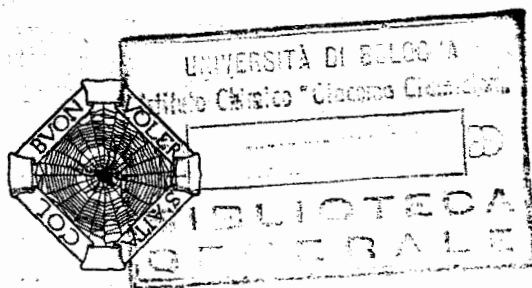
FONDATO DA

FILIPPO BOTTAZZI

PUBBLICATO DA

G. BERGAMI (Napoli) - G. QUAGLIARIELLO (Napoli) - S. VISCO (Roma).

Vol. XXVIII — 1942.



BOLOGNA - LICINIO CAPPELLI - EDITORE

**SULLE REAZIONI CHIMICHE COLORATE DELL'ENTERA-
MINA. Nota I: Ricerche su estratti acetonicici di mucosa gastro-
intestinale. Di MAFFO VIALLI e VITTORIO ERSPAMER.**

*(Dall'Istituto di Anatomia comparata della R. Università di Pavia,
diretto dal Prof. M. Vialli e dall'Istituto di Farmacologia della R.
Università di Roma, diretto dal Prof. P. De Mattei).*

(Pervenuto in Redazione il 13 agosto 1941-XIX).

Mentre ormai a buon punto possono considerarsi le nostre conoscenze sulle caratteristiche morfologiche e istochimiche e sulla distribuzione delle cellule enterocromaffini nelle varie sezioni del tubo digerente e nelle varie classi dei Vertebrati, ancora assai imprecise sono le nozioni sul significato funzionale di questo sistema cellulare, del quale, con ogni probabilità, anche altri elementi al di fuori delle cellule enterocromaffini tipiche fanno parte.

A nessun concreto risultato hanno portato le più antiche ricerche sulle modificazioni del sistema enterocromaffine in seguito a digiuno o variazioni della dieta, in seguito a somministrazione di ormoni, di vitamine, in seguito ad ablazioni di ghiandole a secrezione interna ecc. I reperti sperimentali sono stati di volta in volta negativi oppure contraddittori.

Assai più seriamente e metodicamente, basandosi peraltro sempre unicamente sullo studio, sia pure accurato, delle modificazioni numeriche e strutturali delle cellule enterocromaffini in condizioni varie di sperimentazione, il problema è stato ripreso in esame da parte della Scuola di CLARA (1, 9).

Da quanto è lecito arguire dall'insieme delle pubblicazioni sembra che CLARA tenda, in questi ultimi tempi, ad orientarsi verso la concezione che le cellule enterocromaffini rappresentino una specie di organo « svelenante » di fronte a prodotti tossici derivanti dalla degradazione della molecola proteica, fra i quali l'A. presume possa figurare anche l'istamina.

Anche noi che abbiamo portato molteplici contributi all'istochimica, alla morfologia e alla distribuzione del sistema enterocromaffine, ci siamo presto preoccupati di indagare sul significato funzionale di tale sistema.

Dopo alcune prime ricerche che ci hanno resi piuttosto scettici sulle possibilità di raggiungere qualche attendibile risultato col vecchio metodo dello studio morfologico del sistema enterocromaffine in seguito ad interventi sperimentali vari, ci siamo preoccupati di battere una nuova via più difficile, per molteplici ragioni, ma assai più promettente.

Più precisamente ci siamo proposti di allestire un estratto che contenesse la sostanza di- o polifenolica dimostrata istochimicamente nei granuli delle cellule enterocromaffini, per aver così modo di indagarne le proprietà chimiche e biologiche.

La meta prefissaci è stata da noi, almeno parzialmente, raggiunta già nel 1937 (11), dopo aver fatto precedere ai veri e propri tentativi di estrazione la ricerca del materiale più adatto, per ricchezza in enterocromaffini, per l'estrazione stessa e la ricerca, controllata istochimicamente, dei solventi più idonei allo scopo.

Partendo da raschiatura di mucosa del fondo gastrico di coniglio e servendoci di un solvente appropriato (alcol etilico o, meglio ancora, acetone) noi siamo ben presto riusciti a ottenere estratti grezzi che presentavano tutte quelle reazioni colorate (diazoreazione in ambiente alcalino, reazione jodica, reazione cromaffine, ecc.) che l'istochimica ci aveva già permesso di ottenere a livello dei granuli specifici delle cellule enterocromaffini.

L'esame, a mezzo di queste reazioni colorate di estratti di zone diverse dello stomaco di coniglio (mucosa pilorica e mucosa del fondo) e di maiale ci dimostrava l'esistenza di un soddisfacente rapporto quantitativo fra intensità delle reazioni colorate e ricchezza, da parte del tessuto estratto, in cellule enterocromaffini, dandoci con ciò una prova in favore dell'origine della sostanza di- o polifenolica dai granuli cromaffini e anche una prova della sua presenza, in quantità ben apprezzabile, negli estratti.

Queste prime ricerche, rese note in alcune comunicazioni preventive (11), vennero successivamente confermate sistematicamente ed estese in vario senso.

Abbiamo anzitutto cercato di stabilire, con appropriate ricerche

condotte su sostanze chimicamente pure, la specificità, la sensibilità e il significato delle varie reazioni colorate messe in evidenza negli estratti.

Abbiamo poi preso in considerazione e studiati con la stessa metodica, estratti di altri organi (di Vertebrati ed Invertebrati) in cui l'istochimica ci aveva documentata l'esistenza di localizzazioni fenoliche analoghe a quelle delle cellule enterocromaffini. I risultati, consegnati in precedenti lavori, sono stati, in qualche caso [estratti acetonicici di ghiandole salivari posteriori di *Octopus vulgaris* (13), estratti acetonicici di milze di mammiferi (3)] sorprendentemente simili a quelli ottenuti negli estratti di mucosa gastrica, permettendoci conseguentemente di migliorare ancora le nostre conoscenze sul significato delle varie reazioni colorate.

A questo studio chimico faceva, per i vari estratti, ben presto seguito e poi procedeva contemporaneo uno studio biologico che documentava l'esistenza, tanto negli estratti gastroenterici (4) quanto negli estratti splenici (3, 4) e negli estratti di gh. salivare posteriore di *Octopus vulgaris* (2), di nuove sostanze attive (sul circolo, sulla muscolatura liscia intestinale ed uterina) da identificarsi appunto col di- o polifenolo dimostrato nello stesso materiale estrattivo a mezzo delle reazioni chimiche colorate. Alla sostanza presente negli estratti gastrici noi abbiamo dato il nome di *enteramina*.

Dei risultati delle indagini biologiche si è tenuto, come si vedrà, molto conto nella discussione ed interpretazione dei risultati riferiti nel presente lavoro: lavoro che raccogliendo e ampiamente completando dati frammentari sparsi in nostre precedenti pubblicazioni si ripromette di dare un quadro il più possibile completo delle più importanti e significative reazioni chimiche colorate presentate dai vari estratti gastro-enterici in modo da poter sceverare tra esse alcune reazioni che, singolarmente prese o nel loro insieme, possano essere considerate caratteristiche della nuova sostanza di- o polifenolica.

Un breve capitolo riguarda i risultati dell'elettrodialisi. E nelle considerazioni generali sarà dettagliatamente trattato anche il problema dell'origine dell'enteramina presente negli estratti; problema, come si vedrà, meno semplice di quanto in un primo tempo avessimo potuto supporre.

In complesso i limiti di queste ricerche possono considerarsi come assai simili a quelli del precedente lavoro nostro sugli estratti di ghiandole salivari posteriori di *Octopus*.

I. - ALLESTIMENTO DEGLI ESTRATTI.

Dagli stomaci di 247 conigli appena uccisi e accuratamente lavati, si prelevano le zone di fondo che la sperimentazione istologica (ERSPAMER) ci ha dimostrato assai ricche di cellule enterocromaffini. Si asporta, mediante raschiatura, la mucosa ottenendosi 1297 g di materiale che viene trattato con 4500 cc di acetone puro.

Si lascia a sè il materiale per 3 giorni agitando di tanto in tanto; si separa il liquido e si spremono manualmente, attraverso garza, i frammenti di mucosa.

Si filtra. Si distilla a pressione ridotta, a temperatura fra 35° e 40°, in modo da scacciare tutto l'acetone. Il liquido sciropposo viene diluito con un po' d'acqua distillata e poi dibattuto ripetutamente, in imbuto separatore, con etere di petrolio, fino a che questo non asporti più quantità apprezzabili di grasso.

Dopo di che si tira a secco, sempre a depressione e a meno di 40° il liquido acquoso e si riprende il residuo con 30 cc di acqua distillata + 110 cc di alcool etilico 95° + 519 cc di acetone puro.

L'aggiunta dell'acetone provoca forte intorbidamento del liquido e deposito di abbondante precipitato.

Dopo 24 ore si filtra ottenendosi un liquido limpido giallastro che viene conservato in ghiacciaia e in bottiglie scure.

Ogni cc di liquido, che svaporato lascia un residuo di 6 mg, corrisponde a 2 g di mucosa.

Tutti i saggi chimici e biologici, sono stati compiuti su porzioni di questo liquido portato a secco al momento dell'uso e riprese con acqua distillata.

Con modalità identiche a quelle ora esposte si è proceduto alla estrazione di *mucosa della regione pilorica dello stomaco di coniglio* (51 g ottenuti da 23 stomaci); di *muscolatura gastrica di coniglio*; di *mucosa gastrica di cinocefalo* (stomaco interno); di *mucosa duodenale* infine di *vitello* e di *pecora*.

Anche tutti questi estratti vennero fatti in modo che 1 cc di liquido corrispondesse a 2 g di tessuto.

In altri tentativi di purificazione precedentemente compiuti è stata utilizzata una tecnica di precipitazioni frazionate che ci ha consentito di giungere a prodotti più puri di quelli qui indicati. Non si è creduto opportuno nelle presenti ricerche giungere fino alle massime purificazioni perchè le inevitabili e non costanti perdite di en-

teramina, che intervengono nelle successive precipitazioni, avrebbero compromessa la comparabilità del vasto materiale da noi studiato.

II. - REAZIONI COLORATE.

Prima di trattare analiticamente delle varie reazioni occorre far rilevare che la lettura dei risultati è stata sempre fatta subito appena avvenuta la reazione e che i paragoni fra le intensità delle reazioni nei vari estratti sono stati, a cagione della instabilità di quasi tutti i colori ottenuti, fatti senza l'aiuto del colorimetro, per semplice confronto, su sfondo bianco, fra gruppi di provette. I risultati di simili paragoni non possono, come è naturale, essere che approssimativi.

Occorre anche far rilevare che i risultati ottenuti su estratti assai grezzi quali sono quelli da noi utilizzati, vanno accolti e valutati con le riserve imposte dalla circostanza che le impurezze, come è noto, possono non solo coprire e mascherare con le loro reazioni le reazioni specifiche dell'enteramina, ma possono altresì, senza dar di per sé alcuna apprezzabile reazione, interferire nei risultati qualitativi e quantitativi dati dal nostro di- o polifenolo.

1°) Diazoreazione.

La diazoreazione classica e le sue varie modificazioni sono state eseguite con le modalità tecniche da noi indicate in lavori precedenti (12).

a) *Reazione di copulazione col sale di diazonio della paranitroanilina.* - In ambiente acido: negativa o debolmente gialla.

In ambiente alcalino: sempre positiva, ma con colori varianti dal rosso vinoso cupo (fondo gastrico di coniglio) al rosso arancio (stomaco di vitello e di maiale; muscolatura gastrica di coniglio).

In ambiente alcalino con successiva forte acidificazione con HCl: il colore s'attenua e si rischiarà sempre alle prime gocce d'acido; poi rincipisce e vira verso un viola ametista per il fondo gastrico di coniglio e lo stomaco di cinocefalo. L'estratto di stomaco di pecora, a acidificazione completa, ha colore rosso violaceo; quelli di stomaco di vitello e di maiale, di regione pilorica e muscolatura gastrica di coniglio e di duodeno di pecora rimangono di color giallo bruno o debolmente arancio.

In ambiente alcalino con successiva estrazione del colore azoico secondo GEBAUER-FULNEGG (5) dibattendo con egual volume di alcool amilico; la fase alcoolica assume tonalità di colore che variano da

un bel violaceo (fondo gastrico di coniglio) a un rosso viola (stomaco di cinocefalo e di pecora), a un rosso arancio (stomaco di vitello e di maiale) e a un giallastro debole (muscolatura gastrica di coniglio). La fase acquosa rimane più (stomaci di vitello e di maiale) o meno (stomaci di coniglio e cinocefalo) intensamente colorata in bruno.

Limitatamente agli estratti gastrici di coniglio abbiamo anche saggiata (vedi anche 12) l'estraibilità del colore azoico a mezzo di altri solventi. Così abbiamo visto che come l'alcool amilico si comporta l'alcool isobutilico, che anche il cloroformio asporta più della metà del colore assumendo una tinta rosso violacea (il liquido acquoso permane colorato al solito in bruno) che pure etere etilico, benzolo e toluolo assumono tinta rosso violacea, nettamente meno intensa peraltro di quella assunta dall'alcool amilico e isobutilico.

b) *Reazione di copulazione col sale diazonico dell'acido solfanilico.* - In ambiente acido: negativa.

In ambiente alcalino: positiva in tutti gli estratti, con colore rosso arancio che dopo poco tempo tende a virare all'arancio.

In ambiente alcalino con successiva acidificazione con HCl: si osservano modificazioni nella tonalità e intensità di colore analoghe a quelle descritte a proposito della paranitroanilina. Il viraggio al violaceo che si osserva per acidificazione dell'estratto gastrico di coniglio è peraltro meno netto.

Nella modificazione di HANKE e KOESSLER (7): positiva ovunque, con comparsa del caratteristico intenso colore violaceo. Come risulta dalla tabella la reazione è di grandissima sensibilità.

c) Nell'estratto gastrico di coniglio si è anche ricercata, con risultati negativi, la presenza di eventuali sostanze (aminofenoli, amine aromatiche) capaci di dar luogo, per azione dell'acido nitroso, alla formazione di un diazoniosale.

A 1 cc di estratto (=1 g mucosa) si aggiunge 1 goccia di n HCl. Dopo raffreddamento su ghiaccio si aggiungono 1-4 gocce di nitrito sodico n/10, pure previamente raffreddato. Si lascia a sè per 20 min. Si aggiungono 10 gocce di acido fenico 1/1000 e si alcalinizza. Non si sviluppa alcun colore apprezzabile.

2°) Reazione del Vulpian.

a) *Originale*: aggiungendo a 1 cc di estratto alcune gocce di soluzione di percloruro di ferro 1/1000 si ha comparsa di color giallo limone.

b) *Nella modificazione del Bayer*: aggiungendo al liquido sul quale è stata eseguita la reazione originale cc 0,5 di una soluzione al 0,5 % di acido solfanilico il colore giallo verde permane invariato per l'estratto gastrico di maiale e di vitello, vira al rosso bruno per il fondo gastrico di coniglio e lo stomaco di pecora e di cinocefalo.

3°) Reazione del Millon.

Per aggiunta a 1 cc di estratto di 4 gocce di reattivo e riscaldamento a 100° per qualche istante, si sviluppa un colore brunastro con sfumatura rosa nelle soluzioni più concentrate.

4°) Reazione xantoproteica.

Aggiungendo a 1 cc di estratto gastrico di coniglio (1 cc=1 g) 5 gocce di acido nitrico e scaldando si osserva la comparsa di un colore giallastro discretamente intenso.

5°) Reazione d'i Ehrlich alla dimetilaminobenzaldeide.

A 1 cc di estratto si aggiungono 10 gocce di reattivo (soluzione 1 % di dimetilaminobenzaldeide in acido solforico 1/2 concentrato) e si scalda per qualche minuto a bagno maria bollente: il liquido assume un bel color rosso viola.

6°) Reazione del Folin.

A 1 cc di estratto si aggiungono 0,5 cc di reattivo del Folin (all'acido fosfomolibdico) e 1 cc di carbonato sodico 20 %. Subito, a freddo, compare una colorazione azzurra che non sembra aumentare di intensità riscaldando a 30°.

7°) Reazione del Commessati.

A 1 cc di estratto si aggiungono 1 cc di acetato sodico 1 % e 5 gocce di soluzione satura di sublimato. Scaldando in bagno maria bollente per alcuni minuti in tutti gli estratti si formano fiocchi di precipitato. Per l'estratto di fondo gastrico di coniglio si ha un lieve imbrunimento appena apprezzabile; per lo stomaco di pecora la reazione è dubbia, e negativa è per lo stomaco di maiale e di vitello.

8°) Reazione cromaffine di Henle.

Aggiungendo a 1 cc di estratto (=1 g mucosa) 2 gocce di soluzione n di bicromato potassico si osserva dopo 30-60 min. un lieve im-

brunimento del liquido. La reazione già poco intensa per il fondo gastrico di coniglio, è dubbia o negativa per lo stomaco di pecora, di vitello e di maiale.

9°) Reazioni iodiche.

A 1 cc di estratto si aggiungono alcune gocce di una soluzione satura di iodato di potassio e qualche goccia di HCl n/100. Si pone in bagnomaria a 70°-90° per 2-5 min.

Si sviluppa per gli estratti di fondo gastrico di coniglio e, meno intensamente, per gli estratti gastrici di cinocefalo e di pecora un bel color violaceo. La reazione è bruno violacea per il duodeno di vitello e dubbia, debole imbrunimento, o negativa per gli estratti gastrici di maiale e vitello, per l'estratto di mucosa pilorica di coniglio, l'estratto di muscolatura gastrica di coniglio e l'estratto di mucosa duodenale di pecora.

Identici risultati si ottengono sostituendo all'iodato il biiodato di potassio oppure l'acido iodico.

Come una reazione iodica sensibilizzata può essere considerata quella di RUSSMANN-VIALE da noi applicata, con esito positivo, seguendo le modalità indicate da BACQ.

10°) Reazione al persolfato sodico.

Aggiungendo a 1 cc di estratto di fondo gastrico di coniglio (1 cc=1 g) 0,5 cc di persolfato sodico 1 % e scaldando a bagno maria si ottiene un debole color bruno con lieve tonalità rosea; per l'estratto di stomaco di pecora la reazione è un pò più debole, per lo stomaco di maiale e di vitello essa è negativa.

11°) Reazione del Cevidalli.

Aggiungendo a 1 cc di estratto di fondo gastrico di coniglio (1 cc=1 g) 2 gocce di ferricianuro di potassio 10 % e 4 gocce di ammoniaca si ha lieve imbrunimento del liquido. La reazione è dubbia per lo stomaco di pecora, negativa per lo stomaco di maiale e di vitello.

12°) Reazione dello Zanfognini.

Qualche goccia di reattivo dello Zanfognini, diluito 10 volte, aggiunta a 1 cc di estratto di fondo gastrico di coniglio (1 cc=1 g mucosa) provoca la comparsa di debole color brunastro con sfumatura

rossa, colore resistente all'acqua ossigenata. Dubbi sono i risultati che si hanno con l'estratto gastrico di pecora, negativi quelli ottenuti con gli estratti gastrici di vitello e di maiale.

13°) Reazione di Shaw.

Praticando sugli estratti di fondo gastrico di coniglio la reazione colorata consigliata recentemente da SHAW (8) per la messa in evidenza e la titolazione quantitativa dell'adrenalina si ottengono sicuri risultati positivi, apprezzabili ancora in liquidi che contengono, per cc, l'estratto corrispondente a 0,2-0,3 g di mucosa. Fra i saggi in cui al trattamento con acido solforoso vien fatta precedere aggiunta di idrato sodico e saggi in cui non si procede ad alcalinizzazione, non esistono apprezzabili differenze nella intensità dei colori ottenuti. Comportamento questo diverso da quello presentato da soluzioni di adrenalina pura, simile per altro a quello dell'adrenalina contenuta in estratti d'organo (SHAW).

14°) Reazione di Gerngros-Voss-Herfeld (6).

Alla soluzione in esame si aggiunge una goccia di soluzione alcoolica (1 %) di α nitroso β naftolo. Si scalda all'ebollizione. Si addizionano 1-2 gocce di acido nitrico. In tutti gli estratti si sviluppa un intenso color rosso.

15°) Reazione di Schiff per le aldeidi.

Trattando 1 cc di estratto (=1 g di mucosa) con una goccia di reattivo di Schiff si ha, dopo qualche tempo, la comparsa di un debolissimo color rosa che per l'estratto di fondo gastrico di coniglio è di intensità grossolanamente paragonabile a quella data da una soluzione di formalina 1/100.0000; per l'estratto gastrico di maiale e per quello di vitello il colore è 4-5 volte più intenso.

16°-17°) Negative sono, almeno per l'estratto gastrico di coniglio, la reazione del biureto e quella del Fehling.

III. - FLUORESCENZA DEGLI ESTRATTI IN LUCE DI WOOD.

Tutti gli estratti gastrici ed intestinali da noi studiati presentano all'esame in luce di Wood in ambiente neutro o acido, una fluorescenza bianco argentea non molto vivace e, come si vedrà in seguito, non caratteristica.

	Estratto di coniglio		
	Mucosa del fondo gastrico	Mucosa pilorica	Muscolatura gastrica
Diazoreaz. alla parantiroanilina:			
a) in ambiente alcalino	100 ($\frac{1}{16}$) rosso vinoso puro	+	+
b) in ambiente alcalino con successiva acidificazione (1)	100 ($\frac{1}{15}$)	?	—
c) secondo Geb. Fulnegg (2).	100 ($\frac{1}{24}$)	10-15	< 5
Diazoreaz. all'acido solfanilico:			
a) in ambiente alcalino	100 ($\frac{1}{100}$)	120	+
b) secondo Hanke e Koessler	100 ($\frac{1}{200}$)	120	+
Reazione all'iodato di K.	100 ($\frac{1}{6}$)	—	—
Reazioni al persolfato, del Commesati, dello Zanfognini, del Cevidalli, dello Henle	+ ($\frac{1}{1}$)	—	—
Reazione del Foltn	100 ($\frac{1}{18}$)		
Reazione del Vulpian	100 ($\frac{1}{16}$)		
Reazione del Millon	100 ($\frac{1}{8}$)		
Reazione alla dimetilaminobenzaldeide	100 ($\frac{1}{16}$)		
Reazione di Gerngros-Voss-Herfeld	100 ($\frac{1}{24}$)	125	+
Fluorescenza in luce di Wood (3)	100 ($\frac{1}{64}$) [8 ×]	30-35 [2 ×]	15 [invariata]
Attività biologica (duodeno atropinizzato di ratto).	100	10	< 1

1) È considerato positivo solo il viraggio verso i toni rossi o violacei.

2) Si tien conto, nella valutazione percentuale, solo del color rosso violaceo estratto dall'alcool amilico.

3) Fra parentesi quadra è indicato l'aumento della fluorescenza che si ha nei saggi considerati 48-72 h dopo l'alcol.

Estratto di cinocefalo Mucosa gastrica	Estratti di pecora		Estratti di vitello		Estratto di maiale Mucosa gastrica
	Mucosa dell'abomaso	Mucosa duodenale	Mucosa dell'abomaso	Mucosa duodenale	
200 rosso vinoso sporco	200 rosso vin. sporco	+	200 rosso arancio	150 rosso bruno vinoso	150 rosso arancio
70-80	50	?	?	40-50	20-30
75	50	< 10	< 20	> 60-70	< 30
250	150	+	150	+	130
250	175	+	150	+	100
75	50	-	< 20	> 50	20
+	+ -	-	-	+	-
	100		30-35		20
	100		100		200
125	100		75		50
	60		50		50
150	30-35	+	30-35	+	25
70-80 [6-7 ×]	50 [4-5 ×]	10 [invariata]	30 [2 ×]	50 [4 ×]	30-35 [2-3 ×]
70	50	5-7	15-20	85-90	20-25

alcalinizzazione in confronto degli stessi saggi considerati subito dopo l'alcalinizzazione.

Alcalinizzando gli estratti (0,1 cc di NaOH 5 n per ogni cc di estratto) la fluorescenza bianco-argentea ora descritta si attenua in un primo tempo notevolmente. Solo in un secondo tempo, dopo varie ore, essa ricomincia ad aumentare, assumendo una tonalità giallo verdastra e continua ad intensificarsi per raggiungere dopo 48-72 h un massimo di vivacità che conserva poi, quasi inalterata, per 7-10 giorni. Unicamente per l'estratto di muscolatura gastrica di coniglio manca, dopo alcalinizzazione, qualsiasi accenno a tardivo aumento nell'intensità della fluorescenza.

Alla esposizione delle modalità con cui sono state eseguite le varie reazioni e dei risultati ottenuti crediamo utile far seguire una tabella riassuntiva. Per molti estratti viene in essa indicata (espressa in % in rapporto all'estratto di fondo gastrico di coniglio arbitrariamente considerato di valore uguale a 100) la intensità relativa delle varie reazioni colorate e della reazione di fluorescenza comparativamente all'intensità della loro attività biologica. Questo allo scopo di permettere di sceverare, tra le varie reazioni colorate, quelle caratteristiche dell'enteramina.

Per dare un'approssimativa idea della sensibilità delle reazioni è inoltre indicata, tra parentesi e solo per l'estratto di fondo gastrico di coniglio, la diluizione massima dell'estratto (di cui 1 cc = 1 g di mucosa) a cui la reazione è ancora apprezzabile.

IV. - COMPORTAMENTO DEGLI ESTRATTI ALL'ELETTRODIALISI.

Si è utilizzato un piccolo apparecchio a elettrodi di grafite e a membrane di collodion. Nella camera mediana si introduce il residuo secco corrispondente a 40 g di mucosa gastrica di coniglio, ripreso con 20 cc di miscela tampone fosfatica a pH 7,4; nelle camere laterali si introducono 40 cc di acqua bidistillata e qualche cristallo di cloruro sodico. Si fa passare una corrente continua di 250 Volta, avente una intensità (mantenuta costante a mezzo di resistenza) di 0,8 Ampère. Dopo 10 min (il liquido si è scaldato a 35-40°) si prelevano campioni (10 cc) da tutte le camere e si interrompe il passaggio della corrente.

Diazoreazione alla paranitroanilina.

Liquido anodico: negativa.

Liquido mediano: positiva rosso ciliegia.

Liquido catodico: positiva brunastra.

Nel mentre l'alcool amilico asporta il colore rosso dal liquido mediano questo non avviene per il colore brunastra assunto dal liquido catodico.

Reazione di fluorescenza (48 h dopo alcalinizzazione).

Liquido anodico: negativa.

Liquido mediano e catodico: positiva con netto color verdastro e di intensità all'incirca uguale.

Attività biologica sull'utero di ratto in estro (eseguita dopo neutralizzazione dei liquidi catodico ed anodico).

Liquido anodico: privo di attività biologica.

Liquidi mediano e catodico: forniti della caratteristica azione eccitante sul tono uterino.

Questi reperti, del tutto analoghi a quelli precedentemente riscontrati per gli estratti di ghiandola salivare posteriore di *Octopus vulgaris*, dimostrano che a pH 7,4 l'enteramina tende a migrare al catodo. Nella camera catodica la sostanza sembra peraltro, presumibilmente per la notevole alcalinità del mezzo, subire cospicue alterazioni (modificazioni della diazo alla paranitroanilina).

Risultati analoghi si sono ottenuti riprendendo il residuo secco con acqua bidistillata invece che con miscela tampone fosfatica a pH 7,4.

V. - CONSIDERAZIONI GENERALI.

1) I risultati di tutto l'insieme delle reazioni colorate dianzi elencate ci consentono di affermare che negli estratti di mucosa gastrica ed intestinale da noi studiati è presente una sostanza di o polifenolica finora sconosciuta. L'insieme delle reazioni chimiche colorate non permette di differenziare questa sostanza da quella che noi precedentemente abbiamo riscontrato e descritto negli estratti acetonicici di ghiandola salivare posteriore di *Octopus vulgaris*; è pertanto da ritenersi che essa abbia con questa una grande rassomiglianza di costituzione.

Nessuna delle reazioni colorate da noi saggiate è, presa singolarmente, caratteristica per la nuova sostanza e nessuna, singolarmente presa, può permetterci di fare delle illazioni sulla sua natura chimica.

Caratteristiche della nuova sostanza e indicatrici della sua costituzione chimica sono invece da una parte la contemporanea e parallela positività di più reazioni (diazoreazione, reazioni di ossidazione, reazione di fluorescenza) e d'altra parte le peculiari caratteristiche di tali reazioni: negatività della diazoreazione in ambiente acido, positività della diazoreazione in ambiente alcalino, comportamento del colore azoico per forte acidificazione con HCl, comportamento del colore azoico nel dibattimento con alcool amilico; caratteristiche della reazione iodica e delle altre reazioni di ossidazione, caratteristiche del tutto particolari della reazione di fluorescenza.

2°) Solo le sostanze di- o polifenoliche, fra tutte le sostanze biogene sinora note, sembrano poter dare contemporaneamente le tre reazioni che noi consideriamo proprie della nuova sostanza: diazoreazione in ambiente alcalino con viraggio del colore per successiva acidificazione con HCl, reazione iodica (o altra equivalente reazione di ossidazione) reazione di fluorescenza in ambiente alcalino.

Che queste tre reazioni (o gruppi di reazioni) siano dovute ad un'unica sostanza è reso del tutto verosimile da varie considerazioni:

a) dal fatto che, in tutti gli estratti gastrici ed intestinali studiati, i rapporti tra l'intensità delle varie reazioni sono relativamente costanti;

b) dal fatto che (questo vale per la diazoreazione e per le reazioni di ossidazione) l'aver praticato prima una delle reazioni impedisce, su uno stesso estratto, la riuscita dell'altra reazione o la modifica profondamente;

c) dal fatto che tanto la diazoreazione quanto la reazione iodica sono, ciascuna di per sé, capaci di distruggere totalmente l'attività biologica degli estratti, dimostrando con ciò che tale attività è legata ad una sostanza che dà contemporaneamente la diazoreazione e la reazione iodica (ERSPAMER, 4);

d) dal fatto infine che i granuli delle cellule enterocromaffini, da cui dobbiamo presumere derivi, almeno in parte, la sostanza di- o polifenolica presente negli estratti, danno contemporaneamente le varie reazioni colorate e sono fluorescenti in luce di Wood.

3°) La nuova sostanza di- o polifenolica presente negli estratti gastrici od intestinali è con notevole facilità differenziabile da tutte le sostanze monofenoliche finora note nell'organismo animale.

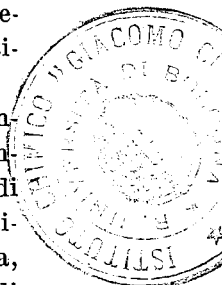
Dalla *tirosina* e dalla *tiramina* infatti l'enteramina è nettamente distinguibile per le reazioni di ossidazione e la reazione di fluorescenza, positive per l'enteramina, negative per la tiramina e la tirosina.

Più problematica è la distinzione dall'*adrenalina* e ciò non tanto quando si abbia a che fare con estratti che contengano o solo enteramina o solo adrenalina (diazoreazione alla paranitroanilina di color rosso vinoso per l'enteramina, bruno verdastro per l'adrenalina; fluorescenza immediata dopo alcalinizzazione per l'adrenalina, assai tardiva per l'enteramina; oltre a questo diverse tonalità di colore delle reazioni di ZANFROGNINI, COMMESATI, CEVIDALLI, ecc. e diverso comportamento della reazione di SHAW) quanto nell'eventualità che si abbia a che fare con estratti che contengano contemporaneamente le due sostanze. In questo caso può infatti essere difficile o impossibile svelarne la presenza o sceverare quanto di una reazione spettati all'una e quanto all'altra sostanza.

Uno di noi (ERSPAMER) ha già insistito, basandosi sulle caratteristiche delle reazioni biologiche, sulla stretta parentela, forse anche identità che deve esistere fra sostanza o di- o polifenolica degli estratti di mucosa gastrica e quella di- o polifenolica degli estratti di ghiandola salivare posteriore di *Octopus vulgaris*.

Le reazioni chimiche colorate, la reazione di fluorescenza, i risultati dell'elettrodialisi non permettono, neppure essi, di rilevare alcuna apprezzabile differenza né di ordine qualitativo né d'ordine quantitativo fra le due sostanze fenoliche, circostanza che pure depone in favore di una loro stretta affinità chimica.

Sarebbe forse opportuno anche di cercare di stabilire i caratteri differenziali della enteramina rispetto ai veleni di tipo bufoteninico dei rospi e ai veleni a caratteristiche reazionali assai simili a queste che si trovano in altre specie di anfibii. Infatti uno di noi (VIALLI, 14) ha potuto ottenere sul veleno secco di *Bufo vulgaris* una serie di reazioni colorate assai vicine a quelle dell'enteramina. In un successivo lavoro VIALLI (15) ha potuto studiare alcune reazioni del flavianato di bufotenidina e ha considerato la possibilità che in qualche caso alcune sostanze caratterizzabili istochemicamente come di- o polifenoli, secondo le vedute di LISON, possono invece in realtà essere sostanze del tipo della bufotenina (5 ossiindoliletildimetilamina). A rendere più sicure tali vedute occorrerebbe lo studio, che non ha ancora potuto essere fatto, della bufotenina pura; in mancanza di ricerche in questo senso non è possibile stabilire dei validi criterii distintivi; ci pare



però fin da questo momento necessario prospettare il problema dei possibili rapporti di questa sostanza colla enteramina. È certo che qualora i risultati sulla bufotenina dovessero essere quali le ricerche di VIALLI sembrano indicare non solo sarebbe necessario uno studio dei possibili rapporti tra la enteramina e le sostanze a nucleo indolico, ma potrebbe darsi anche che le nostre congetture sulla presumibile costituzione chimica della enteramina dovessero subire una parziale revisione e segnare nello stesso tempo un sensibile progresso.

4°) Le reazioni colorate da noi applicate allo studio degli estratti gastrici sono, come si è visto, abbastanza numerose. E quasi tutte sono state eseguite comparativamente su estratti gastrici di coniglio, di pecora, di cinocefalo, di vitello e di maiale. Contemporaneamente tutti questi estratti vennero anche saggiati farmacologicamente con i reattivi biologici specifici per l'enteramina (duodeno atropinizzato di ratto, utero atropinizzato di ratto in estro) per indagare i rapporti esistenti tra le varie reazioni colorate ed attività biologica e poter così stabilire quali delle reazioni colorate fossero ascrivibili all'enteramina e quali non lo fossero.

Da questa serie di paragoni fra le varie reazioni chimiche colorate degli estratti e fra reazioni chimiche colorate e reazioni biologiche noi ci siamo formata la convinzione, pienamente avvalorata del resto anche dalle nostre precedenti ricerche sugli estratti delle ghiandole salivari posteriori di *Octopus vulgaris*, che negli estratti gastro-intestinali da noi esaminati possano essere considerate come dovute all'enteramina le seguenti reazioni colorate:

a) la diazoreazione alla parantiroanilina in ambiente alcalino, purchè la tonalità di colore sia rosso vinoso. Lo stesso dicasi del viraggio del colore rosso vinoso all'ametista quando si acidifichi fortemente il colore azoico ottenuto in ambiente alcalino. E dovuto alla enteramina riteniamo soprattutto il colore violaceo estratto per dibattimento con alcool amilico o con altri solventi analoghi;

b) tutte le reazioni di ossidazione (iodiche, cromaffine, al persolfato, del CEVIDALLI, del COMMESSATI, dello ZANFROGNINI) fra le quali preferibile, per la sua semplicità e relativa sensibilità, ci sembra la reazione violacea all'iodato di potassio;

c) la tardiva fluorescenza verdastra che compare dopo alcalinizzazione.

All'enteramina è presumibile sia poi dovuta, almeno in parte,

anche la reazione del VULPIAN (originale e nella modificazione del BAYER), la reazione del MILLON, la reazione del FOLIN, la reazione alla dimetilaminobenzaldeide.

L'intensità di queste reazioni non si rivela peraltro proporzionale, nei vari estratti, a quella delle altre reazioni colorate dianzi ricordate nè a quella dell'attività biologica. La qual cosa non ci permette di accogliere le reazioni in parola per la messa in evidenza dell'enteramina e tanto meno poi per apprezzamenti quantitativi.

La laboriosa reazione di SHAW, praticata solo sugli estratti di coniglio, è stata per la sua scarsissima sensibilità subito abbandonata senza cercar di approfondire se essa sia dovuta (come sembra probabile), o meno, unicamente all'enteramina.

La diazoreazione all'acido solfanilico è certamente imputabile in parte all'enteramina (la copulazione col diazoniosale dell'acido solfanilico basta infatti a inattivare totalmente l'enteramina [ERSPAMER]) ma è altrettanto sicuro che essa è data negli estratti da molte altre sostanze. Basta confrontare la tabella per rendersi conto della mancanza di qualsiasi parallelismo fra intensità della diazo all'acido solfanilico, intensità delle altre reazioni colorate caratteristiche dell'enteramina e attività biologica degli estratti.

Per le stesse ragioni ora portate noi, almeno nello studio di estratti bruti d'organo, non possiamo attribuire alcun particolare significato alla diazoreazione modificata secondo HANKE e KYESSLER. Nella sensibilissima reazione noi avevamo in precedenti lavori, quando mancavamo ancora del sussidio dei controlli biologici, creduto di poter trovare un delicato mezzo per la messa in evidenza dell'enteramina. Ma estese ricerche di controllo eseguite sia su sostanze fenoliche pure sia su svariati estratti d'organo privi, all'esame biologico, di enteramina ci inducono a modificare le nostre opinioni ed ad abbandonare per ora almeno questa reazione che in base agli elementi attualmente in nostro possesso non possiamo fondamentalmente ritenere ascrivibile all'enteramina.

Sempre in base a considerazioni analoghe a quelle finora svolte e anche in base a dati forniti dagli Autori stessi che hanno proposto la reazione (nessuna sostanza pura di- o polifenolica è in grado di darla) dobbiamo ritenere estranea all'enteramina anche la reazione di GERNGROSS-VOSS-HERFELD che d'altra parte sembra negativa negli estratti a più alto grado di purificazione da noi allestiti. Prive di qualsiasi particolare valore diagnostico sono poi naturalmente la reazione xantoproteica, la reazione di SCHIFF, la reazione di FEHLING

e la reazione del biureto aventi solo il significato di indici grossolani dello stato di purificazione degli estratti studiati.

5) Precedentemente noi abbiamo riconosciuto come caratteristiche dell'enteramina alcune reazioni colorate e la reazione di fluorescenza. Ripetiamo ancora una volta che solo la contemporanea riuscita delle varie reazioni con le tonalità di colore di volta in volta designate può permetterci di diagnosticare la presenza di enteramina.

Diagnosi che sarà relativamente facile in estratti ricchi di enteramina e poveri di impurezza, ma che sarà assai più difficile e talvolta impossibile, senza l'aiuto dei metodi biologici, in estratti poveri di enteramina o ricchi di impurezze che con le loro reazioni colorate o la loro fluorescenza possono mascherare le reazioni proprie della enteramina.

Su questo argomento che coinvolge l'essenziale problema dei limiti di applicabilità delle reazioni colorate nella determinazione qualitativa e quantitativa dell'enteramina ritorneremo dopo l'esposizione delle ricerche di controllo condotte sugli estratti degli organi e tessuti più svariati.

6) Il comportamento della sostanza di- o polifenolica specifica di fronte all'elettrodialisi (migrazione al catodo); la facile estraibilità del colore azoico formatosi in ambiente alcalino a mezzo dei vari solventi organici; la analoga estraibilità di parte almeno della sostanza per dibattimento con solventi organici di sue soluzioni alcaline e la scarsa o mancata estraibilità per dibattimento di sue soluzioni acide, sono dati di fatto che parlano in favore della natura basica della nuova sostanza di- o polifenolica.

I risultati di indagini condotte da uno di noi (ERSPAMER) inducono a ritenere del tutto probabile la presenza, in una o più catene laterali del nucleo aromatico, di uno o più gruppi aminici di importanza fondamentale per l'esplicazione dell'attività biologica della sostanza.

Queste ragioni e la circostanza che la nuova amina biogena è stata ritrovata per la prima volta in estratti di mucosa gastroenterica giustificano la denominazione di *enteramina*, già da tempo proposta da noi per la sostanza di- o polifenolica.

7) Dopo le nostre prime indagini condotte su estratti gastrici di coniglio (regione del fondo e regione pilorica) e di maiale, noi ave-

vamo creduto di poter ritenere che la sostanza di- o polifenolica da noi messa in evidenza negli estratti con reazioni analoghe a quelle utilizzate istochimicamente per lo studio delle cellule enterocromaffini non potesse che derivare da queste ultime. Per le due zone di stomaco di coniglio e per il maiale noi infatti avevamo potuto rilevare un soddisfacente rapporto quantitativo fra numero di cellule enterocromaffini e intensità di reazione degli estratti.

I risultati delle indagini attuali ci obbligano a modificare le nostre precedenti opinioni ed a ritenere del tutto probabile che negli estratti gastrici, o almeno in quelli di alcune specie animali, esista accanto ad una frazione di enteramina estratta dai granuli istochimicamente dimostrabili delle enterocromaffini, anche una frazione di enteramina, che può essere anche quella di gran lunga più cospicua, di cui ci sfugge la origine istologica.

Che parte dell'enteramina degli estratti gastrici provenga dalle cellule enterocromaffini non ci sembra che possa esser messo in dubbio quando si consideri che enteramina e granuli delle enterocromaffini presentano le stesse reazioni colorate e la stessa fluorescenza in luce di Wood (piccole differenze nelle tonalità di colore sono spiegabili considerando il fatto che le reazioni istochimiche sulle cellule enterocromaffini vengono praticate dopo fissazione formolica) e quando si consideri che dopo trattamento dei frammenti gastrici freschi con alcool o acetone (i solventi da noi utilizzati per l'allestimento dei nostri estratti) le cellule enterocromaffini non sono più identificabili che come elementi vacuolizzati, privi di qualsiasi traccia di sostanza specifica, che logicamente quindi dobbiamo ritenere passata in alcool o acetone.

Che poi un'altra parte dell'enteramina non derivi dalle cellule enterocromaffini è pure reso del tutto verosimile dal paragone ad es. fra ricchezza in enterocromaffini della mucosa gastrica di pecora e di coniglio e ricchezza in enteramina degli estratti gastrici sempre di pecora e di coniglio. L'estratto di abomaso di pecora, contiene, come dimostrano concordemente le varie reazioni colorate e la reazione di fluorescenza, all'incirca la metà dell'enteramina contenuta in estratti ricavati da pesi corrispondenti di mucosa del fondo gastrico di coniglio.

Orbene: nel mentre il fondo gastrico di coniglio è ricchissimo di enterocromaffini, la mucosa dell'abomaso di pecora ne è invece piuttosto povera; certamente assai più povera di quanto, anche nei limiti di una cautissima valutazione, ci sarebbe da attendersi dai risultati chi-

mici e biologici che si ottengono sugli estratti. Questo almeno a quanto risulta da ricerche concordanti di TEHVER (10) e nostre, condotte su numerosi lembi di varie zone gastriche. Da tenersi anche presente il fatto che le cellule enterocromaffini della pecora appaiono spesso, a differenza di quelle del coniglio, assai povere in granuli cromaffini e a reazioni istochimiche meno intense.

A meno quindi di non voler dar qualche peso alla veramente poco plausibile ipotesi che tanto a noi quanto a TEHVER sia sfuggita, nell'abomaso di pecora, qualche ristretta ricchissima localizzazione di cellule enterocromaffini, noi dobbiamo ritenere che una gran parte dell'enteramina presente negli estratti gastrici di pecora origini da elementi della mucosa istochimicamente non definibili.

Al concetto di una frazione di enteramina istochimicamente non rilevabile dovremo, del resto, come si vedrà, di nuovo ricorrere a proposito dei risultati che si ottengono sugli estratti splenici.

8) La negatività delle reazioni chimiche colorate caratteristiche dell'enteramina sugli estratti di muscolatura gastrica di coniglio dimostra che l'enteramina è contenuta solo nella tunica mucosa del tubo gastro enterico.

RIASSUNTO.

Completando e allargando proprie ricerche precedenti, gli AA. dimostrano, per via chimica, la presenza, in estratti acetonicici di mucosa gastro-enterica di mammiferi, di una nuova sostanza di- o polifenolica, denominata *enteramina*. Di questa sostanza vengono descritte varie reazioni colorate che, nel loro insieme, possono essere considerate caratteristiche e come tali utilizzabili per ricerche qualitative e quantitative. Discutendo poi sulla presumibile origine dell'enteramina, gli AA. dimostrano che la sostanza può derivare non solo dalle cellule enterocromaffini ma anche da altri elementi, istochimicamente non definibili, della mucosa gastro-enterica.

ZUSAMMENFASSUNG.

Eigene frühere Versuche werden erweitert und ergänzt. Es wird chemisch bewiesen, dass Acetonextrakte der Magen-Darmschleimhaut von Säugetieren einen bisher unbekanntes Di- oder Polyphenolstoff (das *Enteramin*) enthalten.

Verf. beschreiben eine Reihe von chemischen Farbreaktionen, welche, alle zusammen, für die neue Substanz als charakteristisch angesehen werden können und darum für qualitative und quantitative Versuche anwendbar zu sein erscheinen. Was die wahrscheinliche Herkunft des Enteramins betrifft, so beweisen Verf., dass die Substanz nicht nur aus den sogenannten enterochromaffinen Zellen herkommen kann, sondern auch aus anderen histochemisch nicht darstellbaren Elementen der Magen-Darmschleimhaut.

RÉSUMÉ.

En complétant et étendant leurs précédentes recherches, les AA. démontrent, par voie chimique, la présence, dans les extraits acétoniques de muqueuse gastro-entérique des mammifères, d'une nouvelle substance di- ou polyphénolique, l'*enteramine*. De cette substance ils décrivent plusieurs réactions colorées que, dans leur ensemble, peuvent être considérées caractéristiques et pourtant utilisables pour recherches qualitatives et quantitatives.

À l'égard de l'origine de l'*enteramine*, les AA. démontrent que la substance peut dériver non seulement des cellules entérochromaffines mais aussi d'autres éléments histochimiquement pas définibles de la muqueuse gastro-entérique.

SUMMARY.

The AA., completing and extending previous personal researches, demonstrate chemically in the acetone extracts of the gastrointestinal mucosa of mammals the presence of a new di or polyphenolic substance, denominated *enteramine*.

The various staining reactions of this substance are described by them, which on the whole can be considered characteristic for it, and as such used in the qualitative and quantitative investigations.

The AA., discussing the presumable origin of the *enteramine*, demonstrate that it can derive not only from the enterochromaffine cells, but from other elements of the gastrointestinal mucosa, not defined histo-chemically.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Clara M. - *Anat. Anz.*, 1936-1937, **83**.
- (2) Erspamer V. - *Questo Archivio*, 1940, **26**, 295.
- (3) Idem - *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, 1940, **15**, 828.
- (4) Idem - *Arch. exp. Path. Pharmak.*, 1940, **196**, 343, 366, 391.
- (5) Gebauer-Fulnegg E. - *Zeit. f. physiol. Chem.*, 1930, **191**, 222.
- (6) Gerngros O., K. Voss und H. Herfeld - *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1933, **66**, 435.
- (7) Hanke M. T. and K. K. Koessler - *J. biol. Chem.*, 1922, **50**, 235.
- (8) Shaw F. H. - *Biochemic. J.*, 1938, **32**, 19.
- (9) Schumann G. - *Dtsch. Zeit. f. Verd. u. Stoffw. Krank.*, 1939, **2**.
- (10) Tehver J. - *Z. mikrosk.-anat. Forsch.*, 1930, **21**, 462.
- (11) Vialli M. e V. Erspamer - *Boll. Soc. med.-chir. Pavia*, 1937, **51**, 357, 365.
- (12) Idem, Idem - *Arch. di Fisiol.*, 1939, **39**, 1, 20, 33.
- (13) Idem, Idem - *Ibidem*, 1940, **40**, 293.
- (14) Vialli M. - *Ibidem*, 1939, **38**, 565.
- (15) Idem - *Boll. di Zool.*, 1940, **11**, 119.