

ARCHIVIO DI SCIENZE BIOLOGICHE

(ORGANO UFFICIALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI BIOLOGIA SPERIMENTALE)

Fisiologia - Farmacologia - Patologia sperimentale

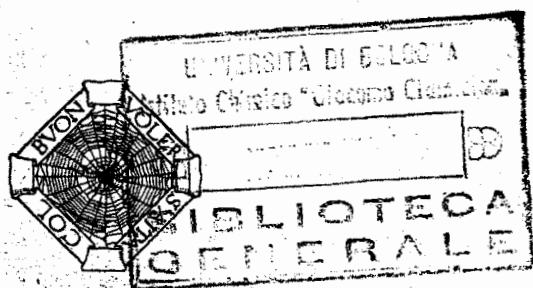
FONDATO DA

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'ENTERAMINA. Nota II: Presenza di sostanze enteraminosimili al di fuori della mucosa gastro-intestinale. Di MAFFO VIALLI e VITTORIO ERSPAMER.

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

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

L'applicazione di tutto un insieme di reazioni chimiche colorate ci ha permesso, in un precedente lavoro, di individuare, negli estratti di mucosa gastrica ed intestinale di vari mammiferi, una nuova sostanza di- o polifenolica, da noi denominata *enteramina*. Di tale sostanza precisavamo anche il comportamento di fronte all'elettrodialisi.

L'esame comparativo e la valutazione critica dei risultati ottenuti con le svariate reazioni nei diversi estratti gastro-intestinali ci faceva considerare come caratteristico dell'enteramina questo insieme di reazioni colorate:

a) la diazoreazione alla paranitroanilina con le seguenti particolarità: negatività in ambiente acido, positività in ambiente alcalino con colore rosso vinoso virante all' ametista per forte acidificazione con HCl; colore rosso vinoso estraibile per dibattimento con alcool amilico o butilico;

b) reazione iodica (iodato di K) di colore violaceo;

c) fluorescenza giallo-verdastra manifestantesi tardivamente (24-72 h) dopo alcalinizzazione del liquido.

In possesso di questo gruppo di reazioni discretamente sensibili ci siamo preoccupati subito di indagare sulla presenza di enteramina in altri organi al di fuori del tubo gastro-enterico e questo ancor più dopo che noi avevamo ritenuto di dover ammettere la possibile esistenza della sostanza in condizioni tali da poter sfuggire alla indagine istologica e quindi anche in possibile indipendenza dalle cellule

enterocromaffini; elementi che in un primo tempo ritenevamo gli unici depositari della enteramina.

Tutte le nostre attuali ricerche, come già le precedenti, sono state condotte parallelamente a ricerche biologiche di uno di noi (ERSPAMER).

MATERIALE SOTTOPOSTO AD ESTRAZIONE.

Vennero sottoposti ad estrazione acetonica (per le modalità di tale estrazione si veda il nostro precedente lavoro oppure i lavori di ERSPAMER).

1°) *Milza* di bue (bue I=1200 g; bue II=549 g; bue III=115 g), di vitello (40 g.), di coniglio (92 g=68 milze), di gatto (10,75 g), di cane (50 g), di cavallo (cavallo I=25 g; cavallo II=67 g), di maiale (83 g), di pecora (57 g), di ratto (15,2 g=15 milze), di piccione (3,16 g=19 milze), di cinocefalo [*Macacus cynomolgus*] 13,7 g=3 milze] e di uomo (150 g, milza di una donna di 62 anni morta per apoplezia; prelievo dell'organo 6 ore dopo la morte).

2°) *Surrenale* di bue e di cavallo.

3°) *Fegato* di bue, coniglio, ratto, gatto e piccione; *pancreas* di bue, cane ed asino; *polmone* di bue, coniglio, cavallo e gatto; *cuore* di coniglio, cavallo e gatto; *rene* di ratto, coniglio, cavallo e gatto; *cervello* di coniglio e gatto; *muscolatura striata* di ratto e di gatto; *ovaio* di bovino; *testicolo* di bovino e ratto; *tiroide* di cavallo e bue; *sangue* di cavallo e bue; *linfoghiandola* di bue; *midollo osseo rosso* di bue; *midollo osseo giallo* di bue; *mammella* di bovino; *placenta umana*.

Gli estratti acetonicici, al solito conservati in recipienti scuri ed in ghiacciaia, vennero svaporati a pressione ridotta poco prima dell'uso ed il residuo venne ripreso sempre con acqua distillata in quantità tale che ogni cc di liquido corrispondesse a 1-2 g di tessuto.

Saranno esposti separatamente i risultati ottenuti con gli estratti di milza, con gli estratti di surrenale e con gli estratti di tutti gli altri organi e tessuti.

ESTRATTI DI MILZA.

Prescindendo dalle surrenali che pure presentano, seppure spesso con notevoli differenze qualitative, le reazioni chimiche colorate dell'enteramina, gli estratti splenici sono gli unici che ci consentono di asserire la presenza in essi di enteramina o di una sostanza enteraminosimile.

I reperti sono del tutto caratteristici per gli estratti splenici di coniglio, di bue (e vitello), di pecora, di gatto. Le reazioni oltre ad essere notevolmente intense [si veda la tabella in cui tutti i valori quantitativi, sia delle reazioni colorate, sia delle reazioni biologiche (ERSPAMER, 2), sono espressi in % rispetto ai valori ottenuti con gli estratti gastrici di coniglio, considerati arbitrariamente=100] presentano anche le tonalità di colore descritte per gli estratti gastrici di coniglio: diazoreazione alla paranitroanilina rosso vinoso con colore facilmente estraibile con alcool amilico e virante, per forte acidificazione, all'ametista; reazione iodica violacea; fluorescenza tardiva alla luce di Wood intensa giallo-verdastra.

Estratto di	Intensità della		Intensità dell'azione biologica su	
	Diazoreazione secondo GEBAUER-FULNEGG	Reazione all'iodato di K	Intestino tenue di ratto	Utero di ratto in estro
Mucosa gastrica:				
Coniglio	100	100	100	100
Milza:				
Bue I	60-70	65-75	180-200	200
» II	40	40-50	120-130	120-130
» III	70-80	70-80	250	250-270
Vitello	70	60-70	200-210	200-220
Coniglio	200-220	220-240	500	500
Gatto	75-80	70-80	100-120	110
Cane	10-20	non valutabile	20	15-20
Cavallo I	25-30	25-30	25	25-30
» II	15	non valutabile	10-12	10-15
Maiale	20-25	20	20	15-20
Pecora	50-60	50-60	120-130	130
Ratto	10	negativa	10-15	—
Piccione	5	»	5-10	—
Cinocefalo (<i>Macacus cynomolgus</i>)	7	»	10	10
Uomo	10-20	non valutabile	20	15-20

Meno caratteristici sono i reperti ottenuti con estratti splenici di cane, cavallo, maiale, ratto ed uomo.

La diazoreazione alla paranitroanilina è decisamente rosso-brunstra, seppure con sfumature violacee; il viraggio del colore per acidificazione è meno netto e i toni sono arancio rossastro invece che ametista, l'estraibilità del colore con alcool amilico è scarsa ed il colore estratto non ha tonalità rosso vinose così pure come nel caso degli estratti gastrici di coniglio.

La reazione iodica assai spesso è inapprezzabile; quando è debolmente positiva lascia vedere solamente tonalità brunastre.

Anche la fluorescenza in luce di Wood, pur lasciando apprezzare un netto tardivo incremento nella sua intensità, dopo alcalinizzazione, presenta tonalità di colore non caratteristiche.

Le indicazioni quantitative riferite nella tabella sono per questi estratti solo molto approssimative. E ancor più approssimativi sono i risultati riferiti per gli estratti splenici di piccione e di scimmia che, accanto ad una reazione iodica negativa, presentano una diazoreazione del tutto atipica; solo il dibattimento con alcool amilico lascia apprezzare, nella fase alcoolica, tracce di colore violaceo che, in base ai risultati delle prove biologiche, sono da considerarsi imputabili all'enteramina.

Prima di terminare questo capitolo desideriamo ancora richiamare l'attenzione su due fatti. Innanzitutto sul fatto che le proporzioni fra la sensibilità delle varie reazioni colorate, già rilevate per gli estratti gastro-enterici, si mantengono invariate anche per gli estratti splenici. In secondo luogo sul fatto che gli estratti splenici (o almeno alcuni di essi) presentano, come risulta dalla tabella, una attività biologica notevolmente superiore a quella presentata, a parità di reazioni colorate, dagli estratti gastrici di coniglio.

Uno di noi (ERSPAMER, 4) in base ad indagini biologiche ha avanzato, per il fenomeno, una spiegazione che ci sembra soddisfacente.

La presenza, negli estratti splenici, di una sostanza enteramino-simile ci ha naturalmente subito indotti a indagare sulla possibile esistenza nella milza di elementi che all'indagine istochimica si rivelassero, come già le cellule enterocromaffini del tubo gastro-enterico, i depositari della sostanza.

I risultati ottenuti all'esame istochimico (diazoreazione, reazione cromaffine, reazione all'iodato di potassio, reazione argentaffine) e istofluoroscopico, sono stati costantemente negativi tanto su materiale incluso in paraffina dopo fissazione in formolo 10 % o in li-

quido di REGAUD quanto su strisci di materiale splenico, ugualmente fissato, di coniglio, bue e cane.

L'indagine istochimica non sarà da noi abbandonata: è evidente peraltro, che dimostratisi insufficienti i soliti metodi per lo studio delle localizzazioni fenoliche, altre tecniche più delicate dovranno essere elaborate.

ESTRATTI DI SURRENALE.

Gli estratti di surrenale copulano in ambiente alcalino col sale di diazonio della paranitroanilina, dando origine a un intenso color verde-bruno che per forte acidificazione vira, dopo un rischiaramento iniziale, verso un rosso-eosina.

Dibattendo con alcool amilico, la fase alcoolica si colora in rosso viola, l'acquosa rimane colorata in verde-bruno.

La reazione iodica è intensamente positiva con tonalità violacea.

Alla luce di WOOD gli estratti presentano, in ambiente neutro, modica fluorescenza giallo-verdastra. Dopo alcalinizzazione compare immediatamente una intensa fluorescenza verde-mela che raggiunge la massima intensità nei primi minuti ma è vivace ancora dopo 24 h.

Le reazioni ora descritte, come si vede assai simili a quelle dell'enteramina, sono nel caso in esame indubitanamente dovute all'adrenalina, almeno in massima parte. Se accanto all'adrenalina esista negli estratti di surrenale anche dell'enteramina, è quesito che per ora va lasciato in sospeso. Non sono in grado di risolverlo i risultati delle reazioni colorate ma solo quelli di reazioni biologiche eseguite dopo avere con adatti accorgimenti distrutta l'adrenalina degli estratti, lasciando inalterata l'eventuale enteramina.

ESTRATTI DI ALTRI TESSUTI ED ORGANI.

Diazoreazione alla paranitroanilina: gli estratti dei più vari organi e tessuti presentano tutti, in ambiente alcalino, una più o meno intensa reazione, con tonalità di colore varianti dal giallo-arancio all'arancio, al rosso arancio, al giallo bruno e al rosso bruno. Anche in ambiente modicamente acido spesso si ha comparsa di debole color giallastro o giallo arancio.

Acidificando la soluzione del colore azoico ottenuto in ambiente alcalino si ha forte scoloramento del liquido che assume deboli toni giallastri, arancio o giallo rossastri. Mai si hanno viraggi verso tonalità decisamente rosse e tanto meno poi viraggi verso il violaceo ametista.

Dibattendo con alcool amilico si nota, costantemente, che la massima parte del colore rimane in acqua. In alcool passano piccole quantità di un colore, a seconda dei casi, giallo chiaro o giallo sporco o, più raramente, giallo roseo o bruno roseo.

Reazione iodica. - Anche eseguita su estratti relativamente concentrati (1 cc = 2 g tessuto) è costantemente negativa. Il lievissimo imbrunimento verificatosi in qualche raro estratto non ha nulla a che vedere con la reazione iodica violacea propria dell'enteramina.

Reazione di fluorescenza. - Tutti indistintamente gli estratti esaminati presentano, già in ambiente neutro, una più o meno vivace fluorescenza che generalmente è biancastra o grigiastra e solo in casi più rari (estratti di fegato e di rene) è giallo vello o giallastra. Alcalinizzando la fluorescenza si attenua in genere abbastanza cospicuamente e nella maggior parte dei casi permane poi invariata, quantitativamente e qualitativamente, anche ad esami eseguiti dopo 24-48 h dall'alcalinizzazione. Solo in pochi casi si osserva, ad un esame tardivo, una qualche modificazione nella tonalità di colore o un aumento nella intensità della fluorescenza (ad es. negli estratti di fegato di gatto e di bue, di polmone di coniglio). Mai peraltro l'aumento dell'intensità della fluorescenza è riuscito a raggiungere valori doppi degli originari.

CONSIDERAZIONI GENERALI.

1) Fra i numerosi estratti studiati solo quelli delle surrenali e della milza presentano reazioni colorate simili o identiche a quelle dell'enteramina degli estratti gastro enterici.

Per gli estratti surrenalici è certo che la positività delle reazioni colorate è dovuta, almeno principalmente, all'adrenalina. Se poi accanto all'adrenalina coesista in tali estratti anche qualche sostanza enteraminosimile è problema che, almeno per ora, non è risolvibile in base alle sole reazioni colorate.

Persino la reazione di fluorescenza, che per liquidi contenenti solo adrenalina o rispettivamente solo enteramina presenta pure notevoli differenze (fluorescenza immediata, dopo alcalinizzazione, per l'adrenalina, fluorescenza assai tardiva per l'enteramina), non dà risultati attendibili per liquidi contenenti e l'una e l'altra sostanza, tanto meno poi trattandosi di estratti d'organo nei quali anche la

fluorescenza adrenalinica risulta, al contrario di quanto avviene in soluzioni pure, di molto prolungata.

Per gli estratti splenici è invece indubitato che le caratteristiche reazioni colorate sono dovute a una sostanza di- o polifenolica del tipo dell'enteramina. In questa nostra opinione ci confortano in pieno i risultati delle prove biologiche (ERSPAMER).

2) È la sostanza di- o polifenolica della milza da identificarsi con l'enteramina della mucosa gastro-enterica?

Basandosi sulla positività e sulle caratteristiche delle varie reazioni colorate e della reazione di fluorescenza e sui loro reciproci rapporti di sensibilità si può senz'altro affermare che enteramina e sostanza di- o polifenolica degli estratti splenici sono sostanze chimicamente tra loro assai vicine. L'indagine chimica non ci consente attualmente di andar oltre.

E se è vero che l'indagine biologica parla pure decisamente in favore della più stretta parentela tra la sostanza enteraminosimile splenica e l'enteramina gastrica (identità dei reattivi biologici atti alla messa in evidenza delle due sostanze; identità nel comportamento delle due sostanze di fronte ai più svariati trattamenti; presenza, tanto negli estratti splenici quanto in quelli gastrici delle due forme l'« attiva » e l'« inattiva » di enteramina; identità di comportamento di fronte all'enteraminasi ecc.) è pur tuttavia opportuno, in attesa di ulteriori studi, andar cauti nell'identificare tra loro le varie sostanze « enteraminosimili » dimostrate in organi e tessuti svariati (estratti di mucosa gastro-enterica, estratti splenici, estratti di ghiandola salivare posteriore di *Octopus vulgaris*). Varie osservazioni ci inducono infatti a ritenere presumibile che la stessa enteramina degli estratti gastro-enterici possa in realtà essere rappresentata da più sostanze diverse, seppure chimicamente assai vicine (ERSPAMER). La diversità è evidente possa consistere anche semplicemente nel fatto che l'enteramina invece di essere libera sia legata a qualche altra sostanza: ipotesi che sembra plausibile quando si consideri la possibile attivazione della cospicua frazione di enteramina « inattiva » dello stomaco di coniglio per semplice trattamento a pH adatto.

Per tutte queste considerazioni ci sembra per ora opportuno riservare la denominazione di « enteramina » alla sola sostanza di- o polifenolica degli estratti di gastroenterici (lasciando aperta anche per questa la questione della sua unicità o molteplicità) e di designare col termine meno impegnativo di « enteraminosimili » tutte le altre

localizzazioni di sostanze di- o polifenoliche che chimicamente e biologicamente si rivelano analoghe all'enteramina.

3) Nonostante l'accurata applicazione delle usuali tecniche istochimiche e istofluoroscopiche non ci è mai riuscito di identificare nella milza alcun substrato morfologico della sostanza enteramino-simile, omologabile ai granuli specifici delle cellule enterocromaffini. La cosa del resto non sorprende poichè già per lo stomaco noi avevamo dovuto ammettere che accanto a una localizzazione di enteramina istochimicamente rivelabile nei granuli specifici delle cellule enterocromaffini ne esistesse anche uno di cui non si trova traccia nei preparati.

4) L'applicazione dell'insieme di reazioni colorate che noi consideriamo caratteristico dell'enteramina a numerosi estratti dei più vari tessuti ed organi ci consente ora di pronunciarci, a ragion veduta, sulla specificità delle singole reazioni e dell'insieme delle reazioni proposte, sulla attendibilità dei risultati conseguiti e quindi sulla loro applicabilità alla dimostrazione qualitativa e al dosaggio quantitativo dell'enteramina e sostanze enteramino-simili.

Cominciamo anzitutto col ribadire l'asserzione che nessuna delle reazioni, singolarmente presa, è specifica per la enteramina.

Non la diazoreazione, nemmeno nelle sue varie modificazioni che pur ne affinano notevolmente la elettività, non la reazione jodica, non la fluorescenza in luce di WOOD.

Caratteristica per l'enteramina può essere invece considerata la contemporanea positività, con le peculiari tonalità di colore e modalità di comparsa del colore su cui abbiamo più volte insistito, di tutte e tre le reazioni sopra nominate. Ad una condizione però: che negli estratti non sia presente adrenalina, capace di dare, come è noto, tutte le reazioni colorate dell'enteramina o di renderne difficile il rilievo delle peculiarità.

5) Se in base alle premesse ora fatte può sembrar facile la dimostrazione dell'enteramina a mezzo delle sue reazioni colorate, nella pratica tale dimostrazione può urtare contro notevoli difficoltà determinate in parte dalla scarsa sensibilità di qualcuna delle reazioni caratteristiche (ad es. reazione jodica) in parte dalla possibile coesistenza, negli estratti, di notevoli quantità di impurezze capaci di volta in volta di dare intense diazoreazioni aspecifiche, imbrunimenti del liquido per ebollizione con jodato potassico, intense fluorescenze gialle o verdastre; manifestazioni tutte, in grado di mascherare e alterare le reazioni caratteristiche dell'enteramina. Facile quindi sarà

la dimostrazione di questa sostanza in estratti (fondo gastrico di coniglio, milza di coniglio, bue, pecora) che ne contengono in notevole quantità e contengono scarse impurezze, difficile o addirittura impossibile in estratti che ne contengono poca e commista ad abbondanti impurezza (milza umana, di scimmia, di piccione, ecc.).

Considerazioni queste da cui scaturiscono anche le condizioni in cui possono dare risultati attendibili le determinazioni quantitative (in rapporto ad un estratto tipo) del contenuto enteraminico di un liquido.

Si può pertanto concludere che se le reazioni colorate possono renderci utilissimi servizi per permetterci rapide diagnosi e immediate, seppure approssimative, valutazioni quantitative delle sostanze enteraminosimili, esse tuttavia sono nettamente inferiori alle reazioni biologiche, assai più sensibili, assai più specifiche e assai più adatte per titolazioni quantitative.

Non va peraltro dimenticato che mentre la reazione chimica colorata è presumibilmente positiva per tutte le forme di enteramina (forma attiva e forma o forme ¹) inattive) ciò non avviene per la reazione biologica, la quale è in grado di rivelare e titolare le forme inattive solo quando queste, con opportuni trattamenti, siano state attivate (ERSPAMER). È pertanto dalla contemporanea applicazione delle reazioni chimiche colorate e delle reazioni biologiche che sono da attendersi i migliori risultati nelle indagini sulle sostanze enteraminosimili e nei tentativi di isolamento di tali sostanze allo stato di purezza.

RIASSUNTO.

L'utilizzazione delle reazioni chimiche colorate dell'enteramina nello studio di estratti acetonicici di numerosi e svariati organi e tessuti di mammiferi permette di dimostrare che solo nella milza è presente una sostanza « enteraminosimile ». Questa non è legata ad alcun substrato morfologico istochimicamente rilevabile.

In base ad estese indagini gli AA. valutano criticamente la sensibilità e la specificità delle reazioni colorate dell'enteramina e la loro possibile applicazione all'indagine qualitativa e quantitativa.

¹) Ricerche ancora in corso di uno di noi (ERSPAMER) sembrano infatti dimostrare l'esistenza di due diverse forme di enteramina inattiva, di cui l'una corrispondente alla già descritta enteramina I (4), l'altra presumibilmente identificabile con la sostanza specifica dei granuli delle cellule enterocromaffini.

ZUSAMMENFASSUNG.

Eine grosse Anzahl verschiedener Organ- und Gewebeextrakte wurde mittels der chemischen Farbreaktionen des Enteramins untersucht. Nur in der Milz erwies sich eine « enteraminähnliche » Substanz vorhanden. Solche enthält jedes histochemisch nachweisbaren morphologischen Substrates.

Die Empfindlichkeit und die Spezifität der chemischen Farbreaktionen des Enteramins sowie die Anwendbarkeit derselben für qualitative und quantitative Versuche werden von den Verff. auf Grund zahlreicher Versuche kritisch erörtert.

RESUME.

En employant les réactions chimiques colorées de l'enteramine dans l'étude d'extraits acétoniques de nombreux et différents organes et tissus de mammifères, les AA. démontrent que seulement dans la rate il existe une substance « entéraminosimile ». Elle n'est pas liée à aucun substrate morphologique histochemiquement décelable.

A la suite de nombreuses recherches les AA. donnent une valuation critique de la sensibilité et de la spécificité des réactions colorées de l'enteramine et de leur possible application aux recherches qualitatives et quantitatives.

SUMMARY.

The AA. with the help of the staining reactions of the enteramine used in their researches of the acetons extracts of various and numerous organs and tissues of mammals, have been able to demonstrate only in the spleen the presence of an enteramin-like substance.

This substance is not united with any morphological element, whose histochemical properties can be defined.

The sensibility and the specificity of the staining reactions of the enteramine, and their possible application to the quantitative and qualitative researches are discussed by the AA. on the basis of their personal investigations.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Erspamer V. - *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, 1940, 15, 828.
- (2) Idem - *Arch. exp. Path. Pharmak.*, 1940, 196, 343, 366, 391.
- (3) Idem - *Ibidem*, 1942, 199.
- (4) Idem - *Ibidem*, 1942, 199.
- (5) Vialli M. e Erspamer V. - Questo *Archivio*, 1942 (ved. lavoro precedente).