

## 9. Italo ARCHETTI – L'azione dell'Atebrina e della Chinina sui parassiti malarici.

GOLGI (1), sperimentando in pazienti l'azione della chinina sui parassiti malarici, giungeva per quello della quartana alle conclusioni: che il farmaco non impedisce il proseguire dello sviluppo del parassita, quando in esso sono anche appena iniziate le trasformazioni che sono proprie del « processo di segmentazione », però agisce con la massima efficacia, sulla giovane generazione, la quale verrebbe colpita soprattutto « al suo stato nascente », e non sarebbe più in grado d'invadere nuovi globuli rossi; che notevole sarebbe pure l'azione della chinina sui parassiti allorchè trovansi nello stadio che immediatamente precede la segmentazione, mentre una maggiore resistenza opporrebbero le forme giovani, già penetrate nell'eritrocito e che sono, per così dire, protette da un grosso strato di sostanza globulare.

Per il parassita dalla terzana valgono le medesime deduzioni: solamente le forme endoglobulari sarebbero più facilmente attaccate dalla droga, probabilmente in dipendenza delle alterazioni che sin dall'inizio dell'invasione subiscono i globuli rossi.

ANTOLISEI (2), MARCHIAFAVA e BIGNAMI (3), CRAIG (4) (citato da CHOPRA), confermarono le opinioni di GOLGI, fondamento del classico precetto terapeutico di somministrare la chinina alcune ore prima dell'accesso così da sorprendere e distruggere in circolo la nuova generazione parassitaria, che appunto in tale stadio è più vulnerabile all'azione del medicamento.

MARCHIAFAVA (3), sempre a questo proposito, così si esprime: « la chinina agisce sui parassiti malarici in quelle fasi di vita in cui si nutrono e si sviluppano; quando cessa l'attività nutritiva, arrestandosi la trasformazione dell'emoglobina in pigmento nero e comincia la fase riproduttiva, allora contro quella fase la chinina è inefficace ».

Ricerche più recenti di DE SANT'ANA QUEIROZ (5), condotte su *Macacus rhesus* infetto da *P. knowlesi*, e curato per os mediante Italchina (Atebrina), hanno portato l'A. a conclusioni sostanzialmente identiche a quelle degli AA. precedenti; esse però se ne dif-

ferenziano notevolmente per ciò che riguarda le forme libere del plasma sanguigno, in quanto per DE SANT'ANA QUEIROZ, contrariamente all'opinione corrente, esse sono proprio le più resistenti ai farmaci.

Alcune esperienze di MISSIROLI (6) tendenti a dimostrare che la chinina non esplica alcuna azione sugli sporozoit e sulle successive forme extra globulari di sviluppo che si riscontrano nelle prime 30 ore dall'inoculazione; la nessuna efficacia dei preparati antimalarici sulla fase esoeitrocitica del *P. gallinaceum* e sui merozoiti che ne derivano e che sono liberi nel plasma sanguigno; le stesse osservazioni degli AA. sopra citati che notarono certa dipendenza fra azione del medicamento e fase di sviluppo del parassita, richiamarono la mia attenzione sui lavori di CHRISTOPHERS e FULTON (7 e 8), riguardanti il metabolismo respiratorio del *P. knowlesi* e l'effetto inibitorio esercitato da alcuni medicamenti sull'assunzione di ossigeno da parte dei globuli parassitati.

In una prima serie di ricerche, gli AA. stabiliscono che il consumo di ossigeno è, a parità di condizioni, maggiore, quanto più è grande il numero dei globuli parassitati; che il siero ha scarsa parte nel provvedere l'ossigeno assunto dai globuli rossi; che i parassiti possono facilmente assumere l'ossigeno necessario alla loro vita dall'emoglobina delle emazie.

Da ricerche successive sull'azione inibitoria in vitro di alcuni farmaci, hanno dedotto che i medicamenti antimalarici, in determinate concentrazioni, inibivano nei globuli parassitati la fissazione dell'ossigeno e che questa proprietà era in vario grado parallela all'azione terapeutica.

Così l'Atebrin, che ha un potere inibitorio sull'assunzione di ossigeno cinque volte superiore a quello della chinina, manifesta un'azione terapeutica altrettanto superiore a quest'ultima. A loro volta il bleu di metilene e l'acriflavina dotati di scarso potere inibitorio, esercitano una scarsa azione parassitocida.

Basandosi su tutte queste loro osservazioni, CHRISTOPHERS e FULTON pensano che i parassiti malarici siano più vulnerabili proprio quando si trovano entro i globuli rossi, perchè condizione normale del parassita sarebbe quella di assumere l'ossigeno che gli offre l'emoglobina dell'eritrocito, fenomeno vitale che verrebbe ostacolato o impedito appunto dall'azione dei medicamenti che

esplicherebbero la loro attività in funzione della loro capacità inibitrice sull'assunzione di ossigeno da parte dei globuli rossi.

Da ciò si dedurrebbe che quando i parassiti si trovano in quegli stadi in cui per avere raggiunto lo sviluppo completo e per avere ormai quasi distrutta la cellula ospite, non richiedono ulteriori notevoli quantità di ossigeno, o se sono extraglobulari, non possono ricavarlo dallo stroma emoglobinico, essi non vengono colpiti dal farmaco oppure lo sono sempre indirettamente in maniera blanda. Sempre di conseguenza risulterebbe che fra gli stadi di sviluppo dei parassiti sarebbero più sensibili all'azione dei medicamenti quelli in cui l'attività vitale dei parassiti e quindi il bisogno di ossigeno sono maggiori.

Le conclusioni degli AA. si riallacciano nel tempo con quanto già da lungo autorevoli farmacologi avevano notato riguardo alle proprietà riducenti della chinina.

Secondo BINZ (9), la chinina esercita un'azione direttamente inibitiva sui processi di ossidazione ed in particolare sopra quelli che si compiono per mezzo della emoglobina. ROSSBACH (10) credeva di poter attribuire quest'azione riducente della droga ad un più stretto legame dell'ossigeno coll'emoglobina; mentre secondo POUCHET (11), la chinina toglierebbe alle emazie la proprietà di caricarsi di ossigeno nascente nel corso della circolazione, per cui sarebbero meno atte a compiere le loro funzioni di combustione.

Notevole per le mie ricerche è l'osservazione (POUCHET) che gli effetti della chinina sia sui batteri che sugli organismi inferiori sono simili a quelle che si notano in condizioni di anerobiosi; alcuni microrganismi resistono più o meno all'azione del farmaco ed è importante il fatto che quelli che presentano maggiore resistenza sono gli stessi che sopportano meglio la privazione di ossigeno.

Poichè dalle ricerche di CHRISTOPHERS e di FULTON non risulta dimostrato se la presenza della emoglobina sia veramente necessaria per tutti i processi vitali dei parassiti, JACOBI (12) esaminò in una serie di esperienze quale sia la resistenza del *P. galinaceum* in un ambiente con o privo di emoglobina.

Stabilito che il plasma solo, ricco di parassiti liberi, perde la sua infettività dopo 24 h di permanenza al buio a 19°-25°, mentre invece la conserva se ad esso si aggiunga sangue di pollo sano,

l'A. ritiene, in base ad altre esperienze, che ciò si verifichi per l'apporto nuovo di ossigeno, mentre non è sostenibile la supposizione che i parassiti trovino nei globuli rossi una protezione di natura meccanica.

Ho condotto le mie esperienze in *Macacus rhesus* infetto da *P. knowlesi*, parassita che per la sua regolarità di sviluppo è particolarmente adatto a questo genere di ricerche. Come medicamento ho usato l'italchina (Atebrin) che ho inoculato endovena alla dose di 3 cg in due soli casi, mentre poi ho prefedito la via intramuscolare iniettando 5 cg del medicamento per evitare che qualche esemplare mi morisse in seguito a choc.

Prelevavo il sangue dal lobulo auricolare prima dell'inoculazione e poi alla distanza di 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 ore: sugli strisci ottenuti contavo il numero assoluto dei parassiti per 500 globuli rossi (il valore riportato è ridotto rispetto a 100 globuli rossi) ed il numero delle forme di sviluppo riscontrate in 100 parassiti. Ho creduto opportuno riunire in un'unica voce le forme anulari e le forme ameboidi, perchè non è sempre facile, soprattutto dopo l'azione del farmaco il distinguerle, in quanto l'una rappresenta lo stato di riposo della seconda.

Riporto a titolo di confronto e poichè si abbia un'idea dello sviluppo normale di *P. knowlesi* in *Macacus rhesus* la tabella tolta dal lavoro di SANT'ANA QUEIROZ in cui è descritto il numero dei parassiti riscontrati ogni due ore (v. tab. I).

TABELLA I

NUMERO DEI PARASSITI RIFERITO A 100 GLOBULI ROSSI

1 <sup>a</sup>	ora	8%	(quasi tutte forme con 5,10 granuli di cromatina, molte rosette).
2 <sup>a</sup>	»	18%	(grande percentuale di anellini)
4 <sup>a</sup>	»	27%	
6 <sup>a</sup>	»	32%	
8 <sup>a</sup>	»	36%	
10 <sup>a</sup>	»	34%	
12 <sup>a</sup>	»	29%	(si notano già alcune forme compatte)
14 <sup>a</sup>	»	31%	
16 <sup>a</sup>	»	24%	
18 <sup>a</sup>	»	25%	
20 <sup>a</sup>	»	22%	(alcune forme con 2,5 granuli di cromatina)
22 <sup>a</sup>	»	24%	(forme con 5,6 granuli di cromatina)
24 <sup>a</sup>	»	24%	(forme con 5,10 e più granuli di cromatina).

## PARTE SPERIMENTALE

### ESPERIMENTO N° I (v. tab. II).

Inoculati 3 cg di Italchina endovena circa 2-3 h prima del termine del processo schizogonico: prevalgono in circolo le forme compatte prossime alla segmentazione e quelle in cui si è appena iniziata; vi sono anche parassiti con numerosi granuli di cromatina e qualche rosetta.

TABELLA II.

FORME RISCONTRATE	NUMERO DELLE FORME TROVATE RIFERITE A 100 PARASSITI										
	Prima della inoculazione	d o p o									
		1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	6 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	
Anelli e forme ameboidi . . .	4	4	18	41	65	81	91	92	95	100	
Forme compatte. . . . .	33	30	14	10	5	4	4	2	2	—	
» con due granuli di cromatina. . . . .	35	20	23	16	5	1	1	2	1	—	
» con tre . . . . .	—	—	8	6	3	—	1	—	—	—	
» con quattro . . . . .	20	30	22	10	4	5	1	1	—	—	
» con cinque . . . . .	—	—	9	6	2	2	—	—	—	—	
» con sei . . . . .	6	8	—	6	5	1	2	2	2	—	
» con sette. . . . .	—	—	1	—	2	—	—	—	—	—	
» con otto . . . . .	1	4	3	2	2	—	—	1	—	—	
» con dieci. . . . .	—	2	—	1	1	1	—	—	—	—	
Rosette. . . . .	1	2	2	2	6	5	—	—	—	—	
Numero di parassiti riferito a 100 globuli rossi . . . . .	11	16	14	13	14	23	26	16	13	3	

Dall'esame dei dati ricavati risulta:

1) che il numero assoluto dei parassiti è aumentato sino ad 8 h dopo la somministrazione del medicamento, e che poi è diminuito sempre più;

2) che l'aumento è dovuto ad un progressivo crescere del numero degli anelli, mentre contemporaneamente è diminuito quello delle forme compatte e con pochi granuli di cromatina (2-4); è rimasto pressochè invariato il numero delle forme con molti granuli di cromatina (6-10) ed è aumentato quello delle rosette.

La diminuzione è dovuta all'evidente azione distruttiva del farmaco non più compensata dalla immissione in circolo di nuovi parassiti da parte delle rosette, che hanno tutte raggiunto la maturazione completa.

Le alterazioni indotte dal farmaco sui parassiti sono evidenti già poco tempo dopo l'inoculazione (1-2 h), sia a carico del citoplasma, che si fa più rarefatto, più pallido, come dei nuclei; il pigmento si raccoglie in un'unica massa e spesso viene espulso, specie dalle forme compatte. E' in queste ultime che le alterazioni appaiono più precocemente, e sono più marcate e più nette.

Studiando i reperti sopra riferiti, si deduce che il farmaco non ha influito sulle forme prossime alla completa maturazione: il numero delle rosette è andato aumentando, esse hanno, come di norma, dato origine ai merozoiti. Il medicamento non ha colpito i parassiti all'inizio della loro funzione ed infatti essi hanno invaso i globuli rossi, senza mostrare al principio alcuna alterazione morfologica (che è per noi l'unica espressione dell'azione del medicamento), dimostrando anzi una certa, seppur lieve, tendenza a svilupparsi.

Gli stadi più colpiti sono stati soprattutto quelli delle forme compatte e quelli delle forme in cui il processo di divisione della cromatina si era appena iniziato; ciò risulta oltre che dall'esame morfologico, dalla valutazione comparata delle cifre percentuali.

E' presumibile che si sia verificata una evoluzione verso le forme più mature, soprattutto negli stadi più avanzati, poichè infatti il numero delle forme si è mantenuto quasi invariato sino alla sesta ora, malgrado l'aumento numerico preponderante delle forme iniziali o anulari.

ESPERIMENTO N° 2 (v. tab. III).

Inoculati 3 cg di Italchina endovena circa 8 h prima del processo schizogonico: in circolo vi sono esclusivamente forme anulari e forme compatte all'inizio del loro sviluppo.

TABELLA III.

F O R M E R I S C O N T R A T E	NUMERO DELLE FORME TROVATE RIFERITE A 100 PARASSITI										
	Prima della inoculazione	d o p o									
		1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	6 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	
Anelli e forme ameboidi . . . . .	71	63	67	64	50	52	62	77	76		
Forme compatte. . . . .	29	32	24	32	39	32	27	21	19	—	
» con due granuli di cromatina. . . . .	—	4	5	2	9	10	7	—	3	—	
» con tre . . . . .	—	1	2	1	—	1	1	—	1	—	
» con quattro . . . . .	—	—	2	1	1	4	1	1	1	—	
» con cinque . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
» con sei . . . . .	—	—	—	—	1	—	—	1	—	—	
» con sette. . . . .	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	
» con otto . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
» con dieci. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Rosette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Numero di parassiti riferito a 100 globuli rossi. . . . .	6	2,5	2,5	5	5	7	0,5	0,4	0,2	—1	

Scorrendo i dati ottenuti nell'esperimento risulta:

1) che il numero assoluto dei parassiti si è mantenuto quasi invariato sino a 6 h dopo l'inoculazione del farmaco, per diminuire invece rapidamente nelle ore successive;

2) che il numero delle forme anulari, ameboidi e compatte è rimasto pressochè il medesimo sino alla 12<sup>a</sup> h;

3) che si è avuto un processo evolutivo in un numero scarso di parassiti, maturazione arrestatasi in gran parte ai primi gradi di suddivisione nucleare;

Alcuni rari parassiti devono aver raggiunta la completa maturazione, come lo dimostrerebbe il lieve aumento del numero degli anelli verso l'8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> ora.

E' evidente in questa prova come l'inoculazione del medicamento, quando vi sono in circolo forme giovani, impedisce quasi completamente un ulteriore sviluppo del parassita, per cui si ha una stazionarietà nel numero delle varie forme e la comparsa di qualche rara forma più sviluppata.

Questo esperimento potrebbe a prima vista sembrare in contrasto con i risultati ottenuti nel precedente, dove invece le forme compatte sono notevolmente e rapidamente diminuite: ma oltre al fatto che in quel primo esperimento la diminuzione in parte è più relativa che assoluta dato il notevole aumento delle forme anulari, vi è anche come causa del rapido decrescere il maggiore grado di maturazione delle forme compatte, molto prossime ormai alla scissione, mentre invece nella prova in discussione le stesse forme sono in uno stadio meno avanzato di sviluppo e quindi secondo quanto dirò nelle conclusioni relativamente meno vulnerabili al medicamento (l'esame morfologico conferma i dati dedotti dalle cifre).

Come già ho riferito, dall'esame delle cifre percentuali delle forme anulari e delle forme compatte si deduce che vi è stata una certa evoluzione da uno stadio nell'altro e verso le forme ancora più mature: l'aumento del numero delle forme anulari alla 8<sup>a</sup> 10<sup>a</sup> 12<sup>a</sup> h, si potrebbe interpretare sia come dovuto alla maggiore resistenza di tali forme all'azione del farmaco, sia invece come espressione di una benchè minima immissione in circolo di nuovi parassiti. Questa seconda ipotesi appare come la più probabile, perchè proprio in queste ore dovrebbe avvenire la maturazione completa di quelle forme, che sfuggite all'azione del medicamento, hanno potuto continuare il loro sviluppo.

#### ESPERIMENTO N° 3 (v. tab. IV).

Inoculati 5 cg di Italchina per via intramuscolare quando già era iniziata la rottura delle rosette: in circolo vi sono sin d'ora parecchie forme anulari; vi sono poi forme di tutti i gradi di sviluppo soprattutto a 2 e a 3 granuli di cromatina; mancano completamente le rosette, probabilmente perchè sono annidate negli organi interni.



TABELLA IV.

F O R M E R I S C O N T R A T E	NUMERO DELLE FORME TROVATE RIFERITE A 100 PARASSITI									
	Prima della inoculazione	d o p o								
		1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	6 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>
Anelli e forme ameboidi . . . . .	22	45	49	90	79	92	100	100	100	100
Forme compatte. . . . .	12	11	12	2	6	3	—	—	—	—
» con due granuli di cro- matina . . . . .	22	7	8	3	2	—	—	—	—	—
» con tre . . . . .	—	—	2	1	—	—	—	—	—	—
» con quattro . . . . .	31	23	15	1	4	2	—	—	—	—
» con cinque . . . . .	—	—	4	—	3	1	—	—	—	—
» con sei . . . . .	8	7	8	3	4	—	—	—	—	—
» con sette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» con otto . . . . .	4	7	2	—	1	2	—	—	—	—
» con dieci. . . . .	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Rosette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Numero di parassiti riferito a 100 globuli rossi. . . . .	7	12	15	12	17	22	12	7	7	2

Dalle cifre esposte si ricava :

1) che il numero assoluto dei parassiti ha continuato a crescere sino a 6 h dopo l'inoculazione del farmaco, per diminuire rapidamente nelle ore successive;

2) che questo aumento è dovuto ad un progressivo crescere del numero delle forme anulari, mentre contemporaneamente è diminuito quello delle altre forme, in modo particolare e più evidente quello delle forme compatte e delle forme con pochi granuli di cromatina (2-4).

I risultati ottenuti in questa prova confermano in sostanza quelli che si sono avuti nella prima prova : anche qui le rosette hanno completato il loro sviluppo, i merozoiti hanno invaso i globuli rossi e i giovani anelli si sono un poco sviluppati; gli stadi più colpiti sono stati quelli delle forme compatte e di quelle con pochi granuli di cromatina.

Questi dati sono concordanti anche con quelli desunti dall'esame morfologico : le alterazioni indotte dal farmaco sono più evi-

denti e più precoci nelle forme compatte e poi in quelle in cui già la segmentazione della cromatina si è iniziata; infine si alterano anche gli anelli (alla 3 h si notano le prime alterazioni che si fanno man mano più accentuate).

ESPERIMENTO N° 4 (v. tab. V).

Inoculati 5 cg di Italchina per via intramuscolare quando è già iniziato il processo di rottura delle rosette: in circolo vi sono quasi esclusivamente anelli e qualche forma di divisione, si trovano anche diverse rosette.

TABELLA V.

F O R M E R I S C O N T R A T E	NUMERO DELLE FORME TROVATE RIFERITE A 100 PARASSITI									
	Prima della inoculazione	d o p o								
		1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	6 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>
Anelli e forme ameboidi . . . .	84	91	94	95	96	98	100	100	100	100
Forme compatte. . . . .	—	2	1	2	1	—	—	—	—	—
» con due granuli di cromatina. . . . .	5	—	—	1	1	2	—	—	—	—
» con tre . . . . .	—	3	—	—	1	—	—	—	—	—
» con quattro . . . . .	5	3	1	1	—	—	—	—	—	—
» con cinque . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» con sei . . . . .	1	1	2	1	1	—	—	—	—	—
» con sette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» con otto . . . . .	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—
» con dieci. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rosette. . . . .	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Numero di parassiti riferito a 100 globuli rossi. . . . .	13	14	17	22	24	22	21	15	10	1

Come nelle altre prove dallo studio delle cifre esposte nella tabella si può dedurre:

- 1) che il numero assoluto dei parassiti è aumentato sino alla 6<sup>a</sup> ora, per decrescere nelle ore successive;
- 2) che l'aumento è dovuto alla formazione dei nuovi parassiti, per la maturazione completa delle rosette.

Anche qui, come nelle prove 1 e 2, appare evidente come il farmaco non abbia impedito l'aprirsi delle rosette e la conseguente formazione dei merozoiti, i quali sono penetrati normalmente nei globuli rossi.

All'esame morfologico appaiono più alterate le forme compatte; anche nelle forme in divisione si notano i segni dell'azione del medicamento, azione che è meno evidente e più ritardata nelle forme anulari ove si riscontra anche un certo grado di evoluzione.

# ESPERIMENTO N° 5 (v. tab. VI).

Inoculati 5 cg di Italchina per via muscolare circa 4 h prima della maturazione completa principale (chiamo così il ciclo di sviluppo che riguarda il maggior numero di parassiti; poichè in questo animale, vi deve essere un altro ciclo comprendente un quantitativo minore di parassiti la cui presenza altera però un poco la regolarità del quadro) delle rosette: in circolo vi sono anche forme ameboidi, ma prevalgono le forme compatte in parte ancora giovani, in parte vicine all'inizio della segmentazione, e le forme con due granuli di cromatina; vi sono inoltre poche forme in cui la segmentazione della cromatina è più progredita.

TABELLA VI.

F O R M E R I S C O N T R A T E	NUMERO DELLE FORME TROVATE RIFERITE A 100 PARASSITI									
	Prima della inoculazione	d o p o								
		1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	6 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>
Anellie forme ameboidi . . . . .	—	—	—	—	18	10	29	76	73	76
Forme compatte. . . . .	58	50	56	—	40	41	34	17	20	22
» con due granuli di cromatina. . . . .	28	36	18	—	10	12	9	3	2	1
» con tre . . . . .	1	5	8	—	8	5	3	—	2	1
» con quattro . . . . .	3	1	6	—	11	19	14	1	1	—
» con cinque . . . . .	—	2	3	—	7	4	4	1	1	—
» con sei . . . . .	—	1	3	—	2	4	1	2	1	—
» con sette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» con otto . . . . .	—	—	1	—	3	3	5	—	—	—
» con dieci. . . . .	—	—	—	—	1	2	1	—	—	—
Rosette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Numero di parassiti riferito a 100 globuli rossi. . . . .	14	19	21	—	15	17	18	16	14	12

Le deduzioni che si possono trarre dall'esame dei dati riferiti sono :

1) che il numero dei parassiti ha presentato qualche oscillazione ma in complesso si è mantenuto costante;

2) che le forme compatte e le forme con due granuli di cromatina hanno presentato una diminuzione di numero più evidente nelle seconde che nelle prime, poichè fra queste vi sono quelle forme ancora giovani e che più hanno resistito all'azione del preparato;

3) che vi è stato un certo grado di evoluzione, soprattutto verso le forme con pochi granuli di cromatina (4-6), come lo dimostra l'aumento di numero verificatosi verso la 4h-8h; evoluzione che in alcuni parassiti ha raggiunto la completa maturazione.

4) che le rosette giunte a maturazione hanno dato i merozoiti come di norma, i quali a loro volta sono penetrati nei globuli rossi, come si desume dalle cifre riportate nella tabella, contribuendo con questa nuova immissione di parassiti a mantenere ancora abbastanza elevato il numero assoluto dei parassiti stessi.

Anche da questo esperimento si può concludere che il medicamento agisce in special modo sulle forme compatte vicine ad iniziare il processo di segmentazione e sulle forme in cui questo fenomeno è ai suoi primi gradi: infatti sono questi gli stadi, il cui numero viene maggiormente e più rapidamente diminuito.

Inoltre il farmaco non ha alcuna azione su quelle forme che raggiungono la maturazione completa, così che i merozoiti si originano normalmente e compiono almeno il loro primo ciclo di penetrazione nei globuli rossi.

In questa prova il numero assoluto dei parassiti è ancora molto alto dopo 24 h dall'inoculazione: questo fatto può dipendere da varie ragioni che non è qui il caso di enumerare, perchè l'esperimento convalida egualmente i dati che si ricercano.

#### ESPERIMENTO N° 6 (v. tab. VII).

Inoculati 5 cg di Italchina per via intramuscolare mentre si è già iniziato il processo di maturazione delle rosette: in circolo pre-

valgono gli anelli e le forme ameboidi, le forme compatte e con due granuli di cromatina, qualche forma in divisione più avanzata e qualche rosetta.

TABELLA VII.

F O R M E R I S C O N T R A T E	NUMERO DELLE FORME TROVATE RIFERITE A 100 PARASSITI										
	Prima della inoculazione	d o p o									
		1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	6 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	
Anelli e forme ameboidi . . .	29	33	43	46	57	67	73	78	76	81	
Forme compatte. . . . .	57	48	38	35	20	20	16	11	14	9	
» con due granuli di cro- matina. . . . .	10	7	6	5	9	6	4	8	3	3	
» con tre . . . . .	1	1	1	4	2	—	—	—	—	—	
» con quattro . . . . .	1	1	5	5	8	4	3	1	4	6	
» con cinque . . . . .	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	
» con sei . . . . .	—	5	3	3	2	2	2	1	1	—	
» con sette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
» con otto . . . . .	1	4	—	1	1	1	2	—	2	1	
» con dieci. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Rosette. . . . .	1	—	3	1	1	—	—	1	—	—	
Numero di parassiti riferito a 100 globuli rossi. . . . .	13	21	24	25	32	35	26	27	27	13	

Dai dati soprariferiti si ricava :

1) che il numero assoluto dei parassiti è aumentato lievemente (perchè ormai già era iniziata la formazione dei nuovi parassiti) sino alla 6 h, dopo di che è diminuito progressivamente in seguito all'azione del farmaco;

2) che questo aumento è dovuto alla immissione in circolo di nuovi parassiti, i quali, penetrati nei globuli rossi, vi resistono più a lungo che non le altre forme;

3) che si ha progressivamente una diminuzione nel numero delle forme compatte e di quelle in divisione, pur permanendo in

questo esperimento, in percentuale relativamente elevata, anche dopo 24 h dall'inoculazione del medicamento.

Dopo 24 h tutte le forme in cui si presenta il parassita sono molto alterate e la loro persistenza potrebbe essere dovuta ad una diminuita attività fagocitaria del sistema reticolo endoteliale dell'animale. D'altra parte, per motivi che a noi sfuggono, non sempre i farmaci, da noi usati, agiscono nello stesso modo: è questo il caso della scimmia in esperimento, che dopo 5 giorni da questo primo trattamento recidivò e malgrado una nuova inoculazione di Italchina soccombette alla infezione.

In ogni modo, dalla prova in esame si può ugualmente concludere, come già nei casi precedenti, che il farmaco non ostacola la maturazione delle rosette e la penetrazione dei merozoiti nei globuli rossi; che il medicamento attacca in prevalenza le forme compatte, molto vicine alla divisione della cromatina e le forme con pochi granuli di cromatina. La percentuale relativamente alta (6%) di forme con 4 granuli di cromatina dopo 24 h dall'inoculazione del medicamento, si potrebbe spiegare con quanto si è detto più sopra oppure queste forme potrebbero rappresentare parassiti che hanno resistito all'azione del farmaco e che poi saranno la causa della rapida recidiva.

#### ESPERIMENTO N° 7 (v. tab. VIII).

Inoculati 5 cg di Italchina per via muscolare ad una scimmia (quella della prova precedente), recidivante dopo 5 giorni dal primo trattamento: il processo di maturazione completa delle rosette deve essere terminato (non ho potuto stabilire con precisione il momento della inoculazione, perchè la scimmia ha peggiorato bruscamente, per cui dovetti intervenire subito; ciò malgrado l'animale morì, sopraffatto dall'infezione) ed in circolo vi sono in prevalenza anelli e forme compatte giovani, che appartengono probabilmente ad un altro ciclo di maturazione (altrimenti non dovrebbero esserci, poichè la fase di maturazione del maggior numero dei parassiti è ancora lontana dall'inizio della divisione della cromatina), non seriato con il numero prevalente dei parassiti ed originato verosimilmente per l'azione del farmaco inoculato la prima volta.

TABELLA VIII.

F O R M E R I S C O N T R A T E	NUMERO DELLE FORME TROVATE RIFERITE A 100 PARASSITI									
	Prima della inoculazione	d o p o								
		1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	6 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>
Anelli e forme ameboidi . . .	69	75	78	75	71	58	50	50	—	—
Forme compatte. . . . .	18	19	21	20	26	32	37	27	—	—
» con due granuli di cro- matina. . . . .	3	1	5	—	2	5	8	7	—	—
» con tre . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» con quattro . . . . .	5	2	3	4	1	2	1	5	—	—
» con cinque . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» con sei . . . . .	1	2	1	1	—	1	—	—	—	—
» con sette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» con otto . . . . .	2	1	—	—	—	2	4	3	—	—
» con dieci. . . . .	—	—	1	—	—	—	—	2	—	—
Rosette. . . . .	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Numero di parassiti riferito a 100 globuli rossi. . . . .	25	26	25	22	22	25	26	28	morta	—

I dati che si possono dedurre da questo esperimento sono un poco diversi da quelli ottenuti in condizioni analoghe, dato il cattivo stato di resistenza dell'animale che ha dovuto soccombere alla infezione.

Infatti il numero assoluto dei parassiti non dimostra alcuna tendenza ad aumentare, e questo verosimilmente perchè ormai tutte le rosette sono maturate, ma nemmeno a diminuire: quest'ultimo risultato con ogni probabilità dipende dal fatto che il sistema reticolo endoteliale dell'animale o è già bloccato oppure è incapace ormai di esercitare qualsiasi azione di fagocitosi o di difesa, tanto è vero che la scimmia morì.

Ad ogni modo, considerando i dati ottenuti, si può desumere che il medicamento ha impedito alle forme quasi completamente ogni ulteriore sviluppo: dalle cifre parrebbe che vi sia stato un certo grado di maturazione di una parte degli anelli verso le forme compatte e da queste verso quelle in cui sono iniziati i primi processi di segmentazione.

ESPERIMENTO N° 8 (v. tab. IX).

Inoculati 5 cg di Italchina per via muscolare. L'animale è in cattive condizioni, causa la malattia: in circolo vi sono esclusivamente forme ameboidi e forme compatte.

TABELLA IX.

FORME RISCONTRATE	NUMERO DELLE FORME TROVATE RIFERITE A 100 PARASSITI									
	Prima della inoculazione	d o p o								
		1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	6 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>
Anellie e forme ameboidi . . .	31	51	39	—	40	31	43	34	41	41
Forme compatte. . . . .	69	49	58	—	56	64	43	58	55	52
» con due granuli di cromatina. . . . .	—	—	2	—	1	2	5	6	4	2
» con tre . . . . .	—	—	—	—	—	2	6	—	—	—
» con quattro . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	1	4
» con cinque . . . . .	—	—	1	—	—	1	—	2	2	—
» con sei . . . . .	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—
» con sette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
» con otto. . . . .	—	—	—	—	1	—	1	—	1	1
» con dieci. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rosette. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Numero di parassiti riferito a 100 globuli rossi. . . . .	31,4	28	18	—	20	17	5	7	4,7	4

Le cifre ricavate dall'esame degli strisci permettono di dire:

1) che il numero assoluto dei parassiti (inizialmente forse più alto che in realtà poichè il sangue, già molto anemizzato, rendeva difficile lo striscio) è andato diminuendo e che questa diminuzione si è resa più evidente dopo la sesta ora;

2) che il numero delle forme ameboidi e delle forme compatte, in gran parte ancora giovani, cioè lontane dall'inizio del processo di divisione della cromatina, si è mantenuto pressochè invariato, tenuto conto s'intende della diminuzione reale avvenuta nel numero assoluto.



La presenza delle poche forme in divisione credo si interpreti facilmente con il ritenerle forme sfuggite all'azione farmacologica dell'Italchina.

Questo esperimento oltre a convalidare quelli fatti precedentemente in simili condizioni, mi sembra specialmente istruttivo poichè l'animale trattato si trovava in cattive condizioni, tanto da far disperare di poterlo salvare. Il momento dell'intervento fu invece particolarmente propizio, così che il farmaco potè esplicare la sua attività nel modo migliore; quasi sicuramente, se le forme in circolo fossero state molto più avanti nel loro sviluppo, il medicamento non avrebbe salvato l'animale, che probabilmente non sarebbe stato in grado di resistere alla nuova generazione parassitaria.

## DISCUSSIONE

Dai miei esperimenti appare chiaramente che i merozoiti appena originati, liberi nel plasma sanguigno, non vengono affatto distrutti dal medicamento, come si riteneva, ma anzi presentano la maggiore resistenza alla sua azione, tanto che invadono come di norma i globuli rossi ed iniziano, seppure parzialmente, lo sviluppo che si arresta alle primissime fasi.

Gli anelli, le forme giovani appena penetrate nell'eritrocito oppongono pure al farmaco una resistenza relativamente notevole: infatti le alterazioni morfologiche, espressioni dell'azione farmacologica appaiono più tardi (verso la 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> ora) che non nelle altre forme e sono meno evidenti.

La sensibilità al medicamento cresce con il progredire dello sviluppo del parassita nel globulo rosso ed è massima nel momento in cui esso si prepara alla divisione della cromatina e nei primi stadi di questo processo (\*), mentre diminuisce quando la segmentazione sta per essere completata ed è nulla in quelle forme in cui, come

(\*) Una certa analogia con quanto avviene nei parassiti malarici rispetto alla chinina e ai prodotti acridinici si ha in altri parassiti e nelle cellule dei tessuti nei riguardi di altri prodotti farmacologici. Così la germanina non esercita una azione letale sui tripanasomi ma inibisce la loro divisione; qualche cosa di simile avviene per l'emetina contro l'*Entamoeba histolytica*; un altro alcaloide, la colchicina, agisce attaccando le cellule nello stato di divisione.

afferitava GOLGI, sono anche appena iniziate le trasformazioni protoplasmatiche che hanno per risultato finale la maturazione delle rosette e quindi l'origine della nuova generazione parassitaria.

Questa diversa sensibilità sarebbe in relazione con il contenuto emoglobinico della cellula parassitata oltre che con il fabbisogno di ossigeno da parte del parassita: sono questi gli elementi nuovi che si introducono nella interpretazione dell'azione dei medicamenti sui parassiti malarici e che ne rendono più facile la comprensione. Queste cognizioni trovano una conferma nei miei esperimenti.

Da essi si dovrebbe dedurre che i medicamenti antimalarici (chinina e prodotti acridinici) non agiscono sui parassiti negli stadi extraglobulari ed in quegli stadi in cui, per aver raggiunto lo sviluppo completo e per aver ormai distrutto il globulo rosso, non richiedono ulteriori quantità di ossigeno od almeno quantità così minime che possono essere provvedute anche dal sierro.

Fra gli stadi sensibili ai medicamenti i più vulnerabili sarebbero quelli in cui il parassita è, direi così, più attivo e quindi ha maggior bisogno di ossigeno: quelle fasi in cui, per ripetere ancora quanto affermò MARCHIAFAVA (3), il parassita si nutre e si sviluppa.

Dalle mie ricerche si dovrebbe dedurre il fatto che l'azione terapeutica non è dovuta all'azione diretta del medicamento contro i parassiti, ma alle proprietà legate alle cellule ospiti dei parassiti stessi.

La conseguenza immediata più importante di quanto ho sopra esposto è che una nuova strada si apre alla chemioterapia della malaria, nuovi orizzonti si schiudono per la ricerca dei preparati che esplicando la propria efficacia sui legami dell'emoglobina del globulo rosso con l'ossigeno, impediscano al parassita il suo sviluppo.

Concludendo: viene confermato il principio da me enunciato nella mia nota preventiva che la « *chinina ed i prodotti acridinici agiscono sui parassiti malarici solamente in presenza di emoglobina attiva* »; questi medicamenti non hanno quindi alcuna efficacia sugli stadi extraglobulari e nell'ultima fase intraglobulare, quando, avvenuta la scissione della cromatina, il globulo rosso si può considerare completamente distrutto.

Pertanto gli stadi più sensibili ai medicamenti sono quelli in cui il parassita richiede un maggior quantitativo di ossigeno.

## RIASSUNTO

L'A., studiando l'azione dell'Italchina su *P. knowlesi*, giunge alla conclusione che la chinina e i prodotti acridinici agiscono sui parassiti malarici solamente in presenza di emoglobina attiva.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di malariologia

## BIBLIOGRAFIA

- (1) GOLGI C., « Gli studi di Camillo Golgi sulla malaria, raccolti ed ordinati dal prof. A. Perroncito », Luigi Pozzi, Roma, 1929.
- (2) ANTOLISEI E., « L'ematozoa della quartana », La Riforma Medica 6, 74-76, 1890.
- (3) MARCHIAFAVA E. e BIGNANI A., « La infezione malarica », Vallardi, Milano, 1931.
- (4) CRAIG, (citato da Chopra).
- (4 b) CHOPRA R. N., « A handbook of tropical Therapeutics », Art Press, Calcutta, 1936.
- (5) DE SANT'ANA QUEIROZ J., « Sull'azione dei medicamenti nelle varie fasi di sviluppo dei parassiti malarici », Riv. Parassit. 2, 13-21, 1938.
- (6) MISSIROLI A., « Terapia della malaria », Estratto della II Ed. « Lezioni sulla Epidemiologia e Profilassi della malaria », Armani, Roma, 1941.
- (7) CHRISTOPHERS S. R. e FULTON J. D., « Observations on the respiratory metabolism of malaria parasites and tripanosomes », Ann. Trop. Med. and Parasit., 32, 43-75, 1938.
- (8) FULTON J. D. e CRISTOPHERS S. R., « The inhibitive effect of drugs upon oxigene uptake by trypanosomes (*Trypanosoma rhodesiense*) and malaria parasites (*Plasmodium gallinaceum*) », Ann. Trop. Med. and Parasit. 32, 77-93, 1938.
- (9) BINZ C., « Ueber Chinin und Blut », Arch. f. exp. Path. und Pharm., 1, 18-30, 1873.
- (10) ROSSBACH (citato da Binz), « Pharmakologische Untersuchungen », Würzburg, 1873-74.
- (11) POUCHET G., « Leçons de Pharmacodynamie et de matières médicales », III Série. O. Doin, Paris, 1902.
- (12) JACOBI L., « Zur Biologie und Pathologie des *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) », Arch. f. exp. Path. und Pharm., 196, 623-643, 1940.
- (13) ARCHETTI I., « L'azione dei medicamenti sui parassiti malarici », (Nota preventiva), Riv. Parassitologia 5, 129-131, 1941.