

83. G. MILAZZO, C. G. CASINOVI e Maria A. CIASCA. — Sul benzo-[a]-pirene irradiato — III. Irradiazione in presenza di ossigeno. (*)

Riassunto. — Sottoponendo all'azione dei raggi γ del ^{60}Co una soluzione di benzopirene in *n*-esano, si è messa in evidenza la formazione di tre prodotti principali, di cui due possono essere identificati come il benzo-[a]-piren-1,6-chinone ed il benzo-[a]piren-3,6-chinone, e si avanza una interpretazione plausibile dei fatti osservati.

Summary. — A solution of benzopyrene in *n*-hexane irradiated with ^{60}Co gave three products, two of which were identified as benzo-[a]-pyren-1,6-quinone and benzo-[a]-pyren-3,6-quinone. A possible explanation of this is suggested.

Proseguendo nello studio già intrapreso sull'effetto delle radiazioni ionizzanti sul benzopirene (1) è stata tentata l'identificazione dei composti isolati dopo un certo tempo di irradiazione e che presumibilmente sono i primi gradini di un processo di alterazione della molecola. Tale problema può essere aggredito in vari modi: data l'importanza che esso riveste quando l'irradiazione avviene nell'atmosfera (benzopirene proveniente dalla polverizzazione dei manti stradali, da incompleta combustione di carboni o nafta ecc.) è stata data la precedenza alle esperienze di irradiazione in presenza di ossigeno.

La tecnica seguita consiste nel sottoporre soluzioni sature dell'idrocarburo in esano, in assenza ed in presenza di una quantità di ossigeno (sufficiente ad ossidare tutto il benzopirene presente almeno a chinone) alle radiazioni gamma del cobalto 60. Tali soluzioni chiuse in ampolline di vetro saldate alla fiamma sono state irradiate con una dose di 23.10^6 R sufficiente a produrre una trasformazione apprezzabile.

Le fiale irradiate in assenza di ossigeno mostrano un colore giallo incupito e si presentano limpide e senza precipitato, mentre quelle esposte alle radiazioni nelle condizioni suddette in presenza di ossigeno han-

(*) La nomenclatura seguita in questa nota è quella sancita in A. M. Patterson e L. T. Capell: *The Ring Index* (Reinhold Publ. C., New York 1940, pag. 470), su raccomandazione della Commissione di Chimica Organica dell'Unione Internazionale di Chimica Pura ed Applicata ed adottata attualmente dai « Chemical Abstracts ». Trattasi però dello stesso composto indicato nelle note precedenti secondo la nomenclatura adottata da E. Clar: *Aromatische Kohlenwasserstoffe*, (Springer Verlag, Berlino, 1944, pag. 208).

no un colore giallo carico ed al fondo è chiaramente visibile un precipitato rosso scuro, apparentemente amorfo, misto a cristalli gialli. E' stato possibile identificare questi ultimi come benzopirene inalterato; mentre il precipitato rosso scuro è risultato costituito, per la massima parte, da una miscela di tre differenti prodotti la cui separazione è parzialmente resa possibile dall'impiego della cromatografia su allumina.

Ci è stato possibile constatare che una miscela di prodotti verosimilmente identici si forma per irradiazione delle soluzioni di benzopirene con U. V. in presenza di aria atmosferica e soprattutto per azione dell'anidride cromica a caldo in ambiente acetico (v. sotto). Si tratta quindi evidentemente di prodotti chinonici, i quali in base a quanto esposto nella parte sperimentale, possono ragionevolmente essere identificati con il benzo-[a]-pirene-1,6-chinone e con il benzo-[a]-pirene-3,6-chinone.

Non è stato possibile per il momento identificare un terzo prodotto, di colore giallo, la cui formazione ha luogo sia nella sopraddetta ossidazione cromica, che nella trasformazione radiochimica, però in entrambi i casi in quantità tanto piccola da essere appena sufficiente ad accertare, mediante le cromatografie su carta, che trattasi dello stesso composto.

PARTE SPERIMENTALE

A) *Materiale*: Il benzo-[a]-pirene è un prodotto della ditta Hoffmann-La Roche ed è stato ricristallizzato da benzene fino ad ottenere il p. f. di 177-8° dato dalla letteratura (2).

La sorgente di ^{60}Co , usata, della potenza di circa 90 curie è stata generosamente messa a nostra disposizione dallo « Institut du Radium » di Parigi. L'irradiazione è stata condotta fino a che la dose ricevuta dal campione fosse di 23.10 $^{\circ}\text{R}$.

Le soluzioni sono state preparate con esano spettroscopicamente puro e rinchiuso in fiale del tipo e delle dimensioni approssimative riportate nella fig. 1. Esse contenevano circa 3 cm³ di soluzione satura di benzopirene e circa 7 cm³ di O₂ a pressione ordinaria. Poichè la soluzione satura di benzopirene in esano contiene circa 2 mg di benzopirene per cm³, se ne ricava che la quantità di ossigeno presente è, grosso modo, 10 volte maggiore di quella minima necessaria per ossidare tutto il benzopirene a chinone.

Per confronto altre fiale cilindriche dello stesso diametro, senza la parte sferica terminale, caricate con uguale quantità di soluzione sono state completamente degassate, chiuse sotto il vuoto di una pompa a diffusione e irradiate nelle stesse condizioni per lo stesso tempo.

B) *Metodi*: Per la misura degli spettri si è fatto uso di spettrofotometri registratori Cary 11 e Beckmann DK2, usando come solventi esano, della stessa purezza di quello utilizzato per preparare le soluzioni da irradiare, ed alcool etilico di purezza spettrale.

Per le cromatografie su allumina si è adoperato il prodotto Merck (« secondo Brockmann ») senza ulteriori trattamenti; una misura di attività secondo BROCKMANN e SCHOLDDER (3) ha dato per essa un grado di attività compreso fra 1 e 2.

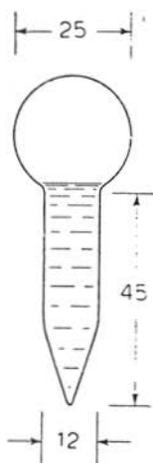


Fig. 1. - Fiale usate per la irradiazione in presenza di O₂ (misure in mm).

Per le cromatografie su carta si è fatto sempre uso della Whatman N. 1; data la idrofobicità delle sostanze in esame, si è costantemente fatto uso della tecnica della fase invertita, secondo le modalità ed i solventi appresso indicati:

- solvente N. 1: Alcool 70° saturo di olio di paraffina;
- » » 2: N, N-dimetilformamide-esano (4);
- » » 3: propilenglicol-toluene (5).

Come di norma accade, gli R_f in tale tipo di cromatografia non sono assolutamente riproducibili e per questo motivo le sostanze esaminate sono state sempre cromatografate in parallelo ai rispettivi controlli.

Il prodotto contenuto nella fiala chiusa sotto vuoto è stato prima esaminato allo spettrofotometro, dopo opportuna diluizione con esano.

Per evaporazione del solvente resta un residuo oleoso, del quale è stata tentata una cromatografia su carta che ha dato risultati non ulteriormente interpretabili. Dato ciò, dato l'aspetto dello spettro assolutamente atipico (v. sotto) e data la quantità estremamente piccola di residuo non è stato possibile approfondire l'esame del campione irradiato in assenza di aria.

Il contenuto della fiala irradiata in presenza di ossigeno è stato invece filtrato su filtro tarato, a setto poroso, (Jena G2), lavato con poche

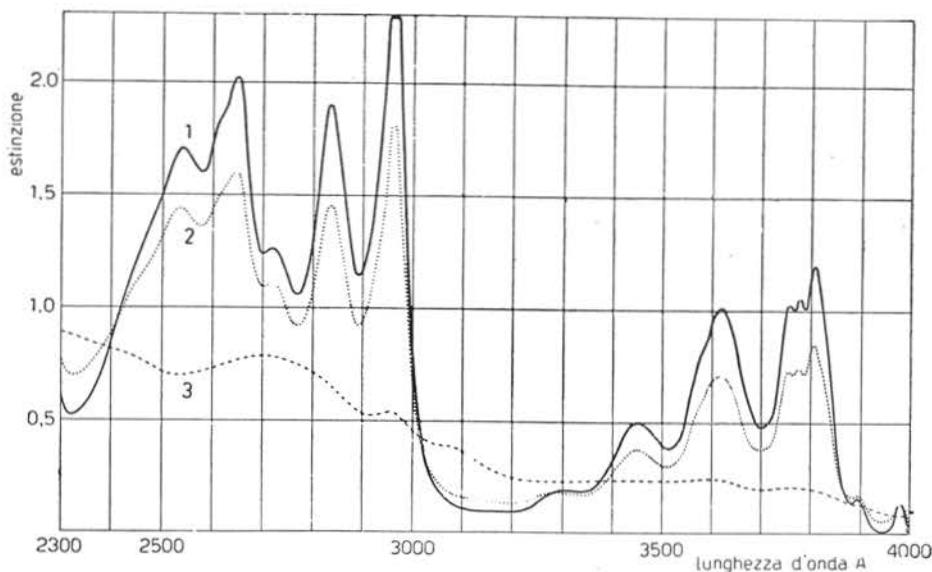


Fig. 2. - Spettri U.V. delle soluzioni di benzopirene in esano dopo irradiazione. Curva 1 — Testimone. Curva 2 — Benzopirene irradiato in presenza di O_2 . Curva 3 — Benzopirene irradiato in assenza di O_2 .

gocce di esano e, dopo essiccazione, pesato (mg 4,4). Della soluzione filtrata è stato fatto lo spettro dopo opportuna diluizione con esano. Tenendo conto che la concentrazione iniziale è sempre la stessa per tutti i campioni esaminati (benzopirene testimone, soluzione irradiata in presenza di ossigeno e soluzione irradiata dopo completo degassaggio) le diluizioni sono state fatte in modo che le concentrazioni finali, espresse in funzione di quella iniziale, fossero le stesse per i vari campioni. In tal modo gli spettri U. V. delle soluzioni irradiate e della soluzione testimone non irradiata sono confrontabili tra di loro anche dal punto di vista quantitativo. Tali spettri sono riprodotti nella fig. 2.

Il residuo è stato disciolto in benzene e passato su allumina in una colonna di $0,8 \times 6$ cm (*).

L'eluato è stato raccolto con collettore automatico di frazioni (*). Ciascuna frazione misurava circa $0,8$ cm³.

Ben presto si nota la formazione di quattro principali bande: la

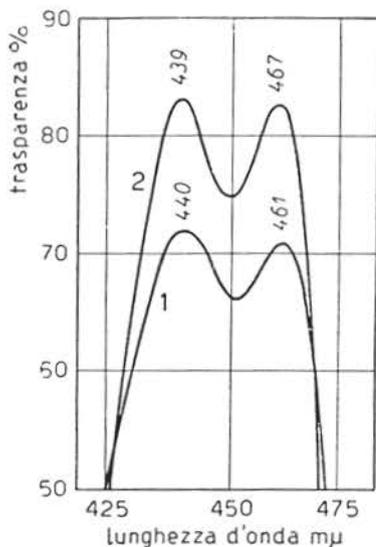


Fig. 3. - Spettro nel visibile del chinone 3-6 (curva 2) e del corrispondente prodotto di irradiazione (curva 1).

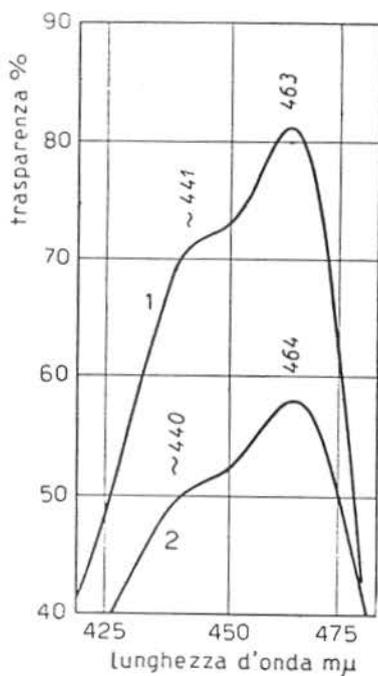


Fig. 4. - Spettri nel visibile del chinone 1-6 (curva 1) e del corrispondente prodotto di irradiazione (curva 2).

più veloce gialla, la seconda arancio, la terza rossa: una quarta infine, bruna, rimane adsorbita tenacemente sull'inizio della colonna.

Le frazioni centrali appartenenti alle bande gialla, rossa ed arancio sono state infine concentrate e riprese con alcool etilico: su di esse sono state eseguite le cromatografie su carta e gli spettri nel visibile (**).

(*) La differenza di procedura relativamente ai due campioni irradiati in presenza ed in assenza di ossigeno è stata suggerita dai risultati dell'esame spettrale, i quali hanno dimostrato come la soluzione irradiata in presenza di ossigeno non conteneva altro che benzopirene inalterato mentre i prodotti di trasformazione erano tutti nel residuo apparentemente amorfo.

(**) Ovviamente gli spettri sono stati eseguiti soltanto su quelle frazioni le cui cromatografie su carta avevano dimostrato che il prodotto disciolto era unitario.

E' stato anche tentato uno spettro U. V. ottenendo però curve atipiche dovute quasi sicuramente alla presenza di tracce di altre impurezze non eliminabili data l'impossibilità di ricristallizzare i solidi ottenuti da ciascuna frazione in quantità esigua. Tali spettri nel visibile sono stati ottenuti regolando le diluizioni in modo da riportare le escursioni strumentali entro il campo di misura. Non essendo però stato possibile determinare la concentrazione di tali soluzioni, gli spettri risultano confrontabili solo dal punto di vista qualitativo per accertare o meno la identità dei prodotti esaminati.

Avendo ragioni per ritenere ⁽¹⁾ che tra i prodotti di trasformazione del benzopirene irradiato in presenza di ossigeno fossero presenti chinoni, si è proceduto ad una ossidazione del benzopirene con anidride cromica in acido acetico ⁽⁷⁾.

Il prodotto greggio è stato sottoposto ad un processo di frazionamento ed identificazione analogo a quello testè descritto per il prodotto della irradiazione. Il frazionamento cromatografico su allumina ha dato, come per il prodotto irradiato, un prodotto giallo veloce in piccolissima quantità, un secondo prodotto arancio ed un terzo rosso, questi due ultimi rivelatisi identici ai chinoni 1,6 e 3,6 descritti da VOLLMAN et al. ⁽⁷⁾.

L'ulteriore confronto dei dati cromatografici e dei dati spettrali (figg. 3 e 4) dimostra come entro i limiti degli errori sperimentali, tali dati siano gli stessi per i prodotti provenienti dalla ossidazione con anidride cromica e rispettivamente dalla irradiazione in presenza di ossigeno rendendo pertanto plausibile l'identificazione.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI.

L'esame della fig. 2 mostra immediatamente un fatto apparentemente contraddittorio: la soluzione di benzopirene irradiato in presenza di ossigeno, che sicuramente è stato alterato tanto da presentare un deposito solido aderente al vetro della fiala, mostra lo spettro del benzopirene pulitissimo, identico a quello della soluzione testimone non irradiata, soltanto di intensità minore, e senza traccia alcuna di altri assorbimenti sovrapposti (curve 1 e 2) mentre la soluzione di benzopirene degassato e chiusa sotto vuoto mostra dopo irradiazione la completa scomparsa del benzopirene originario ed uno spettro assolutamente atipico (curva 3). D'altronde si è già precedentemente accennato al fatto che tra i prodotti di trasformazione del benzopirene irradiati in presenza di ossigeno, per confronto con i prodotti dell'ossidazione cromica del benzopirene, sono stati identificati come componenti principali, i due chinoni benzo-[a]-pirene-1,6-chinone e benzo-[a]-pirene-3,6-chinone, oltre un terzo composto

di colore giallo, avente gli stessi R_f dell'analogo composto giallo ottenuto dalla ossidazione cromica, del quale però non è stato possibile fare il confronto degli spettri per la esiguità del prodotto proveniente dalla irradiazione, -appena sufficiente, dopo la separazione cromatografica su allumina, per alcune cromatografie su carta.

In altre parole il benzopirene irradiato in assenza di ossigeno è stato completamente consumato e trasformato, mentre quello irradiato in presenza di ossigeno è stato consumato soltanto in parte, dando origine a prodotti insolubili nell'esano, tra i quali i due chinoni suddetti ed una terza sostanza, probabilmente anch'essa contenente ossigeno.

Una interpretazione plausibile dei fatti sperimentali osservati è la seguente.

E' noto che idrocarburi a nuclei aromatici condensati funzionano da spazzatori di radicali combinandosi agevolmente con essi: tipico in tal senso il comportamento dell'antracene, ⁽⁸⁾ per cui è probabile che anche il benzopirene possa agire da spazzatore di radicali. Date le bassissime concentrazioni del benzopirene la radiazione non agirebbe per azione primaria su di esso, mentre i numerosi radicali formati nelle radiolisi dell'esano ⁽⁹⁾, facilmente si combinerebbero col benzopirene formando una serie di prodotti ad alto peso molecolare, probabilmente polimeri (residuo oleoso ottenuto dalla evaporazione dell'esano delle fiale degasate) i cui singoli spettri di assorbimento sovrapposti l'uno all'altro danno origine all'andamento atipico di assorbimento gradualmente crescente verso l'U. V. come mostrato dalla curva 3 fig. 2.

In presenza di ossigeno anche quest'ultimo agirebbe da spazzatore di radicali ⁽⁹⁾ e si combinerebbe preferenzialmente con i radicali prodotti dalle radiolisi dell'esano dando origine a prodotti ossigenati vari tra cui anche a prodotti a tipo perossido. Anzi secondo N. A. BACH ⁽¹⁰⁾ il composto perossidico dovrebbe essere prodotto dalla reazione primaria di ogni radicale con l'ossigeno; successivamente tali composti perossidici si trasformerebbero dando origine ai prodotti carbonilici (o di altro tipo contenenti ossigeno) trovati sperimentalmente. La presenza dell'ossigeno pertanto proteggerebbe inizialmente il benzopirene dall'attacco da parte dei radicali liberi. Data però la sensibilità del benzopirene agli agenti ossidanti, i perossidi formati ossiderebbero il benzopirene presente dando origine ai composti ossigenati riconosciuti identici ai chinoni prodotti per ossidazione del benzopirene con anidride cromica.

L'insieme dei prodotti ossigenati formati dalle reazioni con ossigeno dei radicali provenienti dalle radiolisi dell'esano deve avere prevedibilmente una solubilità in esano molto minore di quella del benzopirene e dà origine al precipitato rosso scuro aderente al vetro delle fiale,

il che spiega la permanenza dello spettro pulito del benzopirene residuo non ancora consumato dai prodotti perossidici. I chinoni formati, come il benzopirene originario, sarebbero essi stessi resistenti alla azione primaria delle radiazioni.

Questa interpretazione non esclude però una ossidazione primaria tra le molecole del benzopirene e l'ossigeno presente, ossidazione che, sia pur con molta lentezza ha luogo anche in soluzioni semplicemente esposte all'azione dell'atmosfera e della luce naturale.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica e Laboratori di Chimica biologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MILAZZO G. - *Ricerca sci.*, 14: 243 (1943); MILAZZO G. e FREDIANI H. A. - *Gazz. chim. ital.*, 82: 609 (1932).
- (²) CLAR E. - *Aromatische Kohlenwasserstoffe* Springer Verlag, Berlino, 209 (1944).
- (³) BROCKMANN H. e SCHODDER H. - *Ber.*, 74: 73 (1941).
- (⁴) TARBELL D. S. e al. - *J. am. chem. Soc.*, 77: 767 (1933).
- (⁵) ZAFFARONI A. - *Recent Progress in Hormone Res.*, 8: 64 (1953).
- (⁶) FRANK M. - *Rend. Ist. sup. Sanità*, 17: 833 (1934).
- (⁷) VOLLMANN H., BECKER H., CORELL M. e STREECK H. - *Liebigs Ann.*, 331: 31, 129 (1937).
- (⁸) Cfr. per es. CHARLESBY A., DAVISON W. H. e LLOYD D. G. - *J. phys. Chem.*, 63: 970 (1939).
- (⁹) I lavori pubblicati sulla radiolisi di liquidi organici ed in particolare di idrocarburi, sono molto numerosi, la migliore fonte complessiva di informazioni è pertanto costituita dalla serie di articoli riassuntivi « Radiation Chemistry » pubblicato in ciascun numero della *Annual Review of Physical Chemistry* che riporta integralmente tutta la bibliografia utilizzata per ciascun articolo.
- (¹⁰) BACH N. A. - *Radiat. Res. Suppl.*, 1: 490 (1939).

84. C. G. CASINOVI, J. A. GARBARINO (*), e G. B. MARINI-BETTOLO. — La struttura dell'alcaloide dello *Skytanthus acutus* Meyen. (**)

Riassunto. — Dallo *Skytanthus acutus* Meyen, una Apocinacea del Chile, è stata estratta una base volatile, la skytanthina, $C_{11}H_{21}N$, che si può considerare un alcaloide monoterpenco.

A questo è stata attribuita la struttura di una ciclopentano-piperidina, in stretta relazione biogenetica con la iridomirmecina e gli acidi nepetalici.

La skytanthina rappresenta il terzo esempio di alcaloidi monoterpenci trovati in natura.

Summary. — A volatile base, skytanthine $C_{11}H_{21}N$, which can be considered as a monoterpene alkaloid, was extracted from *Skytanthus acutus* Meyen.

For this new substance we have established the structure of a cyclopentane piperidine, in close biogenetical relation with iridomyrmecin and nepetalic acids.

Skytanthine represents the third example of monoterpene alkaloids found in nature.

Nel corso delle ricerche sui principi attivi delle piante sudamericane (1, 2) abbiamo desiderato prendere in esame, dato l'interesse che presentano gli alcaloidi delle Apocinacee, una specie chilena, lo *Skytanthus acutus* Meyen, che vegeta nella zona della Serena (3).

Questa pianta appartiene ad un genere piuttosto raro delle Apocinacee, e costituisce insieme con l'*Elytropus chilensis* uno dei due rappresentanti di questa famiglia nel Cile.

Lo *Skytanthus*, noto con il nome volgare di Cuernecillo viene impiegato nella medicina popolare per le sue proprietà.

Abbiamo osservato che le foglie della pianta ad un esame preliminare mettevano in evidenza la presenza di alcaloidi. Ne abbiamo pertanto fatto l'estrazione con metanolo e l'alcaloide è stato separato approfittando della sua volatilità in corrente di vapore.

L'alcaloide *Skytanthina* che si ottiene è un liquido incolore che bolle a pressione ridotta a 62°C a 1,5 mm Hg.

(*) Universidad Católica di Santiago, ospite dell'Istituto con una borsa di studio del Governo Italiano.

(**) Una comunicazione preliminare di queste ricerche è stata presentata in Chemistry and Industry.

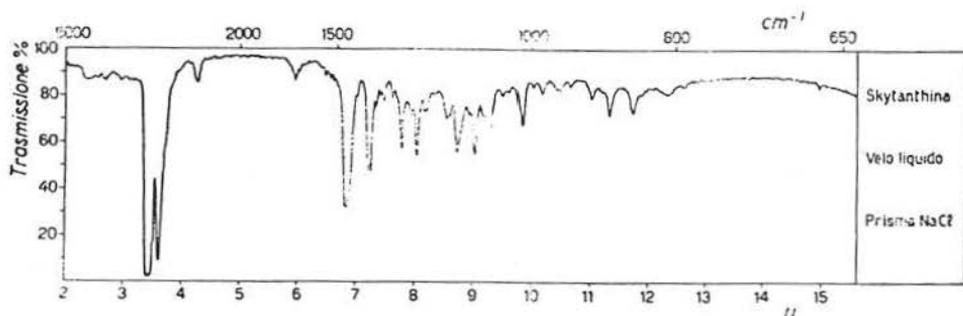


Fig. 1. - Spettro I.R. della Skytanthina.

Ne abbiamo saggiato l'unitarietà effettuando sia una serie di cromatografie su carta con diversi solventi, sia una microcromatografia in fase gassosa.

La *skytanthina* dà un cloridrato ed un bromidrato igroscopici, ma un picrato ed un picrolonato cristallini.

Attraverso il picrato è possibile pertanto purificarlo. Con ioduro di metile dà uno iodometilato cristallino. Dai dati analitici è possibile calcolare per la *skytanthina* una formula grezza di $C_{11}H_{21}N$, la presenza di un gruppo $N-CH_3$ e di due gruppi $C-CH_3$.

Sul composto purificato sono stati eseguiti gli spettri U.V., I.R. e R.M.N. (***) . Nell'U.V. non si ha assorbimento caratteristico. Lo spettro I.R. presenta come bande più intense quelle delle vibrazioni di valenza del CH paraffinico ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$) e quelle vibrazioni di deformazione del gruppo CH_3 (1380 e 1460 cm^{-1}), (fig. 1).

Lo spettro R.M.N. mostra (vedi fig. 2) un picco molto netto a 7,78

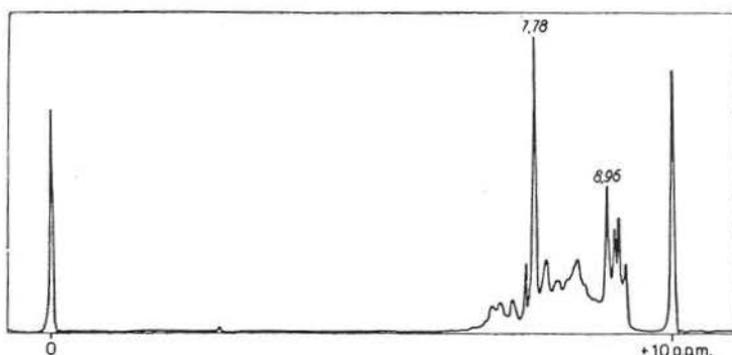


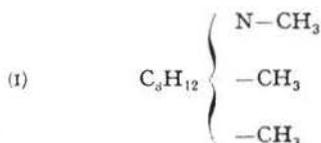
Fig. 2. - Spettro R.M.N. della Skytanthina.

(***) R.M.N. Risonanza magnetica nucleare indicata nei testi inglesi con n.m.r.

p.p.m. attribuibile al gruppo N-CH₃ ed un gruppo di picchi, di cui il maggiore si trova a 8,96 p.p.m. e che si attribuisce a due CH₃ alifatici.

Tentativi d'idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C, Pt o PtO₂ non hanno avuto esito positivo.

Si può pertanto considerare la skytanthina una base terziaria saturata biciclica:



Per deidrogenazione con Pd/C al 10% per 4 ore a 300°C, la skytanthina dà con buone rese una base liquida che è stata purificata attraverso il picrato per ripetute cristallizzazioni dall'alcool e per la quale si

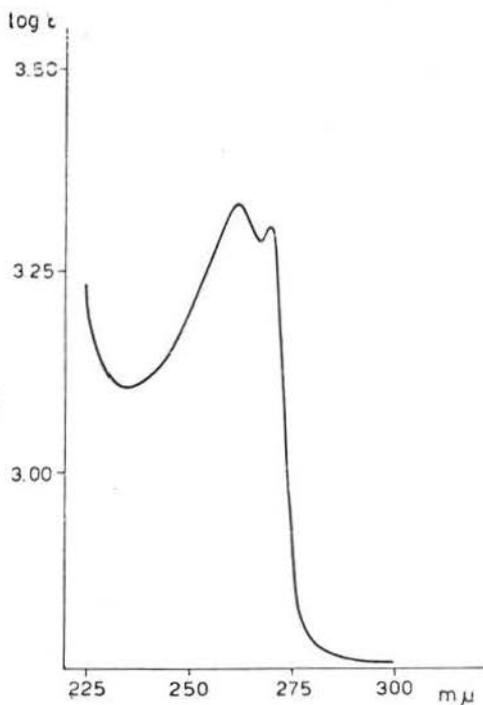


Fig. 3. - Spettro U.V. della base di deidrogenazione della Skytanthina.

calcola la formula grezza di C₁₀H₁₃N. Lo spettro U.V. di questo composto mostra la struttura di una piridina sostituita (Fig. 3) più probabilmente in 3-4. Per ossidazione permanganica si ottiene da essa una mi-

scela di acidi nella quale per cromatografia su carta è stato possibile dimostrare l'assenza di acidi piridin-monocarbossilici. Si conferma perciò che la base di deidrogenazione deve essere una piridina polisostituita.

Dallo spettro di risonanza magnetica nucleare (R.M.N.) (fig. 4), si possono trarre altre interessanti deduzioni:

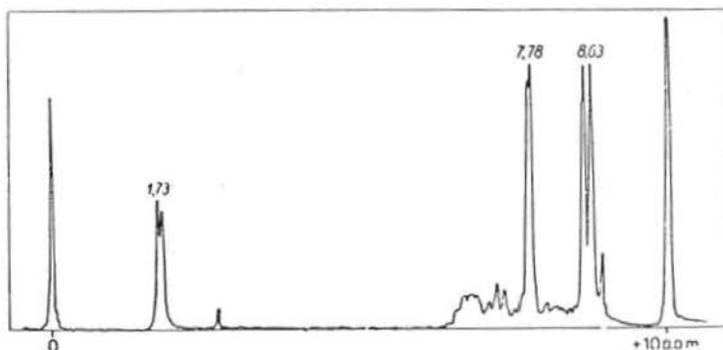


Fig. 4. - Spettro R.M.N. della base di deidrogenazione della Skytanthina.

1) la presenza di un gruppo $-\text{CH}_3$ direttamente legato al nucleo aromatico (massimo a 7,78 p.p.m.).

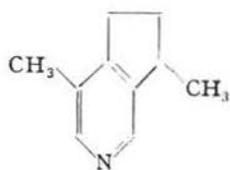
2) La presenza di un secondo gruppo $-\text{CH}_3$ cui si deve attribuire il doppietto a 8,63 p.p.m.; dato che la posizione di un metile alifatico si trova generalmente a 8,9 - 9,0 p.p.m., questo secondo gruppo si deve trovare separato dal nucleo eterociclico da un solo atomo di carbonio, al quale si deve trovare unito un solo atomo di idrogeno.

3) Il massimo a 1,73 p.p.m. è caratteristico degli atomi di idrogeno in α nel nucleo piridinico: paragonando l'area di questo con quella dei precedenti si deduce che entrambe le posizioni α sono libere.

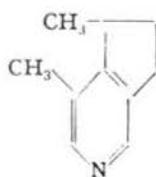
4) Sono assenti massimi attribuibili ad idrogeni vinilici: la base di deidrogenazione non contiene perciò doppi legami e quindi durante la deidrogenazione il gruppo carbociclico resta inalterato.

E' pertanto possibile concludere, che il prodotto di deidrogenazione deve essere una piridina trisostituita in 2, 3, 4. Uno di questi sostituenti deve essere un gruppo CH_3 , mentre gli altri due devono essere uniti tra loro in modo da formare un anello carbociclico, che risulta essere a cinque termini.

Dato che per ovvie ragioni, l'anello carbociclico non può formarsi che tra due posizioni vicinali, sono possibili per la base di deidrogenazione le seguenti formule:

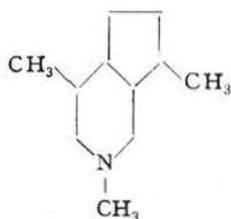


(ii)

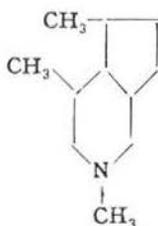


(iii)

e pertanto alla skytanthina spetterebbe una delle seguenti strutture:



(iv)



(v)

Considerando che solo la struttura IV corrisponde alla regola isoprenica e che per essa sono stati trovati in natura altri precedenti [quali la iridomirmecina (⁴), la isoiridomirmecina (⁵), il nepetalattone (⁶)] riteniamo che la IV sia la formula più probabile.

A questo punto della ricerca abbiamo appreso dalla letteratura il lavoro di SAKAN (⁷) e collaboratori sull'actinidina, una base isolata da *Actinidia polygama* Mig. e rispondente alla formula da noi proposta per la base deidrogenata.

Il confronto degli spettri U.V. ed I.R. della nostra base di deidrogenazione ed i rispettivi spettri di un campione di actinidina, gentilmente inviatoci dal prof. Sakan, dimostrano l'identità delle due sostanze.

Pertanto si può affermare che alla skytanthina spetti la formula proposta IV. Si tratta cioè del terzo esempio di alcaloidi monoterpeneici trovati in natura e del primo esempio di alcaloide monoterpeneico delle Apocinacee.

Resta ancora da stabilire la configurazione di questa sostanza ed a questo scopo abbiamo in corso sintesi a partire dalla iridomirmecina e dal nepetalattone.

PARTE SPERIMENTALE

PIANTA.

La pianta *Skytanthus acutus* Meyen è stata raccolta nei mesi maggio-settembre nella zona della Serena e determinata dalla Prof.ssa Rebeca de Vargas, Departamento de Botanica del Museo de Historia natural de Santiago (Quinta Normal), che qui desideriamo ringraziare.

ESTRAZIONE.

Kg 2,5 di foglie di *Skytanthus acutus* Meyen seccate a 40-50°C; sono state estratte in Soxhlet con 5 l. di metanolo puro per tre volte.

La soluzione metanolica è stata portata a secchezza. Si ottengono così 1,7 kg di un residuo molto ricco di clorofilla che dà netta reazione degli alcaloidi con i reattivi di Meyer e Tanret.

Per estrarre l'alcaloide si aggiunge un eccesso di soluzione di NaOH al 40% e si distilla in corrente di vapore. L'alcaloide volatile passa nel distillato acquoso che si estrae con etere. La soluzione eterea si dibatte con acido cloridrico diluito, che quindi si alcalinizza nuovamente e si riprende con etere.

Dopo avere allontanato il solvente, il residuo si rettifica nel vuoto. Si ottengono così 6,94 g di alcaloide grezzo a p.eb. 62° a 1,5 mm.

SKYTANTHINA.

L'alcaloide è un olio incolore, con odore che ricorda la Bz-tetraidrochinolina. P.eb. 62°C a 1,5 mm Hg. $n_D^{20} = 1,4709$.

Il composto ha dato all'analisi:

trov. % : C 78,92; H 12,53; N 8,75;
per $C_{11}H_{12}N$ calc. : 78,97; 12,25; 8,37.

Il composto si comporta come una base forte: il cloridrato ed il bromidrato sono igroscopici.

Il picrolonato cristallizza dall'alcool etilico e fonde a 210-218°.

All'analisi ha dato:

trov. % : C 58,95; H 7,04; N 16,82;
per $C_{11}H_{21}N.C_{10}H_8N_4O_5$ calc. % : 58,95; 6,77; 16,23.

Il picrato, cristallizza dall'alcool e fonde a 127-128°.

All'analisi ha dato:

trov. % : C 51,75; H 6,27; N 14,18;
 per $C_{11}H_{21}N.C_6H_5N_3O_7$ calc. : 51,61; 6,10 14,14.

Per ottenere l'alcaloide ad elevato grado di purezza si cristallizza il picrato fino a p.f. costante e quindi si rigenera la base facendo passare la soluzione cloroformica del picrato attraverso una colonnina di allumina.

Il composto addiziona in soluzione acetonica a freddo ioduro di metile per dare uno iodometilato, che cristallizzato dall'alcool fonde a 305-308°.

Il composto all'analisi ha dato:

trov. % : C 46,66; H 7,79; N 4,77 I 42,52-40,18;
 per $C_{11}H_{21}N.CH_3I$ calc. : 46,80; 7,82; 4,53; 41,04.

La skytanthina sottoposta ad idrogenazione catalitica a freddo ed a 60°, in presenza di catalizzatori (Pd/C al 10% oppure Pt o PtO_2) non addiziona idrogeno.

DEIDROGENAZIONE DELLA SKYTANTHINA.

1,069 g di Skytanthina sono stati riscaldati in tubo chiuso con 2,170 g di carbone palladiato al 10% per 4 ore a 300°C.

Al termine della reazione il prodotto è stato ripreso con etere, distillato sotto vuoto, trasformato in picrato, ricristallizzato da etanolo sino a p.f. costante (143-8°).

Il picrato è stato sottoposto all'analisi ed ha dato:

trov. % : C 50,85; H 4,27; N 15,27;
 per $C_{10}H_{13}N.C_6H_5N_4O_5$ calc. : 51,06; 4,29; 14,89.

La base è stata ottenuta dal picrato come descritto già per la skytanthina.

OSSIDAZIONE CON $KMnO_4$.

La demolizione è stata effettuata nelle condizioni descritte da PRELOG (*). L'esame cromatografico su carta degli acidi risultanti dalla reazione indica la non identità di questi con gli acidi piridin-monocarbossilici usati come controllo.

IDENTIFICAZIONE CON LA ACTINIDINA.

Il confronto tra la base di deidrogenazione dell'alcaloide e un campione di actinidina pura ottenuta dal prof. Sakan è stato effettuato su velo liquido con la base di deidrogenazione all'I.R. con l'apparecchio Perkin Elmer 21: le due curve coincidono perfettamente.

Pure coincidenti nei limiti degli errori sperimentali sono gli spettri U.V. in alcool, eseguiti allo spettrofotometro Beckman DK 2.

SPETTROSCOPIA.

Gli spettri U.V. sono stati eseguiti in soluzione alcoolica con un apparecchio Beckman DK 2.

Gli spettri I.R. sono stati eseguiti in velo liquido con un apparecchio Perkin-Elmer 21.

Gli spettri R.M.N. — sono stati eseguiti con apparecchio Varian 60 cicli in soluzione standard.

PROPRIETA' FARMACOLOGICHE.

In altra sede sarà riferito sulle proprietà farmacologiche della Skytanthina.

• • •

Gli spettri R.M.N. sono stati effettuati con apparecchio Varian all'Università di Fredericton (New Brunswick), Canada per i quali ringraziamo il Prof. K. Wiesner oltre che per l'interesse con il quale ha seguito questo lavoro. Ringraziamo anche il Prof. T. Sakan dell'Institute of Polytechnico Osaka City University per il gentile invio del campione di Actinidina ed il Prof. E. Bianchi dell'Universidad Catolica di Santiago per l'invio dell'estratto della pianta.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica Biologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MARINI-BETTOLO G. B. e SCHMUTZ J. - *Helv. chim. Acta*, 42: 2146 (1959).
- (²) BIANCHI E., DIAZ F. e GARRARINO J. A. - *Gazz. chim. ital.*, 90: 894 (1960).
- (³) ENGLER A. e PRANTL K. - *Die Natürlichen Pflanzfamilien*, 4: (1897).
- (⁴) PAVAN M. - *Ric. Scient.*, 19: 1011 (1949); FUSCO R., TRAVE R. e VERCELLONE A. - *Chim. Ind.*, 37: 938 (1935).
- (⁵) McELVAIN S. M., BRIGHT R. D. e JOHNSON P. R. - *J. am. chem. Soc.*, 63: 1338 (1941).
- (⁶) CAVILL G. W. K. e LOCKSLEY H. D. - *Aust. J. Chem.*, 10: 352 (1937).
- (⁷) SAKAN T., FUYINO A., MURAI F., BUTSUGAN Y. e SUZUI A. - *Bull. chem. Soc. Jap.*, 32: 345 (1959).
- (⁸) PRELOG V. e SZPILFOGEL S. - *Helv. chim. Acta*, 28: 1684 (1945).

85. M. QUINTILIANI, M. BOCCACCI e L. TENTORI. — Incorporazione del P^{32} nell'acido desossiribonucleico di alcuni organi radio-sensibili in ratti trattati con acido iodoacetico e con raggi X.

Riassunto. — Gli autori hanno studiato nel ratto l'effetto dell'acido iodoacetico e dei raggi X sulla incorporazione del P^{32} nell'acido desossiribonucleico di alcuni organi radiosensibili. Essi hanno potuto confermare il ben noto effetto di inibizione esplicito dai raggi X ed inoltre hanno trovato che l'acido iodoacetico anche a dosi subletali determina una diminuzione significativa della incorporazione del P^{32} nell'acido desossiribonucleico di detti organi.

Nel trattamento combinato con acido iodoacetico e raggi X, si ha un effetto di inibizione di entità pressochè corrispondente alla somma degli effetti ottenuti con i singoli trattamenti.

Summary. — The effect of iodoacetic acid and of X-rays on the incorporation of p^{32} into the deoxyribonucleic acid of some radiosensitive organs has been studied in the rat.

The inhibitory effect of X-rays has been confirmed. Moreover it has been demonstrated that iodoacetic acid, even at sublethal doses, induces a significant decrease of P^{32} incorporation into DNA of the organs examined.

In combined treatment with iodoacetic acid and X-rays the inhibition nearly corresponds to the sum of the effects obtained by single treatments.

Nel quadro delle nostre ricerche sul meccanismo della radio-sensibilizzazione, abbiamo recentemente confermato che la somministrazione di acido iodoacetico prima dell'irradiazione totale del corpo aumenta in modo nettamente significativo la mortalità a 30 giorni nel topo, e discusso se tale effetto può essere considerato come una vera sensibilizzazione alle radiazioni (¹).

Abbiamo ora intrapreso uno studio volto ad indagare il meccanismo attraverso il quale tale effetto può realizzarsi. Un primo approccio è stato quello di studiare l'andamento della risposta alle radiazioni in alcuni organi radiosensibili quali la milza, il timo e l'intestino tenue negli animali trattati con acido iodoacetico. Infatti, com'è già stato rilevato da

altri autori (2), l'acido iodoacetico è in grado da solo di provocare delle chiare lesioni anatomiche in questi organi. Noi abbiamo potuto osservare che tali lesioni sono più evidenti nel ratto che nel topo e che dipendono dalla via di somministrazione della sostanza. Pertanto, nella presente ricerca, abbiamo scelto il ratto come animale da esperimento e saggiato tanto la via di somministrazione intraperitoneale che quella endovenosa. Nelle prime esperienze eseguite secondo la direttiva suindicata abbiamo osservato un certo potenziamento di alcuni effetti delle radiazioni negli organi considerati, in animali pre-trattati con acido iodoacetico. Così nel topo l'involuzione del timo e della milza sembra lievemente più intensa e nel ratto la perdita di sodio dall'intestino è notevolmente più grave (3).

E' noto che gli effetti delle radiazioni sugli organi linfoidei e sulla mucosa intestinale sono attribuiti al blocco della produzione di nuovi elementi cellulari. Non è ancora ben chiaro quale sia il meccanismo attraverso il quale si arriva ad un tale effetto. Tra i vari fatti sperimentali osservati sembra tuttavia di notevole interesse l'inibizione della incorporazione di vari precursori nell'ADN (*) dimostrata con lo impiego di prodotti marcati, sia in vari tessuti animali e vegetali che nei microrganismi e nelle cellule in coltura (4).

Noi abbiamo pertanto voluto esaminare gli effetti del trattamento con acido iodoacetico sulla entità della inibizione che l'irradiazione provoca nella incorporazione di P^{32} in alcuni organi radiosensibili del ratto. L'effetto del trattamento con il solo AIA (*) è stato studiato anche sul fegato rigenerante di ratto, poichè questo tessuto, nelle prime fasi della rigenerazione, presenta un certo grado di sincronismo nella divisione cellulare; il che offre degli evidenti vantaggi per la interpretazione del meccanismo di azione di sostanze che interferiscono con il ciclo della divisione cellulare.

MATERIALE E TECNICA SPERIMENTALE

MATERIALE BIOLOGICO. — Per le esperienze sulla incorporazione del P^{32} nel timo, milza ed intestino sono stati usati ratti albini maschi del ceppo Wistar Glaxo, allevato nel nostro Istituto, del peso di 70-90 g.

Per le esperienze con il fegato rigenerante sono stati usati ratti al-

(*) Si sono usate le seguenti abbreviazioni: ADN per l'acido desossiribonucleico; AIA per l'acido iodoacetico.

bini maschi del ceppo Wistar Philadelphia, allevato nel nostro Istituto, del peso di 200-300 g.

Acido iodoacetico. — E' stato usato un prodotto della Ditta Light and Co. Ltd. con un contenuto in iodio libero inferiore a 0.02%.

P^{32} — E' stato usato un prodotto « Carrier Free », fornito dal « Radio Chemical Centre » di Amersham, contenente un'attività di $1\text{mc}/1\text{ cm}^3$ di soluzione. Tale soluzione originale era opportunamente diluita per aggiunta di una soluzione di fosfato monopotassico inerte, in modo da avere una concentrazione in P^{31} di $100\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$ della soluzione finale da inoculare. Tale diluizione con il fosfato inerte è stata ritenuta necessaria per evitare i fenomeni di adsorbimento che si verificano con il « Carrier Free » sulle pareti di vetro delle siringhe.

Abbiamo, infatti, potuto constatare che la soluzione di « Carrier Free » dopo permanenza di 1 ora in comuni siringhe da tuberculina di 1 cm^3 può perdere sino al 20% della sua attività. Tali perdite, naturalmente, non si verificano quando è presente il fosfato inerte nella concentrazione indicata. La presenza di quest'ultimo non modifica l'entità della incorporazione del P^{32} nell'ADN degli organi esaminati.

Trattamento con i raggi X. — L'irradiazione è stata effettuata con un apparecchio Picker e con i seguenti dati: 220 kV, 15 mA con filtrazioni aggiuntive di 0,5 mm Cu e 1,0 mm Al, alla intensità di 26 r/minuto, per una dose totale di 150 r. (*).

Fegato rigenerante. — L'epatectomia è stata eseguita secondo il metodo di HIGGINS e ANDERSON⁽⁵⁾, asportando i lobi sinistro e intermedio. Dopo l'intervento, gli animali sono stati mantenuti con una soluzione di glucosio al 20%. Il P^{32} è stato somministrato per via intramuscolare alla dose di 50 μc per ratto. Gli animali sono stati sacrificati con etere due ore dopo la somministrazione del P^{32} assumendo che il valore della incorporazione osservato fosse espressione della sintesi dell'ADN al tempo medio di permanenza nell'organismo del precursore marcato. L'acido iodoacetico è stato somministrato, per via intraperitoneale, alla dose di 40 mg per kg di peso corporeo, 30 minuti prima del P^{32} .

Dopo la morte degli animali si procedeva rapidamente al loro disseguamento per recisione della vena porta e della vena cava inferiore

(*) Gli autori ringraziano sentitamente il Sig. L. Pugliani, dei Laboratori di Fisica, per la valida assistenza durante le operazioni di irradiazione.

e quindi all'escissione del fegato prelevando un frammento di circa 100 mg dal lobo destro per la determinazione dell'attività specifica dell'ortofosfato.

Timo, milza, intestino. — Gli animali erano tenuti digiuni per 12 ore prima dell'inizio dell'esperimento. Il P^{32} è stato somministrato per via intramuscolare alla dose di 25 μ c per ratto. La soluzione di acido iodoacetico (sol. 1%, pH 7) è stata somministrata 30 minuti prima del P^{32} . Negli animali irradiati l'AIA è stato somministrato 30' prima dell'irradiazione ed il P^{32} subito dopo l'irradiazione, o dopo 4 ore da questa. Due ore dopo l'inoculazione del P^{32} gli animali sono stati sacrificati con etere e subito dopo la morte sono stati rapidamente prelevati il timo la milza e 15 cm d'intestino tenue a partire dal piloro. Gli organi di ciascun gruppo di 4 animali erano riuniti e sottoposti insieme al trattamento di estrazione dell'ADN. L'attività specifica dell'ortofosfato del sangue è stata determinata prelevando campioni di 0,4 cm³ dalla vena cava inferiore di ciascun animale e riunendo i quattro campioni provenienti dagli individui costituenti ciascun gruppo sperimentale.

Estrazione dell'ADN e determinazione della sua attività specifica. — È stato usato il metodo di Levene modificato da Klein e Beck, seguendo i dettagli riportati da KELLY e JONES (6).

Al termine delle operazioni di purificazione, il residuo di ADN è stato sciolto in NaOH N/10. Su un'aliquota di tale soluzione è stato determinato il fosforo totale con il metodo di BERENBLUM e CHAIN (7), mentre su un'altra aliquota deposta in scodellino si procedeva alla misura della radioattività con un tubo di Geiger a finestra terminale di mica. La radioattività specifica è stata espressa in impulsi per minuto per μ g di fosforo e poi corretta per la radioattività specifica dell'ortofosfato del sangue, del fegato, o del timo a seconda dei casi, secondo la formula:

$$\frac{\text{Radioattività specifica dell'ADN}}{\text{Radioattività specifica dell'ortofosfato}} \times 100 = \text{Radioattività specifica corretta dell'ADN}$$

Tale correzione, fondata sul presupposto che vi sia una correlazione diretta e lineare tra concentrazione del P^{32} come ortofosfato nei tessuti ed entità della incorporazione del medesimo nell'ADN, è oggi comunemente accettata dai vari autori e si ritiene che abbia più valore di una correzione in funzione del peso corporeo.

Determinazione dell'attività specifica dell'ortofosfato. — Per la determinazione del fosforo inorganico è stato seguito il metodo di BE-

TABELLA I

Radioattività specifica corretta dell'ADN estratto da milza, intestino e timo di animali normali e trattati con AIA, due ore dopo la somministrazione di 25 µc di P³² per ratto (valore medio ± errore standard della media) (*).

	I		II		III	
	Controlli	AIA 20 mg/Kg intrapertoneo	Controlli	AIA 40 mg/Kg intrapertoneo	Controlli	AIA 40 mg/Kg endovena
Milza	3,55 ± 0,52 (t = 1,602 ; 0,1 < P < 0,2)	2,49 ± 0,41	3,85 ± 0,52 (t = 2,550 ; 0,02 < P < 0,05)	2,32 ± 0,30	8,28 ± 0,61 (t = 3,423 ; 0,01 < P < 0,05)	5,22 ± 0,57
Intestino	2,00 ± 0,33 (t = 2,426 ; 0,05 < P < 0,1)	1,67 ± 0,29	2,32 ± 0,26 (t = 3,192 ; 0,01 < P < 0,02)	1,49 ± 0,18	2,44 ± 0,19 (t = 2,450 ; 0,05 < P < 0,1)	1,95 ± 0,11
Timo	2,68 ± 0,11 (t = 2,260 ; 0,05 < P < 0,1)	2,14 ± 0,21	2,77 ± 0,18 (t = 3,969 ; 0,01 < P < 0,02)	1,92 ± 0,14	3,33 ± 0,14 (t = 3,956 ; 0,001 < P < 0,01)	2,42 ± 0,16
Ortolfosfato nel sangue (**)	351 ± 37	349 ± 36	326 ± 65	390 ± 50	340 ± 49	358 ± 54
Ortolfosfato nel timo (**)	387 ± 57	359 ± 40				

(*) Ogni dato rappresenta la media di 4 determinazioni, ciascuna delle quali ottenuta dagli organi riuniti di 4 animali.

(**) La radioattività specifica è espressa in i.p.m./µg di P.

KENBLUM e CHAIN (7). La radioattività è stata determinata su una aliquota della fase isobutanolica. La radioattività specifica è espressa in i.p.m./ μ g di P.

RISULTATI

Effetto dell'acido iodoacetico sulla incorporazione del P^{32} nell'ADN del timo, milza e intestino. — Nella tabella I sono riportati i valori della radioattività specifica corretta dell'ADN estratto da timo, milza e intestino di ratti normali e trattati con acido iodoacetico. Nella stessa tabella sono riportati i valori della radioattività specifica dell'ortofosfato del sangue e del timo.

Si può notare che l'acido iodoacetico, alla dose di 40 mg/kg, somministrato sia per via intraperitoneale che per via endovenosa, inibisce notevolmente l'incorporazione del P^{32} nell'ADN. Le differenze tra gli animali di controllo e quelli trattati risultano in ogni caso significative. Alla dose di 20 mg/Kg per via intraperitoneale si nota ancora un certo effetto di inibizione, ma le differenze non risultano significative, oppure sono al limite della significatività. Per l'intestino infatti il t trovato è di 2,426 mentre per $P = 0,05$ il t corrispondente ai gradi di libertà dei nostri gruppi sperimentali è di 2,447. Da notare che la dose di 20 mg/Kg per via intraperitoneale è sicuramente subletale mentre la dose di 40 mg/Kg è subletale per via endovenosa e corrisponde alla DL_{50} per via intraperitoneale.

Il trattamento con acido iodoacetico non influenza i valori della radioattività specifica dell'ortofosfato sia del sangue che del timo.

Effetto dell'acido iodoacetico sulla incorporazione del P^{32} nell'ADN del fegato rigenerante. — Per poter effettuare il trattamento con l'acido iodoacetico nel periodo in cui si ha un massimo della incorporazione del P^{32} nel fegato rigenerante, abbiamo seguito nei nostri animali l'entità di tale incorporazione a vari tempi dalla epatectomia. I risultati sono riportati nella fig. 1. Come si vede si ha un netto massimo a 24 ore.

Nella tabella II sono riportati i valori della radioattività specifica corretta dell'ADN estratto dal fegato rigenerante da 24 ore di ratti normali e trattati con acido iodoacetico. L'acido iodoacetico alla dose di 40 mg/Kg per via intraperitoneale inibisce notevolmente la incorporazione del P^{32} (le differenze risultano altamente significative) mentre somministrato per via endovenosa sembra non avere alcun effetto.

Nella stessa tabella sono riportati i valori della radioattività speci-

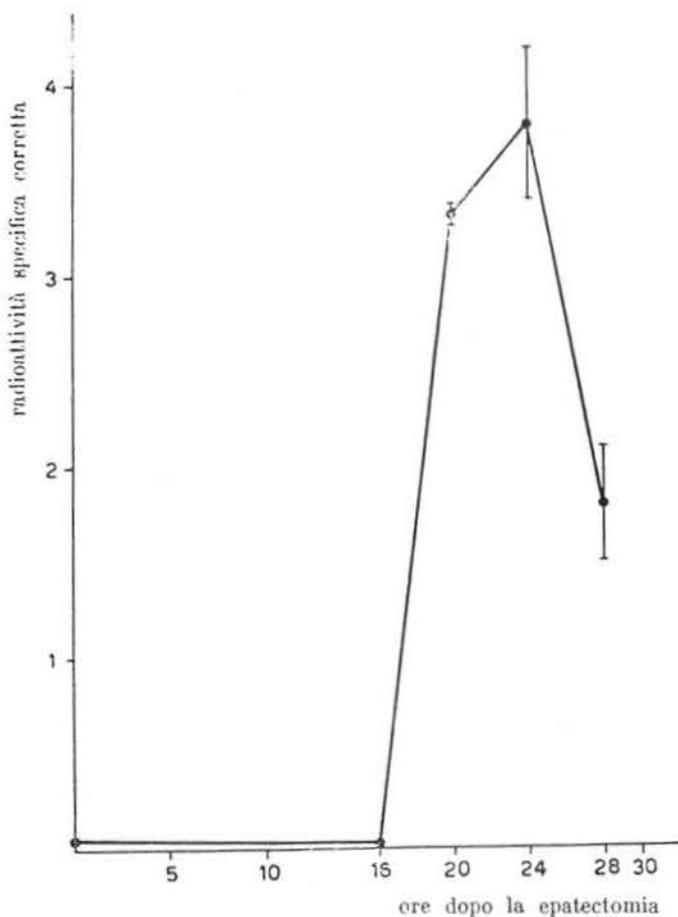


Fig. 1. - Radioattività specifica corretta dell'ADN estratto dal fegato rigenerante a vari intervalli di tempo dalla epatectomia (il P^{32} è stato somministrato alla dose di $30 \mu\text{c}$ per ratto un'ora prima dei tempi indicati nel grafico e gli animali sono stati sacrificati 2 ore dopo la somministrazione del P^{32} e cioè un'ora dopo i tempi indicati nel grafico).

fica dell'ortofosfato del fegato: non si nota una differenza significativa tra gli animali di controllo e quelli trattati.

Effetto del trattamento combinato con AIA e raggi X. — Nella tabella III sono riportati i valori della radioattività specifica corretta dell'ADN estratto da timo, milza e intestino degli animali in esperimento. Tali valori mostrano l'effetto di inibizione dovuto al solo acido iodoacetico e confermano il ben noto effetto di inibizione delle radiazioni (per

TABELLA II

Radioattività specifica corretta dell'ADN estratto, 2 ore dopo la somministrazione di 50 μ c di P^{32} per ratto, dal fegato rigenerante di 24 ore di animali normali e trattati con AIA. (Medie \pm errori standard delle medie).

	I		II	
	Controlli	AIA 40 mg/kg endovena	Controlli	AIA 40 mg/kg intraiperitoneale
	(5)	(7)	(8)	(7)
Fegato rigenerante	3,10 \pm 0,52 =	3,43 \pm 0,69 =	5,38 \pm 0,55 (t = 4,130 ; 0,001 < P < 0,01)	2,09 \pm 0,56
Ortofosfato del fegato (*)	862 \pm 104	793 \pm 51	628 \pm 37	683 \pm 52

In parentesi è indicato il numero degli animali in esperimento.

(*) La radioattività specifica è espressa in i.p.m./ μ g di P.

TABELLA III

Radioattività specifica corretta dell'ADN estratto dalla milza, dall'intestino e dal timo 2 ore dopo la somministrazione di 25 μ c di P^{32} /ratto. (Medie \pm errore standard delle medie) (*).

	Controlli	AIA 40 mg/kg (endovena)	Raggi X, 150 r.	AIA 40 mg/kg (endovena) Raggi X, 150 r.
Milza	— 4,44 \pm 0,76	(21 %/o) (**) 3,52 \pm 0,63	(46 %/o) 2,40 \pm 0,34	(56 %/o) 1,94 \pm 0,36
Intestino	— 2,16 \pm 0,19	(12 %/o) 1,90 \pm 0,30	(5 %/o) 2,05 \pm 0,16	(24 %/o) 1,64 \pm 0,16
Timo	— 3,64 \pm 0,36	(23 %/o) 2,79 \pm 0,35	(28 %/o) [2,61 \pm 0,27 (t = 2,606; 0,05 > P > 0,02)]	(50 %/o) 1,81 \pm 0,14

(*) Ogni dato rappresenta la media di 5 valori ognuno ottenuto dagli organi riuniti di 4 animali.

(**) I valori tra parentesi rappresentano la percentuale di inibizione.

l'intestino, alle dosi impiegate, tale effetto non è rilevabile). Inoltre essi mostrano anche che dopo il trattamento combinato si ha un effetto di inibizione che corrisponde alla somma degli effetti che si ottengono con i trattamenti singoli.

Nella tabella IV sono riportati i risultati di esperienze effettuate ino-

TABELLA IV

Radioattività specifica corretta dell'ADN estratto dall'intestino e dal timo 2 ore dopo la somministrazione di 25 μ c di P^{32} /ratto. (Trattamento con i raggi X 4 ore prima della somministrazione di P^{32}).

	Controlli	AIA 40 mg/kg (endovena)	Raggi X, 150 r	AIA 40 mg/kg (endovena) Raggi X, 150 r.
Intestino	—	(12 %/o) (**)	(46 %/o)	(49 %/o)
	2,43 (*)	2,14	1,31	1,24
Timo	—	(9 %/o)	(63 %/o)	(73 %/o)
	3,09	2,82	1,13	0,82

(*) Ogni valore rappresenta la media di 3 dati ognuno ottenuto dagli organi riuniti di 4 animali.

(**) I valori tra parentesi rappresentano la percentuale di inibizione.

culando il P^{32} quattro ore dopo l'irradiazione e prendendo in esame solo il timo e l'intestino. Tali esperienze sono state effettuate perchè dopo tale periodo di tempo si ha, da parte delle radiazioni, il massimo effetto di inibizione della incorporazione di precursori marcati nell'ADN degli organi radiosensibili (8).

Dall'esame dei risultati si nota che l'effetto delle radiazioni è più marcato a quattro ore che a due ore, mentre l'effetto dell'acido iodoacetico a 4 ore risulta chiaramente di minore entità. La risposta al trattamento combinato, anche in tal caso, corrisponde alla somma degli effetti ottenuti con i singoli trattamenti.

Variabilità nella risposta del materiale biologico. — Come si può notare dall'esame delle tabelle, fra i gruppi sperimentali (ogni gruppo comprende controlli e trattati) vi possono essere notevoli differenze, nel-

la entità media della incorporazione del P^{32} nell'ADN. Tali differenze si notano sopra tutto per la milza e per il fegato rigenerante e sembrano dipendere dalle condizioni in cui si trovano tutti gli animali del gruppo al momento della esperienza, dato che la variabilità nell'ambito del gruppo risulta costantemente dello stesso ordine di grandezza, come indicano chiaramente i valori degli errori standard delle medie.

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Dai risultati della presente ricerca appare chiaramente che l'acido iodoacetico esplica un effetto di inibizione sulla incorporazione del P^{32} nell'ADN di alcuni organi radiosensibili.

Sembra poco probabile che tale effetto dipenda da una alterazione della disponibilità di ortofosfato o da una alterata velocità di assunzione di questo dal punto di inoculazione, dato che la radioattività specifica dell'ortofosfato sia del sangue che dei tessuti non viene modificata dal trattamento con acido iodoacetico e la comparsa della radioattività nel sangue (dati non pubblicati) segue lo stesso andamento negli animali normali ed in quelli trattati.

L'inibizione è direttamente correlata alla dose di acido iodoacetico e, nel fegato rigenerante, dipende anche dalla via di somministrazione. In tale organo difatti si ha un netto effetto di inibizione quando l'AIA è somministrato per via intraperitoneale, mentre non si nota alcun effetto se la somministrazione viene effettuata per via endovenosa. Tali differenze sono probabilmente da attribuirsi al diverso destino che subisce la sostanza in dipendenza della via di somministrazione. A favore di tale ipotesi depongono alcuni fatti sperimentali: a) la DL_{50} di AIA per il ratto dipende dalla via di somministrazione e risulta più elevata per via endovenosa; b) negli animali trattati per via endovenosa l'esito letale si verifica entro 24 ore o al massimo entro 48 ore e in seguito gli animali sopravvissuti non mostrano segni di sofferenza e sembrano del tutto normali, mentre negli animali trattati per via intraperitoneale gli eventi letali continuano a manifestarsi anche dopo 3-6 giorni e gli animali sopravvissuti mostrano chiari segni di sofferenza ancora per qualche giorno; c) negli animali trattati per via intraperitoneale si riscontrano in alcuni organi manifestazioni di tipo « radiomimetico » [dati in corso di pubblicazione (9)], come ad esempio l'involutione del timo e della milza e un quadro da ileo paralitico nell'intestino tenue, che invece non compaiono quando l'AIA è somministrato per via endovenosa.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione attraverso il quale l'acido iodoacetico esplica il suo effetto, non abbiamo ancora sufficienti elementi per formulare delle ipotesi attendibili. Dobbiamo però, anzi tutto, far notare che nella maggior parte delle nostre esperienze l'AIA è stato somministrato trenta minuti prima del P³². Abbiamo scelto un tale periodo di tempo partendo dalla considerazione che, ove esistesse da parte dell'AIA un effetto diretto di inibizione di un qualche sistema biochimico interessato nella sintesi dell'ADN, tale effetto doveva ovviamente rendersi manifesto, data la particolare reattività di questa sostanza, non appena essa avesse completamente reagito con i costituenti dell'organismo. In precedenti esperienze (10) con acido bromoacetico marcato con C¹⁴ abbiamo potuto accertare che ciò avviene appunto entro 30'. D'altra parte, ci sembra che un effetto più precoce avrebbe potuto essere quello più interessante ai fini della interpretazione del meccanismo di radiosensibilizzazione; mentre, effetti più tardivi, specialmente se accompagnati a lesioni anatomiche, sarebbero risultati meno specifici e legati forse alla morte di elementi cellulari. I risultati delle esperienze eseguite somministrando il P³² 4 ore dopo l'AIA, inducono tuttavia ad escludere quest'ultima possibilità, dato che l'effetto di inibizione diminuisce sensibilmente con il passare del tempo.

Se, in base a tali considerazioni, sembra poco probabile che l'effetto dell'AIA sia dovuto a banali cause aspecifiche, quale ad es. la morte cellulare, rimane da vedere quale possa essere il suo meccanismo d'azione.

L'acido iodoacetico è da lungo tempo conosciuto come agente antimitotico, anche se non viene considerato un vero e proprio « radiomitotico », e l'effetto antimitotico è stato messo in relazione con la reattività dell'AIA per i gruppi tiolici (11, 12). HUGES (13) ha osservato che cellule embrionali di pollo in coltura trattate con acido iodoacetico nel periodo di pre-profase non entrano in mitosi, mentre le cellule nelle quali il ciclo mitotico è già iniziato sono notevolmente meno sensibili. RUNNSTRÖM (12), invece, ha osservato che l'acido iodoacetico provoca l'arresto in profase del ciclo divisorio nelle uova di *Urechis*. GOMPEL (14) ha riportato che l'acido iodoacetico inibisce la formazione del fuso e dell'aster. Tra le varie possibili ipotesi circa il suo meccanismo d'azione, le seguenti ci sembrano di maggior rilievo.

L'AIA potrebbe interferire a livello della glicolisi attraverso l'inibizione della gliceraldeide-fosfato deidrogenasi che è uno degli enzimi chiave, regolatori dei processi metabolici (15). L'inibizione di tale enzima potrebbe condurre ad una diminuzione delle fonti di energia ne-

cessarie alla cellula per il normale svolgimento delle sue funzioni e nel caso specifico potrebbe ridurre la sintesi di quella riserva di precursori che vengono mobilitati al momento della duplicazione dell'ADN nelle prime fasi mitotiche.

A tale proposito va notato che l'ortofosfato è un precursore alquanto remoto dell'ADN e quindi gli eventi metabolici, che sono interessati nella assunzione del fosfato stesso nell'acido nucleico, debbono considerarsi piuttosto numerosi. Si dovrebbe provare se con altri precursori, più prossimi e specifici, quale ad es. la timidina, l'AIA esplica ugualmente il suo effetto di inibizione.

Da nostre precedenti ricerche non pubblicate sembra risultare che l'AIA anche a dosi modeste, non letali, (dose « radiosensibilizzante ») determini una certa inibizione della gliceraldeide-fosfato deidrogenasi nel tessuto muscolare scheletrico del topo. Rimane da indagare se tale effetto si riscontra anche negli organi radiosensibili. Recentemente, STERN ⁽¹⁶⁾ ha potuto confermare, sperimentando con anteri di giglio, che la glicosì è intimamente associata con la divisione cellulare: essa non rivestirebbe però il ruolo di preminenza attribuitole dai precedenti autori ⁽¹⁷⁾.

Secondo lo Stern avrebbe invece maggiore importanza il ruolo ricoperto dal glutatione. Egli infatti ha trovato che abbassando la concentrazione di gruppi SH (glutatione) durante il periodo premitotico (per trattamento con N-etilmaleimide) si ha un ritardo nell'inizio della mitosi, e cioè questa non ha inizio sino a che il livello di glutatione non ha raggiunto di nuovo valori appropriati.

Altra ipotesi è che le sostanze capaci di reagire con i gruppi tiolici interferiscano con la formazione dell'apparato mitotico. Recentemente è stato messo in evidenza da MAZIA ⁽¹⁸⁾ il ruolo determinante dei gruppi-SH nella struttura e nella funzione dell'apparato mitotico.

Tale autore ha trattato delle uova di riccio di mare con mercapto etanolo, ed ha trovato che tale sostanza applicata prima della metafase e durante la metafase, blocca completamente il processo mitotico e che tale effetto è completamente reversibile, qualora il mercapto-etanolo venga allontanato. Tale sostanza non ha invece alcun effetto se somministrata alla fine della metafase o all'inizio dell'anafase.

Questi risultati ci sembrano di un certo interesse se correlati a quelli di precedenti autori ^(12, 13, 14) i quali hanno trovato che la iodoacetammide e l'AIA interferiscono nella formazione del fuso e dell'aster.

E' da notare, tuttavia, che secondo altri autori l'effetto dell'AIA si

manifesterebbe essenzialmente nel periodo pre-profascico, inibendo l'inizio della mitosi: l'AIA sarebbe meno attivo se somministrato quando il processo mitotico è già in atto.

I risultati della presente ricerca sembra che avvalorino l'ipotesi che l'AIA agisca durante il periodo pre-profascico interferendo con la sintesi dell'ADN.

Per quanto riguarda l'effetto esplicato dall'AIA negli animali irradiati, i risultati della presente ricerca indicano che: a) il trattamento combinato con AIA e raggi X provoca una inibizione della incorporazione del P^{32} nell'ADN pressochè corrispondente alla somma delle inibizioni che si ottengono con i singoli trattamenti; b) l'effetto dell'AIA diminuisce sensibilmente di intensità dopo qualche ora dalla somministrazione, mentre quello dell'irradiazione aumenta; c) la addittività degli effetti si mantiene anche quando, con il passare del tempo, l'effetto dell'AIA tende a diminuire.

Una possibile interpretazione di questi dati può essere che l'effetto dell'AIA sulla sintesi dell'ADN può sommarsi a quello delle radiazioni, aumentando il danno nei tessuti radiosensibili.

Bisogna però tener presente che con le dosi di raggi X impiegate nei nostri esperimenti, è possibile che la riduzione della sintesi di ADN sia conseguente ad un arresto temporaneo delle mitosi piuttosto che a morte cellulare, mentre gli effetti di sensibilizzazione dell'AIA sono stati messi in evidenza per dosi di raggi X che sicuramente provocano morte cellulare. Inoltre gli effetti dell'AIA sulla sintesi di ADN sembrano reversibili in breve periodo di tempo.

Queste osservazioni possono far dubitare della possibilità che l'effetto dell'AIA sulla sintesi dell'ADN possa realmente aggravare il danno subito dalle cellule per effetto di dosi letali di raggi X.

Mentre la presente nota era in corso di stampa, siamo venuti a conoscenza di un lavoro di MAAS H. e KUNKELL N. A. [Intern. J. Radiation Biology, 2: 269 (1960)]; nel quale gli AA. riportano di aver osservato « in vitro » un effetto di inibizione esplicato dall'AIA sulla incorporazione di P^{32} nell'ADN di cellule del tumore ascite di Ehrlich.

BIBLIOGRAFIA

- (1) QUINTILIANI M. e BOCCACCI M. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 5 (1960).
- (2) KOCH R. e HAGEN U. - Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 228: 227 (1956).
- (3) BOCCACCI M. e QUINTILIANI M. - Experientia, 16: 31 (1960).
- (4) ORD M. G. e STOCKEN L. A. - Ann. Rev. nucl. Sci., 9: 323 (1959).
- (5) HIGGINS G. M. e ANDERSON R. M. - Arch. Pathol., 42: 486 (1931).
- (6) KELLY L. S. e JONES H. B. - Science, 111: 333 (1950).
- (7) BERENBLUM I. e CHAIN E. B. - Biochem. J., 32: 293 (1938).
- (8) NYGAARD O. F. e POTTIER R. L. - Rad. Res., 10: 462 (1959).
- (9) TENTORI L., BOCCACCI M. e QUINTILIANI M. - In corso di stampa.
- (10) BOCCACCI M. e QUINTILIANI M. - Rend. Ist. sup. Sanità, 22: 1044 (1959).
- (11) LOVELESS A. e REVELL S. - Nature, 164: 938 (1949).
- (12) BRACHET J. - Chemical Embryology, Interscience Publishers, London, p. 476 (1950).
- (13) HUGHES A. - The mytotic Cycle, Butterworths Scient. Pub., London, p. 486 (1952).
- (14) GOMPEL C. - Rev. Belge Pathol. Med. expetl., 22: 85 (1952).
- (15) KREBS H. A. - Rend. Ist. sup. Sanità, 21: 49 (1958).
- (16) STERN H. - Sulfur in Proteins, Academic Press Incorp. New York, p. 367 (1959).
- (17) WARBURG O. - Science, 124: 270 (1956).
- (18) MAZIA D. - Sulfur in Proteins, Academic Press Incorp., New York, p. 367 (1959).