

18. Daniele BOVET. — Introduzione allo studio fisiologico e farmacologico del curaro. (1).

Riassunto. — L'A. in questo rapporto riassume le attuali concezioni sul problema del curaro, sia dal punto di vista fisiologico che farmacologico e propone di limitare l'appellativo di « sostanze curariche » a quelle sostanze che, agendo anche elettivamente sui muscoli striati dei mammiferi, dimostrano un antagonismo di tipo competitivo con l'acetilcolina.

Résumé — Les progrès de nos connaissances sur la structure chimique des constituants des curares naturels et les recherches réalisées dans le domaine des curares de synthèse ont apporté de nouveaux éléments à la compréhension des problèmes physiologiques et pharmacologiques que posent le mode d'action de ces substances et la définition du groupe des « substances curarisantes ».

L'observation de l'antagonisme qui apparaît au niveau des muscles striés entre le curare et l'acétylcholine est à la base des conceptions actuelles sur le mécanisme de la curarisation. En fait le parallélisme des effets exercés par les mêmes molécules curarisantes sur la transmission neuromusculaire et sur la contracture acétylcholinique, le caractère compétitif de l'antagonisme acétylcholine-curare, et l'analogie de structure entre acétylcholine et certains curares de synthèse permettent d'assimiler les molécules de ce type de produits à ce que représente l'atropine au niveau des muscles lisses.

Au point de vue physiologique, les hypothèses de Dale, Feldberg et Vogt, celles de Nachmansohn et les plus récentes conceptions de Kuffler et Acheson ont par ailleurs suffisamment mis en évidence le rôle joué par l'acétylcholine dans la transmission neuromusculaire et dans les phénomènes énergétiques qui participent à la propagation de l'influx nerveux.

L'Auteur propose de limiter la définition de « substances curarisantes » aux seuls produits dont les effets sur la synapse neuromusculaire s'exercent chez les mammifères et avec une électivité suffisante et s'accompagnent d'un antagonisme compétitif à l'égard de l'action de l'acétylcholine sur le muscle strié.

Summary. — The recent progress in our knowledge of the chemical structure of the constituents of natural curares and the investigations carried out in the field of synthetic curares have made it possible to bring new contributions towards the elucidation of the curare problem, both from a phys-

(1) Relazione alla XVIII Assemblea Generale della Società Italiana di Biologia Sperimentale, Milano, 8-10 giugno 1949. — Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1949, 25, 539.

iological and a pharmacological viewpoint, thus assisting in the comprehension of the mode of action of these substances and in giving a proper definition of the group of « curaric substances ».

The observation of the antagonism appearing, in the action on striated muscles, between curare and acetylcholine is at the basis of the present conceptions on the curarization mechanism. In fact, the parallelism of the effects which the same curarizing molecules have, on the one hand, on the neuro-muscular transmission and, on the other hand, on the contraction by acetylcholine, the competitive character of the acetylcholine-curare antagonism, and the structural similarity between acetylcholine and curare, justify us in assimilating molecules of this type of products to what atropine represents in the action on smooth muscles.

From the physiological viewpoint, the hypotheses of Dale, Feldberg and Vogt, those of Nachmansohn and, more recently, those of Kuffler and Acheson, have demonstrated well enough the important part played by acetylcholine in the neuro-muscular transmission and in energetic phenomena concurring in the propagation of the nervous impulse.

The A. proposes to restrict the definition of « curaric substances » so as to include only such products as are capable of producing their effects also on the synapses of mammals, doing so with sufficient electivity, further, showing an antagonism characterized by an action competitive with acetylcholine on the striated muscle.

Zusammenfassung. — Die sich vervollkommende Kenntnis der chemischen Struktur der Bestandteile der natürlichen Curare und das Studium der synthetischen Curare lieferten neue Elemente zur Erfassung der physiologischen und pharmakologischen Probleme, welche der Aktionsmechanismus und die Klassifizierung der « curarisierenden Substanzen » stellt.

Die Beobachtung des am Niveau der quergestreiften Muskeln erscheinenden Antagonismus zwischen curarisierenden Substanzen und Acetylcholin bildet die Basis der heutigen Auffassung über den Mechanismus der Curarisierung. Der Parallelismus der von den gleichen curarisierenden Molekülen auf die neuromuskuläre Fortleitung und auf die durch Acetylcholin hervorgerufene Kontraktion ausgeübten Wirkungen, der kompetitive Charakter des Antagonismus Acetylcholin-Curare und Strukturanalogien des Acetylcholins und verschiedener synthetischer Curare gestatten in der Tat den Vergleich der Funktion dieser Produkte mit der, die das Atropin am Niveau der längsgestreiften Muskeln ausübt.

Vom physiologischen Gesichtspunkt aus haben die Annahmen von Dale, Feldberg und Vogt sowie von Nachmansohn und neulich jene von Kuffler und Acheson die wichtige Rolle des Acetylcholins bei der neuromuskulären Fort-

leitung und den energetischen Erscheinungen, welche bei der Uebermittlung des Nerveneinflusses mitwirken, genügend bewiesen.

Der Verfasser schlägt vor, die Bezeichnung « curarisierende Substanzen » auf jene Produkte zu beschränken, die auf die neuromuskuläre Synapse der Säugetiere wirken, und zwar mit genügender Selektivität, und die einen kompetitiven Antagonismus zur Wirkung des Acetylcholin auf den quergestreiften Muskel ausüben.

Durante la riunione della Società Italiana di Biologia a Perugia, l'anno scorso, con una cordialità ed una gentilezza che non posso dimenticare, il Presidente della Società, molti colleghi e in particolar modo il mio ottimo amico, Prof. Di Mattei, mi domandarono di presentare un rapporto alla riunione di Milano, che ci trova insieme oggi. Pensai subito allora di parlarvi di curaro, in primo luogo perchè ero allora impegnato a studiare in laboratorio alcuni aspetti di questa questione e poi perchè questo secolare problema mi sembrava assai adatto ad una riunione come quella di oggi, per la molteplicità dei suoi aspetti, per la varietà delle discipline che esso interessa e soprattutto per tutte le incognite e le sorprese che ancora ci riserva.

E difatti non possiamo nasconderci che molti problemi posti dallo studio del curaro, e abordati da più secoli, son lungi dall'esser risolti, e ciò malgrado che tanti spiriti eminenti come Fontana, Humboldt, Boussingault, Claude Bernard, Vulpian, Vella, Wieland, Bottazzi, Gag'io, Lapicque, Karrer ne abbiano fatto l'oggetto di studi magistrali.

Sfogliando per esempio l'opera considerevole di Henry « Plant Alkaloids » si resta stupiti di trovare all'ultimo posto i costituenti più attivi delle Loganiacee mentre che tanti altri capitoli che, come questo, interessano la chimica biologica e la fisiologia — l'atropina, l'oppio, la cocaina, per non parlare della chinina stessa — da quasi mezzo secolo, si sono miracolosamente chiariti ai nostri occhi. Si direbbe davvero che per il problema del curaro siamo noi stessi vittime delle stregonerie dei pellirossa del Rio delle Amazzoni!

E in realtà le prime incognite sono apparse subito per la scelta delle specie vegetali che gli indigeni fanno entrare nella preparazione se non nel modo di preparazione stesso, e nella trasformazione che viene generata dalla lunga cottura delle liane. Fra le specie vegetali supposte di poter entrare nella preparazione dei curari, poche soltanto sono identificate con certezza. L'iconografia ne è così scarsa che in tutte le monografie ritroviamo l'immagine dello *Strychnos Castelnoei* tratto dal *Traité de Botanique Médicale* di Baillon del 1884; per quel che mi riguarda, ho potuto avere la fotografia del *Chondrodendron tomentosum* da New-Brunswick dove la d-tubocurarina fu isolata da Wintersteiner, e da Ginevra dove si trova l'erbario di Ruiz e Pavon

a cui si deve l'aver riconosciuto la specie tipo. Ma le due immagini del *Chondrodendron tomentosum* non mi sembrano nemmeno identiche.

Quattro gruppi di chimici, in Inghilterra, in Germania, in Svizzera e negli Stati Uniti studiano oggi i costituenti naturali delle cortecce di *Strychnos* e dei curari indiani, ma il problema iniziale — assai chiaramente esposto da Biocca (2) — il quale consiste nel sapere in quale misura la preparazione indigena accresce o conferisce la tossicità, non è stato chiaramente risolto. Le osservazioni di Biocca rendono probabile il fatto che durante la preparazione avverrebbe una metilazione degli alcaloidi terziari di cui i gruppi amminici diventerebbero quaternari e le cui funzioni fenoliche verrebbero ad essere metossilate. La sintesi chimica ci permette oggi di credere che il bilancio di queste operazioni si traduce con un forte aumento della tossicità.

Io non posso, in così breve tempo, portarvi dalla caldaia dello stregone ai cromatogrammi dei chimici organici, e dalle prime menzioni che del curaro furono fatte da esploratori italiani del '500 alle applicazioni oggi quotidiane che del curaro vengono fatte in clinica, e del resto un esposto completo della questione rischierebbe di dare più posto alla chimica che non alla biologia.

Per la parte chimica mi limiterò semplicemente a ricordare fra le ricerche che datano da meno di quindici anni, quelle di King nel 1935, a cui si deve l'isolamento allo stato cristallino d'uno dei primi costituenti attivi del curaro in tubo, la d-tubocurarina, costituente che doveva essere poi isolato da Wintersteiner direttamente dalle cortecce di una *Menispermacea*: il *Chondrodendron tomentosum*. Nel 1937 e nel 1938 Wintersteiner, King e Carneiro sono riusciti ad isolare alcuni costituenti del curaro in calebassa. Queste ricerche, che attualmente sono anche oggetto degli studi di Karrer, hanno portato finora all'isolamento di sostanze di cui non si conosce che la formula globale e per le quali l'attività farmacodinamica appare veramente straordinaria. La C-tossiferina, per esempio, uccide il coniglio a un cinquecentesimo di milligrammo per chilo.

Trattando il problema da un punto di vista biologico io vorrei mettere l'accento su due aspetti del problema:

- 1) quello fisiologico relativo alla trasmissione al livello delle sinapsi neuro-muscolari che pone il modo d'azione del curaro;
- 2) quello farmacologico sulle possibilità di dare del curaro una definizione basata sull'antagonismo che esso esercita nei confronti dell'acetilcolina, sul muscolo striato.

* * *

Il primo problema che noi dobbiamo esaminare è un puro problema di fisiologia nervosa perchè infatti da Claude Bernard in poi, il problema dell'azione fisiologica del curaro si è trovato per lunghi anni legato alla questione del meccanismo della trasmissione neuro-muscolare dell'influsso nervoso.

Si ricorda che anteriormente La Condamine, Fontana e Brodie aprirono la via alle ricerche di Claude Bernard. Le sue esperienze che furono pubblicate prima in collaborazione con Pelouze nel 1850, poi nel 1857 riunite nelle «Leçons sur les effets des substances toxiques» costituiscono un esempio classico di analisi farmacologica. Le ricerche di Claude Bernard mettono in evidenza come l'azione del curaro sia periferica e venga esercitata al livello del muscolo. Le sue esperienze che mostrano come il curaro abolisce l'eccitabilità dei muscoli scheletrici da parte del nervo, pur essendo rispettate apparentemente l'eccitabilità e la contrattilità proprie dell'uno e degli altri, furono generalmente allora interpretate come una prova che il curaro agisce alla giunzione del nervo e del muscolo, alterandosi una speciale materia organizzata stabilente la comunicazione tra questi due diversi elementi anatomici. Le estremità nervose intramuscolari e poi, quando si conobbe la struttura della placca motrice, le terminazioni nervose ipolemnali furono considerate come il luogo d'azione del veleno.

Boehm ha aggiunto alle concezioni teoriche di Claude Bernard, di Kölliker e di Vulpian sul modo di azione del curaro una chiara conferma dimostrando che l'eccitabilità diretta del muscolo persisteva anche sulla rana trattata con una dose di curaro 20.000 volte superiore alla dose paralizzante.

A Langley si deve la prima formale dimostrazione dell'azione essenzialmente muscolare del curaro, anche se localizzata alla zona della giunzione mio-neurale. Le sue osservazioni sui muscoli normali e denervati di anfibii e di uccelli, dimostrando la sensibilità particolare di questa regione mio-neurale agli alcaloidi contratturanti (nicotina, eserina) ed al curaro, loro antagonista, lo spinsero a supporre l'esistenza nella fibra scheletrica dei vertebrati di una sostanza ricettrice dipendente troficamente dal muscolo. Fu generalmente ammessa l'uguaglianza tra la sostanza ricettiva di Langley e la sostanza alterata elettricamente dal curaro, di cui Keith Lucas per vie completamente differenti era stato indotto a supporre l'esistenza.

L'effetto del curaro sull'attività elettrica del nervo ha subito attirato l'attenzione dei ricercatori: fu già l'oggetto delle ricerche di Funke nel 1895. Si riconobbe che il curaro non altera la conduzione nervosa.

Invece per più di un secolo il fisiologo che si è limitato a studiare le manifestazioni elettriche dell'attività nervosa e muscolare ha considerato principalmente le modificazioni portate dal curaro sull'eccitabilità elettrica del muscolo. Bisogna ben riconoscere oggi che si era allora in un vicolo cieco poichè anche il fisico non potrà mai penetrare la natura della reazione ionica che si compie quando egli mette soltanto il galvanometro sui due poli di un accumulatore.

All'idea bernardiana dell'integrità funzionale del muscolo intossicato dal curaro Rosenthal nel 1857 aveva portato una correzione mostrando che,

se era vero che il muscolo curarizzato conservava la sua eccitabilità, tuttavia per ottenere una risposta paragonabile era necessaria l'applicazione di una corrente di intensità molto superiore a quella attiva sul muscolo normale.

Von Brücke (1867-1868) mette in evidenza una differenza ancora più considerevole tra i muscoli normali e curarizzati; egli constata che, con correnti brevi, l'intensità dell'eccitazione necessaria è da 7 a 18 volte più grande per il muscolo curarizzato che per il muscolo normale; al contrario adoperando eccitamenti prolungati, la risposta era uguale in tutti e due i casi.

In seguito alle sue ricerche che stabilivano la necessità di un adattamento qualitativo di ogni stimolo elettrico alla velocità di eccitabilità del tessuto nervoso o muscolare eccitato (cronassia), Lapicque ha ammesso nel 1903 l'azione essenzialmente muscolare del curaro, avendo dimostrato che esso tanto più modificava l'eccitabilità delle fibre muscolari quanto più esse possedevano una grande rapidità.

E' noto che in seguito a queste ricerche Lapicque si è sforzato di dimostrare il parallelismo che esiste fra l'interruzione della trasmissione neuro-muscolare e i « fenomeni di isocronismo » da lui osservati.

Le conclusioni di Lapicque sono state riconosciute esatte quando il muscolo è fortemente intossicato; ma vi si obietta che le modificazioni di cronassia che esse prevedono sono insignificanti alle più piccole dosi di alcaloide necessarie per abolire l'eccitabilità indiretta.

D'altronde ad un eterocronismo pronunziato può corrispondere una paralisi della rana senza scomparsa dell'eccitabilità elettrica indiretta.

La concezione farmacologica della scuola francese si è finalmente cristallizzata sotto l'aspetto d'un doppio antagonismo. E' stato ammesso che esistevano due tipi di agenti aventi azione sulla cronassia nervosa:

- 1) la solanina che aumenta la cronassia;
 - 2) la stricnina che diminuisce la cronassia;
- e due altri tipi ad azione sulla cronassia muscolare:

- 1) il curaro e la sparteina che aumentano la cronassia;
- 2) la veratrina, la nicotina, l'acetilcolina e l'adrenalina che diminuiscono la cronassia.

E' difficile dare un giudizio sulle esperienze stesse basate su un materiale sperimentale estremamente variabile e su dei dati assai spesso soggettivi; la famosa « risposta minima » del muscolo, per esempio, che non è mai stata registrata, nè meccanicamente nè otticamente nè elettricamente.

In ogni modo si può certamente affermare che i riavvicinamenti suggeriti da queste misure non sono apparsi nè utili nè fecondi e che discu-

tibili ipotesi sugli antagonismi manifestati da gruppi di sostanze a effetto così diverso, non sono state all'origine di nuove esperienze.

Eguale^{mente} è stato constatato che il senso delle variazioni cronassiche poteva differire secondo l'origine dei curari esaminati. Lapicque ammette l'azione di certe varietà di curaro sui centri. In relazione ad alcune critiche che sono state volte alla legge dell'isocronismo, Lapicque stesso ha ammesso una correzione, indicando che poteva essere necessario introdurre in seconda approssimazione la nozione di reobase a fianco di quella della cronassia.

Quantunque la teoria fisica dell'isocronismo della trasmissione neuromuscolare sia stata cronologicamente una delle prime, fu però ben presto chiaro che da sola essa non poteva spiegare le reazioni farmacodinamiche proprie dei fenomeni della contrazione.

Oggi noi non possiamo ammettere la definizione di Lapicque del curaro come « sostanza che accresce la cronassia del muscolo striato ».

Per non terminare questo paragrafo su una nota solamente critica, tengo a dire che la questione dei rapporti fra l'eccitabilità dei diversi tipi di fibre muscolari e la loro suscettibilità al curaro e all'atropina, è un problema di elettro-fisiologia comparata che varrebbe la pena di riprendere alla luce delle recenti concezioni sulla funzione dell'acetilcolina nella contrazione.

* * *

Per l'interpretazione dell'azione curarica è secondo me un grande progresso quello compiuto da Langley che ha descritto un antagonismo fra gli effetti esercitati dalla nicotina e quelli esercitati dal curaro al livello del muscolo striato, e più tardi il fatto che al curaro può attribuirsi, rispetto all'acetilcolina, la proprietà di un antagonismo sui muscoli volontari analogo a quello dell'atropina sui muscoli lisci.

Le prime osservazioni al riguardo rimontano a Riesser che nel 1921 constatò che il curaro si oppone efficacemente alla contrazione acetilcolinica del muscolo striato della rana; questa osservazione è stata estesa alla contrazione del muscolo enervato e normale di mammifero, da Brown, Feldberg, Dale e Coppée.

Per esempio, mentre un muscolo retto addominale di rana si contrae quando si aggiunga al liquido una dose di acetilcolina equivalente a 0,2 mg/l, analoga concentrazione di tubocurarina (0,2) riesce ad impedirlo.

E' noto anche che per iniezione arteriosa retrograda si può ottenere anche nei mammiferi una contrazione acetilcolinica caratteristica.

Si sa oggi che il curaro previene la depolarizzazione che l'acetilcolina provoca al livello della placca motrice e che coinvolge a sua volta la risposta di tutto il muscolo.

In linea generale, alla luce dei lavori attuali questa reazione competitiva appare parallela all'inibizione della trasmissione neuromuscolare.

Voglio citare qui tre ricerche compiute nel nostro laboratorio che mettono bene in luce la realtà e la validità di quest'antagonismo acetilcolina-curaro.

Le prime riguardano il parallelismo tra l'azione curarica di alcuni prodotti di sintesi e l'antagonismo con gli effetti dell'acetilcolina e il fatto che il paragone degli alcaloidi puri e dei curari di sintesi appartenenti a differenti serie chimiche permette in modo generale di constatare un parallelismo fra la loro azione curarizzante e l'antagonismo che esercitano con gli effetti contratturanti dell'acetilcolina sulla rana (M. Marotta, 29).

Il secondo gruppo di ricerche porta sulle relazioni quantitative nell'antagonismo tra l'acetilcolina ed un curaro di sintesi, il 2559 F. In questo campo abbiamo con GUARINO (22) prospettato l'ipotesi di una competizione delle due sostanze per gli stessi ricettori. Questa concezione permette di inserire il curaro in uno schema teorico in cui esso viene trattato come una molecola di falsa acetilcolina dotato della proprietà di reagire con gli stessi ricettori, pur non provocando la contrazione.

Parlerò con più dettagli del terzo gruppo di ricerche che dimostrano le analogie di struttura fra acetilcolina e curaro e sul fatto che tra i più attivi curari di sintesi si trovino delle sostanze che sono dei derivati della colina.

Assai prima della scoperta dell'acetilcolina stessa, e già nel 1868, fu messo in evidenza il fatto che la presenza nella molecola delle ammine più semplici di una funzione ammonio-quaternaria conferiva loro una azione curarizzante caratteristica.

Nel corso delle nostre proprie ricerche noi abbiamo potuto dimostrare che non soltanto la funzione ammonio-quaternaria ma tutto il gruppo della colina era suscettibile di rappresentare un fattore importante dell'attività curarizzante.

Avendo preso come punto di partenza la complessa struttura chimica della tubocurarina, per trasformazioni successive della molecola, siamo pervenuti a prodotti relativamente semplici, dotati di proprietà curariche (8) (ved. tavola fuori testo).

I nuovi curari di sintesi possono essere rappresentati come degli eteri pesanti e stabili aventi nella molecola più volte la catena della colina. In queste condizioni essi posseggono un antagonismo strettamente limitato alla muscolatura volontaria.

Noi abbiamo fatto queste osservazioni in primo luogo nella serie fenolica (9).

Gli eteri della trietilcolina sono particolarmente interessanti. In questa serie l'etere del fenolo è poco attivo, ma i dieteri della pirocatechina, della resorcina, e soprattutto il trietere del pirogallolo (2559 F.) provocano già a deboli dosi una intensa curarizzazione. Mentre l'azione curarizzante dei derivati semplici si trova legata ad altre manifestazioni colinergiche, muscariniche e nicotiniche della molecola, negli eteri dei polifenoli studiati gli effetti cardiovascolari si trovano considerevolmente attenuati.

Mentre la fenossicolina provoca, come avevano notato Hunt e Renshaw, già alla dose di 0.1 mg/ kg una ipertensione paragonabile a quella stessa della nicotina, il dietere della resorcina che non era stato finora studiato, a dosi dell'ordine del milligrammo non ha che una debole azione eccitante sui gangli. E così anche l'effetto cardiomodérateur ed ipotensivo dei monoeteri della trietilcolina è notevolmente attenuato introducendo nella molecola una o due nuove funzioni ammoniche quaternarie.

Noi ci siamo più a lungo soffermati nello studio del 2559 F. o Sincurarina (9, 11, 14, 33, 34, 35).

Diverse esperienze sono state eseguite sul cane cui era stata assicurata l'ematosi somministrando in continuazione l'ossigeno con una sonda fino ai bronchi. Il fatto più notevole è che l'iniezione rapida nel circolo di una dose di 2559 F. sufficiente a produrre una curarizzazione di più ore, non provoca alcuna variazione sul tracciato della pressione. A questo riguardo il prodotto di sintesi si trova ad essere molto superiore ai curari naturali.

Abbiamo anche stabilito che parecchi esteri di acidi alifatici e particolarmente la succinilcolina, manifestano a dosi paragonabili a quelle della d-tubocurarina intense proprietà curarizzanti sul cane e sul coniglio (7, 21). Dato che la succinilcolina può essere considerata come una acetilcolina raddoppiata, si ha qui un nuovo esempio dei rapporti di struttura fra i curari e i farmaci colinergici.

Accanto a queste osservazioni, molti altri fatti trovano un principio di spiegazione nell'ipotesi di una competizione fra curaro e acetilcolina al livello del muscolo striato.

Citeremo in particolare la coesistenza frequente nella stessa molecola di proprietà curarizzanti e paralizzanti nicotiniche. L'analogia che può riscontrarsi nella maniera in cui la cellula gangliare e la placca motrice rispondono allo stimolo dei diversi gruppi di sostanze è stata segnalata più volte dopo Langley.

Bisogna anche dire che, benchè l'ipotesi non sia da tutti accettata, è con lo spostamento dell'equilibrio acetilcolina-curaro che l'azione decurarizzante dell'esperina verrebbe il più facilmente spiegata (3, 12, 27).

Dacchè l'esistenza di questo fenomeno di decurarizzazione è stato descritto da Pal, le esperienze provocate in questo campo sono state assai numerose, e il numero degli agenti decurarizzanti si è notevolmente moltiplicato. E' stato segnalato infatti il potere decurarizzante di alcune materie coloranti, ma il meccanismo di questo fenomeno appare diverso. Il Prof. Ferrari nel laboratorio del Prof. Trabucchi, ha mostrato recentemente l'azione esercitata da alcune uree complesse ed è certo che in questo caso, l'ipotesi di un effetto anticolinesterasico non è più possibile. Forse si tratterebbe qui di fenomeni di adsorbimento fisico per i quali si presenterebbero particolarmente bene le molecole bipolari della tubocurarina e dei curari di sintesi (17, 24).

* * *

Il parallelismo degli effetti esercitati dalla stessa molecola sulla trasmissione neuromuscolare e sulla contrattura da acetilcolina, il carattere competitivo dell'antagonismo acetilcolina-curaro, l'analogia di struttura fra acetilcolina e curaro, permettono di assimilare le molecole di questo tipo di prodotti a quello che rappresenta l'atropina per i muscoli lisci. Definire il curaro «l'atropina dei muscoli striati» permette di spiegare l'effetto decurarizzante esercitato dall' eserina, così come la coesistenza nella stessa molecola delle proprietà curariche e nicotiniche.

Tutti i fenomeni che abbiamo rapidamente passato in rivista ci sembrano costituire altrettante ragioni per classificare il curaro fra i farmaci colinergici e per definire l'azione curarica come l'antagonismo esercitato da una sostanza nei riguardi degli effetti dell'acetilcolina sul muscolo striato.

Arrivati a questo punto e dopo aver accumulato un certo numero di dati sperimentali d'ordine puramente farmacologico, noi dobbiamo ricercare adesso l'interpretazione dei fatti qui e altrove esposti.

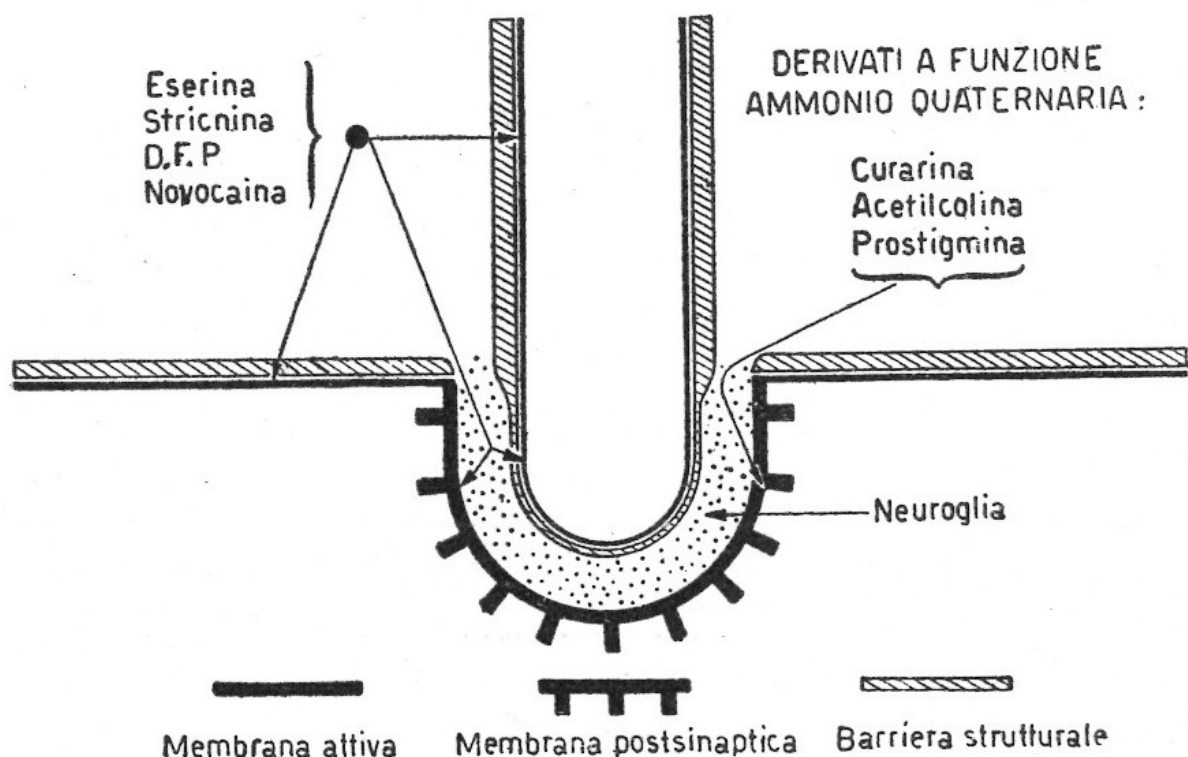
La prima ipotesi che possa estendersi al campo dei muscoli striati è quella emessa da Dale, Felberg e Vogt e che riprende la spiegazione dei mediatori chimici formulata da Loewi nel campo dei sistemi a trasmissione lenta.

Pur tuttavia vi sono molte difficoltà e contraddizioni nella teoria originale della trasmissione chimica neuro-umorale applicata a questo campo e i neurofisiologi (15) sono sempre più avversi all'idea che le condizioni della funzione specifica del nervo stesso siano diverse in relazione alla trasmissione.

Da diverse prove, di cui le prime sarebbero le osservazioni di Calabro, Bergami, Cantoni e Gualtierotti, del fatto che l'acetilcolina è

presente nei tronchi nervosi allo stato di riposo, e che sostanze attive acetilcolino-simili si accumulano nei tronchi nervosi durante l'eccitazione o si diffondono in seguito all'eccitazione, si verrebbe ad ammettere oggi che le funzioni dell'acetilcolina non sarebbero specificamente in rapporto con la trasmissione sinaptica, ma quelle di un metabolite del sistema nervoso. E anche negli ultimi anni si è potuto dimostrare che gli enzimi connessi con la formazione e la distruzione dell'acetilcolina sono in relazione con le manifestazioni elettriche del tessuto nervoso.

La localizzazione al livello delle sinapsi degli effetti competitivi del curaro e dell'acetilcolina si spiegherebbe essenzialmente in questo caso con l'impermeabilità dell'assone alla penetrazione delle amine quaternarie.



Tale ipotesi è stata emessa in questi ultimi anni e particolarmente difesa da NACHMANSOHN⁽³¹⁾ al Congresso Internazionale di Fisiologia di Oxford nel 1947. Non sembra che vada a genio fino adesso agli elettrofisiologi di cui ECCLES⁽¹⁵⁾ in particolare si fa il porta voce. Per i farmacologi quest'ipotesi potrebbe, come lo abbiamo mostrato, sostituirsi a quella dei mediatori chimici che si è rivelata così utile e feconda. Ma fin d'ora si può pensare che durante ancora molti anni, la funzione dell'acetilcolina nei riguardi dell'assone non potrà essere stabilita che come un'ipotesi.

Più recentemente KUFFLER e ACHESON⁽²⁶⁾ hanno formulato uno schema della trasmissione neuro-muscolare più vicino alla concezione originale di Dale, in cui fanno intervenire al livello della placca terminale del nervo

una sostanza differenziata chimicamente, corrispondente alla sostanza ricettiva di Langley.

La loro ipotesi, che si basa essenzialmente sul fatto che la corrente d'azione all'estremità del nervo non è da sola sufficiente a provocare l'onda di depolarizzazione della placca terminale, fa intervenire, tra l'arrivo dell'influsso nervoso all'estremità della fibra e la comparsa di un potenziale di placca (e.p.p.), il trasmettitore — chimico —, che non costituisce, in questo caso, che un processo d'eccitazione solamente, un meccanismo messo in movimento dall'influsso nervoso, e che dà luogo alla comparsa di un'onda di depolarizzazione molto più intensa dell'influsso iniziale.

* * *

Dopo quest'incursione nel campo della fisiologia devo tornare ora nel campo della farmacologia per porre, alla luce delle ricerche contemporanee, il problema della definizione delle sostanze curarizzanti.

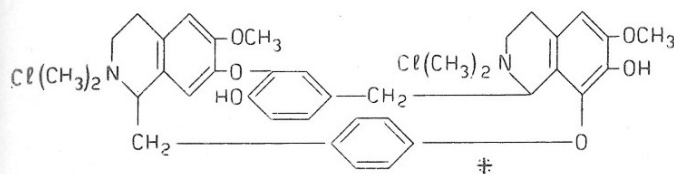
Se questo problema può da principio parere limitato, esso riveste ai miei occhi un'importanza basilare.

So bene che l'amico Di Mattei, con il quale ho tante volte discusso la questione, pensa che classificare un prodotto in un gruppo troppo definito, ci fa rischiare a volte di nascondere l'essenziale delle sue proprietà. Ed in un certo senso io sono d'accordo con lui. Pur tuttavia, l'esempio che noi abbiamo sotto gli occhi dei cosiddetti « farmaci curarizzanti », ci mostra il pericolo dell'assenza di definizione oppure di una definizione troppo larga e imprecisa. Ed è forse perchè per molti anni non si è chiaramente posto il problema, che tanto tempo è stato necessario per arrivare ai curari di sintesi.

Dopo le ricerche di Claude Bernard, di Vulpian e di Kölliker sono state definite « curariche » un gran numero di sostanze le quali, a somiglianza del curaro, aboliscono l'azione dei nervi motori sui muscoli volontari. Usando come animale d'esperienza la rana che dimostra una sensibilità particolare verso i farmaci di questo tipo e come metodo di investigazione le preparazioni neuro-muscolari, i fisiologi hanno classificato in questo gruppo un notevole numero di sostanze che non hanno fra di loro che rapporti assai vaghi.

Basta a questo proposito ricordare che, basandosi sui soli risultati delle esperienze realizzate sulla preparazione neuro-muscolare di rana, Santeson, nei dati che figurano anche nel « Dictionnaire de Physiologie » di Ri-

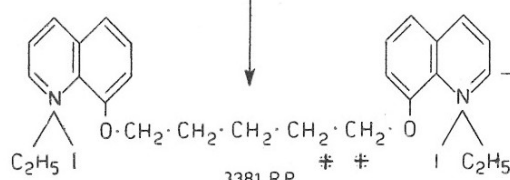
SVILUPPO DELLE RICERCHE CHIMICHE SUI CURARI DALLA D-TUBOCURARINA ALLA SUCCINILCOLINA



d-tubocurarina

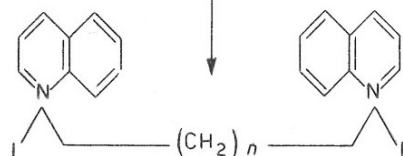
Dose curarizzante - (coniglio, e.v.): 0,15 mg/kg

(1935)

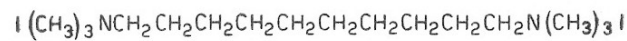


Dose curarizzante - (coniglio, e.v.): 0,25 mg/kg

(1946) ⁸



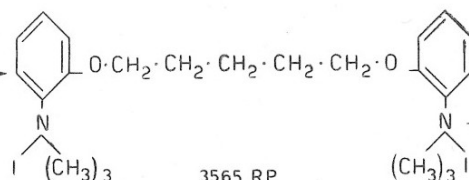
(1948) ⁸



diioduro di decametilene - ω - bistrimetilammonio (C₁₀-Decontrax)

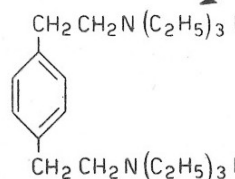
Dose curarizzante - (coniglio, e.v.): 0,18 mg/kg

(1948) ^{1, 32}



Dose curarizzante - (coniglio, e.v.): 0,2 mg/kg

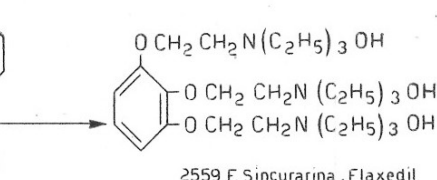
(1947) ⁸



Dose curarizzante - (coniglio, e.v.):

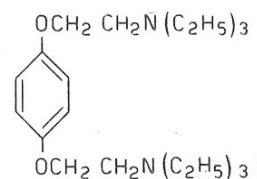
3 mg/kg

(1948) ^{5, 18, 19}



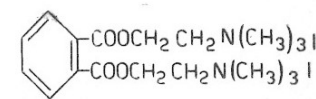
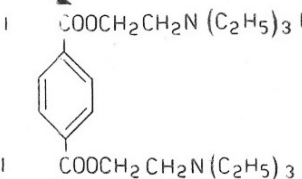
Dose curarizzante - (coniglio, e.v.): 0,5 mg/kg

(1947) ⁹



3 mg/kg

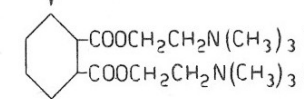
(1947) ⁹



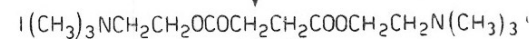
25 mg/kg

4 mg/kg

(1948) ^{6, 20}



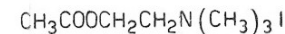
25 mg/kg



succinilcolina

Dose curarizzante - (coniglio, e.v.): 0,2 mg/kg

(1949) ⁷



Acetilcolina

* - per quanto riguarda i derivati di sintesi parziale della d-tubocurarina ed alcaloidi vicini, cfr. ³⁰

** - l'azione di altri derivati dello stesso tipo è stata descritta recentemente (²⁵)

N.B. - I numeri sottolineati (per es. ^{5, 18}) si riferiscono alle citazioni bibliografiche riportate al termine della relazione

chet e che si trovano assai spesso riprodotte, raggruppate sotto il nome di sostanze curariche:

1) alcune basi terziarie semplici, quali la piridina e la chinolina.

2) le basi a funzioni ammonio-quaternarie.

3) alcaloidi assai diversi come l'aconitina, la delfinina, la muscarina e la veratrina.

Si tratta secondo me di un sistema di classificazione che ricorda stranamente i primi cosiddetti *sistemi* dei botanici del '500, i quali basandosi sul fatto che la prima radice era situata alla base del seme, mettevano nello stesso gruppo il fico, la rosa, la vigna, il salice e l'abete.

Attualmente per noi farmacologi il gruppo delle sostanze le cui proprietà possono essere paragonate a quelle dei curari appare come molto più ristretto, e può concretarsi nei tre gruppi di proprietà seguenti:

1) curarizzanti sono per noi le sostanze di cui gli effetti paralizzanti si accompagnano con un *antagonismo competitivo nei riguardi dell'azione dell'acetilcolina sul muscolo striato* (*).

2) curarizzanti sono quelle sostanze le quali manifestano proprietà analoghe a quelle della d-tubocurarina *nei mammiferi o per lo meno negli omectermi*.

3) A questo criterio positivo dell'attività delle molecole se ne aggiunge un'altro egualmente importante: è quello che i farmacologi hanno l'abitudine di definire come criterio della specificità dell'azione. *L'assenza di reazioni secondarie importanti* — centrali, in particolare, o cardiovascolari — servirà a caratterizzare oltre che l'attività propria curarizzante manifestata, l'appartenenza al gruppo delle sostanze curariche.

Questi tre punti sono per me essenziali. Il primo perchè conferisce in un certo senso un valore di spiegazione alla definizione di un curaro rendendo il gruppo più omogeneo e eliminando gli agenti fisici, i deca'cificanti, gli ioni metallici e i diversi tipi di sostanze le quali, secondo Lapicque, sarebbero suscettibili di provocare un blocco neuro-muscolare agendo al livello della fibra nervosa.

Ugualmente necessario e logico mi sembra il desiderio di limitare ai soli vertebrati superiori la definizione di un gruppo di agenti farmacologici. Personalmente io sono convinto che il fatto di aver studiato durante quasi

(*) Riguardo al meccanismo con cui si esercita questo antagonismo, b'sogna peraltro notare che potrebbe non essere unico. Si ricorda qui che per Zaimis (36) specialmente l'azione propria dello ioduro di decametilene-bis-trimetilammonio (C_{10}) è lungi dall'essere paragonabile a quella della d-tubocurarina; questo potrebbe anche essere il caso per la succinilcolina.

quarant'anni — esattamente dal 1897, data del lavoro di Tillie — sui soli batraci l'azione delle proprietà del curaro è un motivo sufficiente per spiegare l'arresto delle nostre conoscenze in questo campo. Considerato nella rana il gruppo dei curari, come del resto quello dei muscarinici o dei simpatomimetici, riveste una fisionomia e un'estensione assai diversa da quella che prende nei mammiferi.

Il terzo punto la cui importanza non mi pare discutibile, resta il più difficile a definire poichè esso comporta un elemento arbitrario. Come valutare infatti, l'assenza sempre relativa di quelli che vengono chiamati gli effetti secondari e la sua azione elettiva? Il criterio più obbiettivo e insieme più semplice che noi abbiamo trovato per apprezzare gli effetti secondari di una sostanza curarizzante sul sistema cardio-vascolare e sui centri, è quello di somministrare parecchie dosi mortali all'animale in respirazione controllata.

Un vero curaro sarà praticamente sempre tollerato da un coniglio in respirazione controllata a dosi 10 volte superiori alla dose normalmente mortale e si potrà riservare il termine di « curari minori » a quei prodotti per i quali gli effetti sulla trasmissione neuro-muscolare non rappresentano che una manifestazione fra altre (26).

La questione dell'elettività dell'azione è strettamente legata alle possibilità dell'azione clinica. Per raggiungere questo scopo noi disponiamo attualmente di tre tipi di tecnica che corrispondono a tre stadi della ricerca:

1) I metodi esplorativi di cui il più noto è il « head drop method » che consiste nel somministrare al coniglio una dose limite di prodotto da saggiare, suscettibile di provocare nel 50 % degli animali un rilasciamento dei muscoli della nuca tale che l'animale sia obbligato a poggiare la testa al suolo (16). Con tecniche appropriate, si può anche ricercare il rilasciamento di altri gruppi di muscoli, e particolarmente di quelli dell'addome, il che, da un punto di vista clinico, riveste un interesse particolare (28).

2) I metodi analitici, i quali presentano nella determinazione dell'attività curarica un'importanza del tutto particolare. Nel cane, per esempio, si ricercherà la relazione che si può stabilire fra la sparizione dell'attività spontanea e l'ineccitabilità della preparazione neuro-muscolare, o allora le azioni generali sul sistema cardiovascolare e vegetativo.

3) I metodi di controllo che rappresentano la garanzia necessaria prima di un'ulteriore utilizzazione clinica. Questi metodi consistono essenzialmente nel mantenere sia il coniglio (27) che il cane (4) in respirazione artificiale, permettendo di precisare così il margine esistente fra la durata dell'azione e gli eventuali effetti secondari.

In conclusione, il campo dei curari naturali e di sintesi riserva ancora al botanico come al chimico biologo e al chimico organico, numerose incognite ed ancora un vastissimo campo di ricerche. Per i fisiologi e per i farmacologi, questo problema è ancora in piena evoluzione. Quello che noi abbiamo voluto far qui è di porre chiaramente i problemi che il curaro solleva.

Lo sviluppo della fisiologia è stato così lungo e così spesso legato a quello delle conquiste della farmacologia che non ci stupiamo oggi di vedere che il problema del curaro possa portare un buon contributo alle ricerche fisiologiche. Se il curaro ha avuto il merito di far porre per la prima volta e con chiarezza il problema della trasmissione neuromuscolare, noi abbiamo constatato che la questione del meccanismo intimo dell'azione farmacologica da esso esercitata si è ora spostato per riallacciarsi al problema più essenziale ancora posto dall'origine dell'energia che partecipa alla propagazione dell'influsso nervoso.

Per i farmacologi, è ora necessario riconsiderare con sostanze naturali o di sintesi pure tutto un campo essenziale della farmacologia.

Noi non abbiamo fatto oggi che tracciare i limiti e le definizioni in cui secondo noi bisogna imprigionare una sostanza considerata come un curaro.

Al di fuori dei problemi comuni a tutti i capitoli della farmacologia — problema dell'eliminazione, durata dell'azione, ripartizione negli organi — alcuni di quelli posti dai curari offrono un interesse assai nuovo e non sono stati che appena sfiorati. Alludo qui per esempio alla sensibilità dei diversi gruppi di muscoli, alla natura degli antagonismi e soprattutto alla questione che potrebbe essere assai feconda per gli elettrofisiologi come per gli studiosi di psicologia animale e che è quella dell'integrità dei centri durante la curarizzazione.

Su questo punto, la visione di Claude Bernard che vedeva nell'essere curarizzato un essere murato vivo capace di sentire e di pensare ma incapace di manifestarlo, si è pienamente verificata; e secondo me possiamo aspettarci molto dai documenti che ci saranno forniti dall'elettroencefalografia in particolar modo.

Voglio anche precisare che se ho lanciato un S. O. S. ai miei colleghi farmacologi perchè sperimentino tutte le volte che ciò è loro possibile sui mammiferi, ciò non toglie che la fisiologia comparata dei curari mi sembra porre dei problemi e aprire un campo di esperienze facili ad abbordare e dal quale possiamo attendere molto.

Infine le applicazioni cliniche possibili di questi prodotti stimoleranno nuove ricerche che saranno soprattutto orientate verso la maggiore innocuità di tali sostanze nell'uomo.

Scrivendo sul curaro ho spesso citato le parole di Claude Bernard:

«Le curare est une drogue assez rare qui s'est toujours présenté à nous avec un cortège de merveilleux».

E se oggi in alcuni punti abbiamo fatto mentire Claude Bernard mettendo in abbondanza nelle mani degli sperimentatori una serie di sostanze nuove, noi dobbiamo convenire che le sue parole sono sempre attuali nel loro valore generale perchè l'azione del curaro non ha ai nostri occhi perduto niente della sua singolarità e che anzi il progredire della questione ci ha fornito nuovi motivi per farci meravigliare dinanzi a un prodotto che può guarire, pur dando all'uomo l'apparenza della morte.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica terapeutica, giugno 1949.

BIBLIOGRAFIA

Il lettore potrà trovare una documentazione bibliografica nelle rassegne che abbiamo noi stessi pubblicato:

Bovet D. e Bovet Nitti F., «Structure et activité pharmacodynamique des médicaments du système nerveux végétatif», Karger, Bâle, 1948.

Bovet D. e Bovet Nitti F., *Experientia*, 1948, 4, 325; *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 1949, 12, 7.

Bovet D., «*Chim. e Industria*» 1949, 31, 147.

Fra le monografie recenti citeremo specialmente:

Cheymol J., in *R. Hazard*, «*Actualités pharmacologiques*», Masson, Paris, 1949.

Craig L. E., «*Chem. Rev.*», 1948, 42, 285.

Henry T. A., «*The Plant Alkaloids*», Churchill, London, 1949.

Karbe H., «*Die Pharmazie*», 1949, 4, 11.

Mc Intyre A. R., «*Curare, its natural history and clinical use*», Univ. of Chicago Press, 1947.

Paton W. D. M., *J. Pharm. a. Pharmacol.*, 1949, 1, 273.

Witkop B., *Die Chemie*, 1942, 55, 85.

I lavori particolarmente citati in questa conferenza e usciti in questi ultimi due anni sono i seguenti:

(1) *Barlow R. B. et Ing H. R.*, *Nature*, 1948, 161, 718; *Brit. J. Pharmacol. a. Chemot.*, 1948, 3, 298 — (2) *Biocca E.*, *Rend. Ac. Naz. Lincei*, (VIII), 1947, 2, 689; *Biocca E. e Ippolito M.*, *Ibid.*, 1947, 2, 872; 1947, 3, 162 — (3) *Blaschko H.*, *Bülbring E. e Chou T. C.*, *Brit. J. Pharmacol. a. Chemot.*, 1949, 4, 29 — (4) *Bovet D.*, *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 1949, 12, 180 — (5) *Bovet D.*, *Bovet Nitti F.*, *Guarino S. e Fusco R.*, *Helv. Physiol. Acta*, 1948, 6, 52 — (6) *Bovet D.*, *Bovet Nitti F.*, *Guarino S. e Longo V. G.*,

- Rend. Ist. Sup. Sanità, 1949, 12, 81 — (7) *Bovet D., Bovet Nitti F., Guarino S., Longo V. G. e Marotta M.*, Rend. Ist. Sup. Sanità, 1949, 12, 106 — (8) *Bovet D., Courvoisier S., Ducrot R. e Horclois R.*, C. R. Ac. Sc. 1946, 223, 597; 1947, 224, 1773; Arch. Intern. Pharmacod., 1949, 80, 137 — (9) *Bovet D., Depierre F., Courvoisier S. e De Lestrangle Y.*, Arch. Intern. Pharmacod., 1949, 80, 172; *Bovet D., Depierre F., e De Lestrangle Y.*, C. R. Ac. Sc., 1947 225, 74 — (10) *Bovet Nitti F.*, Rend. Ist. Sup. Sanità 1949, 12, 138 — *Bülbring E. e Depierre F.*, Brit. J. Pharmacol. a. Chemoth., 1949 4, 22.
- (12) *Chase H. F., Schmidt J. L. e Bhattacharya B. K.*, J. Pharmacol., 1947, 91, 237 — (13) *Collier H. O. J., Paris S. K. e Woolf L. I.*, Nature, 1948, 161, 817.
- (14) *Depierre F.*, C. R. Ac. Sc. 1947, 225, 956.
- (15) *Eccles I. C.*, Ann. Rev. Physiol., 1948, 10 — (16) *Everett G. M.*, Feder. Proc., 1947, 6, 101; J. Pharmacol., 1948, 92, 236.
- (17) *Ferrari W. e Costa E.*, Questo Bollettino, 1949, 25, 20 — (18) *Funcke A., Engeler C. O., Jacob J. e Depierre F.*, C. R. Ac. Sc., 1949, 228, 716 — (19) *Fusco R., Chiavarelli S., Palazzo G. e Bovet D.*, Gaz. Chim. Ital., 1948, 73, 951 — (20) *Fusco R., Palazzo G., Chiavarelli S., Bovet D.*, Gaz. Chim. Ital., 1948, 78, 511 — (21) *Fusco R., Palazzo G., Chiavarelli S. e Bovet D.*, Gaz. Chim. Ital., 1949, 79, 215.
- (22) *Guarino S.*, Rend. Ist. Sup. Sanità, 1949, 12, 198 e 237. *Guarino S. e Bovet D.*, Rend. Ist. Sup. Sanità, 1949, 12, 215; Arch. Intern. Pharmacod., 1949, 80, 159;
- (23) *Heymans C.*, Arch. Neerl. Physiol., 1948, 28, 419.
- (24) *Kensler C. J.*, J. Pharmacol., 1949, 95, 28 — (25) *Kimura K. K., Unna K. e Pfeiffer C. C.*, J. Pharmacol., 1949, 95, 149 — (26) *Kuffler S. W. e Acheson G. H.*, Feder. Proceed., 1948, 7.
- (27) *Longo V. G.*, Rend. Ist. Sup. Sanità, 1949, 12, 158; 1949, 12, 249 — (28) *Longo V. G. e Bovet D.*, Rend. Ist. Sup. Sanità, 1949, 12, 191,
- (29) *Marotta M.*, Rend. Ist. Sup. Sanità, 1949, 12, 242 — (30) *Marsh D. F., Herring D. A. e Sleeth C. K.*, J. Pharmacol., 1948, 95, 100; *Marsh D. F. e Pelletier M. H.*, J. Pharmacol., 1948, 92, 127, 454; *Marsh D. F., Sleeth C. K. e Tucker E. B.*, J. Pharmacol., 1948, 93, 109.
- (31) *Nachmansohn D.*, XV Intern. Physiol. Congr., Oxford, 1947; Bull. Johns Hopkins Hospital, 1948, 83, 463.
- (32) *Paton W. D. M. e Zaimis E. J.*, Nature, 1948, 161, 718; 1948, 162, 810. *Organe G., Paton W. D. M. e Zaimis E. J.*, Lancet, 1949, 256, 21 — (33) *Peterfalvi M. e Jequier R.*, C. R. Soc. Biol., 1948, 142, 729.
- (34) *Van Den Ostende A.*, Arch. Intern. Pharmacod., 1948, 75, 419.
- (35) *Wien R.*, Arch. Intern. Pharmacod., 1948, 77, 96; J. Physiol., 1948, 107, 448,
- (36) *Zaimis E.*, J. Physiol., 1949, 109.
-