

61. Franco SCANGA. — La pectina quale mezzo ritardante l'assorbimento della penicillina.

Riassunto. — Dopo aver sommariamente esposto i mezzi finora impiegati per ritardare l'assorbimento della penicillina, l'Autore mediante una serie di ricerche sperimentali sul coniglio studia l'azione esplicata dalla pectina, quale solvente ritardante l'assorbimento della penicillina.

Résumé. — Après avoir exposé d'une façon sommaire les moyens employés jusqu'ici pour retarder l'absorption de la pénicilline, l'A. prend en considération la possibilité d'utiliser la pectine comme solvant retardant l'absorption de la pénicilline (le sel de sodium ou de potassium, ou le sulfate).

A la suite d'une série de recherches expérimentales effectuées sur le lapin, l'A. conclut que la pectine exerce une action retardatrice *effective, mais limitée*; cette action n'est en aucun cas comparable à celle de la pénicilline en cire et huile, ni à celle, qui est encore meilleure, de la pénicilline-procaïne, que l'on doit toujours considérer comme moyens de choix pour cette action de retard; l'emploi de la pectine serait utile et à conseiller seulement pour remplacer la solution physiologique ou l'eau bidistillée qui sont utilisées d'ordinaire comme solvants dudit antibiotique, car en ce cas la pectine aurait l'avantage de réduire, sans aucune aggravation du coût, le nombre des injections de pénicilline à pratiquer dans les 24 heures. Quant au mécanisme d'action, l'A. est incliné à croire, d'après ses recherches, que la pectine agisse indirectement sur l'absorption de la pénicilline, peut-être par une réduction de la perméabilité des vaisseaux capillaires, ou bien par une action de blocage sur les enzymes auxquels dans l'organisme revient le rôle de la scission de la pénicilline. Ces hypothèses, toutefois, méritent une confirmation expérimentale.

Summary. — After briefly reporting on the means hitherto used for retarding the absorption of penicillin, the A. considers the possibility of using pectin as a solvent retarding the absorption of this antibiotic (its sodium or potassium salt, or the sulphate).

Following a series of experimental investigations carried out on rabbits, the A. concludes that pectin has an *actual, but limited* retarding action, which, indeed, in no case is comparable with that of wax-and-oil penicillin or of the still preferable procaine-penicillin, which are always to be considered as the best means for obtaining this retarding action; the use of pectin would only be convenient and recommendable as a substitute for the physiological salt solution or the doubly distilled water commonly used as solvents of the above antibiotic, as in this case the

use of pectin would offer the advantage of reducing, with no increase in expense, the number of the injections of penicillin to be administered in the 24 hours. As to the mechanism of action, the A. is inclined to think; on the basis of his researches, that pectin acts indirectly on the absorption of penicillin, perhaps by diminishing the permeability of the capillary blood vessels, or else by blocking the enzymes on which, in the organism, devolves the scission of penicillin. Such assumptions, however, require to be confirmed experimentally.

Zusammenfassung. — Nach einer zusammenfassenden Darlegung der bisher verwendeten Mittel zur Verzögerung der Penicillinabsorption, erwägt der Verfasser die eventuelle Anwendung des Pektins als die Penicillinabsorption verzögerndes Lösungsmittel. (Natrium-oder Kaliumsalz oder Penicillinsulphat).

Auf Grund einer Reihe experimenteller Versuche auf Kaninchen, schliesst der V., dass das Pektin eine *effektive* und doch *begrenzte* verzögernde Wirkung ausübt; diese Wirkung ist in keinem Falle mit der des wachs öligen Penicillins oder besser des Procain-Penicillins vergleichbar, letztere müssen immer als Wahl-Verzögerungsmittel angesehen werden. Für das Pektin würde eine nützliche und anzurathende Anwendung nur an Stelle des Vassers, der physiologischen Lösung, oder des Zweimal destillierten Wassers, die normaler Weise als Lösungsmittel des Antibiotikums dienen, in Betracht kommen. Diese Ersetzung würde eine Herabsetzung der Zahl der Penicillineinspritzungen in den 24 Stunden mit sich bringen, ohne jegliche ökonomische Belastung. Was den Wirkungsmechanismus anbelangt, glaubt der V. auf Grund seiner Untersuchungen annehmen zu können, dass das Pektin indirekt auf die Absorbierung des Penicillins wirkt, vielleicht durch Verminderung der Durchlässigkeit der Blutkapillare, oder durch Blockade der Enzyme, welchen in Organismus die Penicillinspaltung zufällt. Diese Annahmen benötigen eine experimentelle Bestätigung.

E' noto come, a causa della rapidità con cui la penicillina viene eliminata dall'organismo, si sia cercato di ovviare all'inconveniente di dover iniettare continuamente, a brevi intervalli di tempo, l'antibiotico, ricorrendo a mezzi che ritardassero l'escrezione della sostanza attraverso i reni o ne rallentassero l'assorbimento.

Poichè la penicilina viene quasi interamente eliminata per la via renale, prevalentemente attraverso i tubuli (80%), si è anzitutto sperimentato se l'impiego di determinate sostanze, che fossero eliminate come la penicillina attraverso il filtro dei tubuli, potesse ostacolare o ritardare l'escrezione dell'antibiotico, mediante un meccanismo di saturazione funzionale dei

tubuli stessi. Varie ricerche compiute da diversi Autori in questo senso hanno confermato la possibilità di un blocco competitivo della penicillina (1).

Le principali sostanze sperimentate sono state: la iodopirina (2-3), l'acido paraminiopporico (4-5-6-7-8-9) e la caronamide (10-11-12-13-14-15).

Altri AA. hanno anche consigliato di ricorrere a sostanze che non agiscono in sensi specifici sulla escrezione della penicillina, ma che provocano in genere un'oliguria artificiale (estratti di ipofisi posteriore). Tuttavia i risultati ottenuti con tali sostanze e la poca praticità del loro impiego, necessitando sempre un continuo controllo medico, hanno limitato il loro uso a pochi casi particolari.

(1) G. RAKE a. A. P. RICHARDSON, Pharmacology of penicillin, Ann. N. Y. Acad. Sci., 48, 143 (1946).

(2) K. H. BEYER, New concept competitive inhibition of the renal tubular excretion of penicillin, Science, 105, 94 (1947).

(3) C. H. RAMMELKAMP, Excretion of penicillin in man, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 53, 30 (1943).

(4) L. LOEWE, P. ROSEMBLATT, E. ALTURE-WERBER a. M. KOZAK, The prolonging action of penicillin by para-aminohippuric acid, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 58, 298 (1945).

(5) K. H. BEYER, W. F. VERWEY, R. WOODWARD, L. PETERS a. P. A. MATTIS, The enhancement of the plasma concentration of penicillin in dogs by the simultaneous administration of paraaminohippuric acid, Am. J. M. Sci., 209, 608 (1945).

(6) E. H. SPANDING jr., A. BONDI a. EARLY, The effect combining sodium benzoate with oral penicillin, Science, 105, 210 (1947).

(7) L. LOEWE, P. ROSEMBLATT a. E. ALTURE-WERBER, A refractari case of subacute bacterial endocarditis due to *Veillonella gazogenes* clinically arrested by a combination of penicillin sodium para-aminohippurate and heparin, Am. Haert P., 32, 327 (1946).

(8) BRONTENBREBBER a. G. B. FAVOUR, Increasing and prolonging blood penicillin concentration, Science, 101, 673 (1945).

(9) K. H. BEYER, H. FLIPPIN, W. F. VERWEY a. R. WOODWARD, Effect of paraaminohippuric acid on plasma concentration of penicillin in the man, J. A. M. A., 126, 1007 (1944).

(10) C. C. SHAW, W. P. BAGER, J. W. CROSSON a. coll., Enhancement of penicillin blood levels in man by means of new compound caronamide, Am. J. Med., 3, 206 (1947).

(11) K. H. BEYER, A. K. MILLER, H. F. RUSSO a. coll., Inhibitory effect of caronamide on renal elimination of penicillin, Am. J. of Physiol., 149, 359 (1947).

(12) A. O. SEELBER, C. WILCOX a. M. FINLAND, Enhancement of blood levels by caronamide during intramuscular administration of penicillin, J. Lab. a. Clin. Med., 2, 807 (1947).

(13) J. W. CROSSON, W. P. BOGER, C. C. SHAW a. A. K. MILLER, Caronamide for increasing penicillin plasma concentrations in man, J. A. M. A., 134, 1528 (1947).

(14) E. STRAUSS, P. L. RICHBURG, P. Z. SABA a. E. ALEXANDER, Enhancement of plasma penicillin concentrations by caronamide and sodium benzoate, J. Lab. a. Clin. Med., 32, 818 (1947).

(15) R. D. REID, L. C. FELTON a. M. A. PITTHOFF, Prolongation of penicillin activity with penicillinasi inhibiting compounds, 63, 438 (1946).

Le ricerche sono state perciò rivolte a trovare e a perfezionare i mezzi atti a ritardare l'assorbimento della penicillina; in tal maniera, mentre l'escrezione attraverso i reni rimarrebbe immutata, la penicillina passerebbe dal punto di inoculazione nel sangue molto lentamente, facendo sì che il livello ematico duri un tempo maggiore.

Si sono così sperimentati vari mezzi, che noi qui ci limitiamo semplicemente ad elencare, rimandando per una più particolareggiata esposizione a nostri precedenti lavori (16-17); tali mezzi sono:

1) raffreddamento della sede di inoculazione mediante impacco di ghiaccio (18);

2) associazione alla soluzione di penicillina di sostanza ad azione vasocostrittiva (19-20);

3) impiego di sostanze varie come gelatina, lecitina o anche il sangue (21-22-17);

4) preparazione di un'emulsione oleosa di penicillina in soluzione acquosa (23-24-25);

5) incorporazione della penicillina in polvere in un mestruo cereo-oleoso (26-27-28-29-30-31-32);

(16) F. SCANGA, Penicillina ritardo, *Rec. Progressi in Medicina*, vol. V, n. 4 (1948).

(17) F. SCANGA, L. LILLO e N. GANDOLFO, L'assorbimento della penicillina in veicolo idro-ematico, *Rendiconti, Ist. Sup. Sanità*, vol. XI (1948).

(18) M. TRUMPER a. A. M. HUTTER, Prolonging effective penicillin action, *Science*, 100, 432 (1944).

(19) R. T. FISX, A. G. FOORD a. G. ALLES, Prolongation of penicillin activity by means of adrenalin, *Science*, 101, 124 (1945).

(20) H. PARKINS, M. WILEY, J. CHAUDY a. H. A. ZINTEL, Maintenance of blood level of penicillin after intramuscular injection, *Science*, 1, 203 (1945).

(21) E. R. DOLL a. W. W. DIMOEK, Efficacy of various agents for delaying absorption of penicillin, *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 108, 310 (1946).

(22) CH. P. ARMSTRONG, R. M. HALPERN a. W. C. CUTTING, Prolongation of the action of penicillin after intramuscular injection, *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 58, 74 (1945).

(23) A. W. HARRIS, C. WILCOX a. M. FINLAND, Plasma level after repository injection of penicillin in water in-oil-emulsion, *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 63, 199 (1946).

(24) E. R. DOLL a. F. E. HULE, Serum level of penicillin in horses and sheep following infection in a water in-oil vehicle, *Vet. Med.*, 42, 24 (1947).

(25) A. B. CANNON, K. LINDSTROM a. A. G. OSPECK, Maintenance of penicillin blood levels after a single intramuscular injection of penicillin in various oils, *Science*, 104, 414 (1946).

(26) D. W. ATCHESON a. D. EDMEADES, Blood levels and urinary excretion in peanut oil, beeswax and penicillin mixture, *Science*, 102, 199 (1945).

(27) F. SCHUTZ a. J. N. HAWTHORNE, An agent delaying the absorption of penicillin, *Nature*, 158, 132 (1946).

(28) G. W. RAIZISS, Penicillin in oil suspension. Bacteriostatic and spirochetidal agent, *Science*, 100, 412 (1944).

6) utilizzazione di un sale insolubile di penicillina (penicillina-procaina) sia in sospensione acquosa sia in sospensione oleosa, con o senza monostearato di alluminio ⁽³³⁾.

Indiscutibilmente l'azione ritardatrice di queste ultime preparazioni di penicillina-procaina è veramente notevole, arrivandosi ad ottenere con una dose unica di 300.000 U. livelli ematici sufficienti per periodi superiori alle 24 ore. Ma d'altra parte, è anche vero che l'uso di tali preparati è, al momento attuale, in Italia, molto costoso, in quanto una dose giornaliera di 300.000 U. di penicillina-procaina (cm³ 1) viene venduta al prezzo di Lire 2000, là dove la stessa quantità di penicillina cristallizzata costa appena 300 lire. Ed infatti, che l'utilizzazione dei preparati di penicillina-procaina sia ancora piuttosto limitato, lo dimostra l'esigua percentuale del loro consumo, in confronto ai miliardi di unità di penicillina che tuttora si adoperano in Italia sotto forma di soluzione acquosa.

Il poter trovare perciò una sostanza che unisca al requisito del basso costo di produzione quello di un'azione ritardante sull'assorbimento della comune penicillina del commercio, è pertanto, in base alle suesposte premesse, un problema non privo di attualità e d'importanza in Italia. Finchè si continuerà ad adoperare penicillina sodica o potassica o qualsiasi altro sale, sotto forma di soluzione acquosa, l'impiego di un solvente atto a rallentare l'eliminazione della penicillina, rispondendo ben inteso al particolare requisito economico, dovrà necessariamente trovare la sua utile e totalitaria applicazione.

In base a questa premessa, perfettamente logica, abbiamo creduto utile prendere in considerazione e studiare sperimentalmente l'azione esplicata dalla pectina, quale mezzo ritardante l'assorbimento della penicillina. Essendo tale azione ammessa da molti ma pur negata da alcuni Autori (da 34 a 43), e poichè tali affermazioni sono prevalentemente basate

(29) M. J. ROMANSKY a. G. E. RITTMAN, A method for prolonging the action of penicillin, *Science*, 100, 196 (1944).

(30) M. J. ROMANSKY a. G. E. RITTMAN, Penicillin blood levels for twentyfour hours following a single intramuscular injection of calcium penicillin in beeswax and peanut oil, *New England J.*, 233, 577 (1945).

(31) M. J. ROMANSKY, R. J. MURPHY a. G. E. RITTMAN, Single injection treatment of gonorrhea with penicillin in beeswax peanut-oil, *J.A.M.A.*, 128, 404 (1945).

(32) H. F. DOWLING, M. J. ROMANSKY, H. WELCH, J. A. ROBINSON, W. L. CHANDLER, W. W. ZELLER a. H. L. HIRSH, «Liquid» versus «solid» penicillin in oil and wax, *J.A.M.A.*, 135, 567 (1947).

(33) D. K. KITCHEN a. coll., Procaine penicillin G, estratto inviato personalmente all'Autore.

(34) U.S.I.S., *Medicina*, 17, 47 (1947).

(35) *Riforma medica*, Editoriale, 61, 543 (1947).

sui risultati ottenuti in clinica, noi abbiamo voluto controllare con una serie di ricerche sperimentali sugli animali la probabile azione della pectina sull'assorbimento della penicillina.

Per necessità tecniche dipendenti sia dal gran numero di salassi da eseguire a brevi periodi di tempo, sia dalle successive prove in vitro, che si è volute compiere tutte nelle stesse condizioni di esperimento, i vari lotti di animali non sono stati inoculati contemporaneamente, ma a piccoli gruppi per ciascun lotto.

Per la prima prova riguardante l'inoculazione della penicillina in semplice soluzione acquosa, abbiamo inoculato complessivamente 6 conigli, del peso medio di g 1.500. Ad ogni animale sono state inoculate 100.000 U. di penicillina disciolte in 3 cm³ di acqua bidistillata. In base ai risultati da noi precedentemente ottenuti in altre ricerche del genere, abbiamo praticato il salasso di ciascun animale ogni ora, a partire da quella dell'inoculazione, fino all'ottava.

Il sangue prelevato ogni volta (circa 2 cm³) era messo in provette e lasciato coagulare. Veniva intanto preparata una serie di piastre di agar-germe, secondo la tecnica da noi precedentemente descritta: piastre di 12 cm di diametro; agar a pH 7,2 fluidificato e quindi portato a 45° C. All'agar così disciolto si aggiunge, mescolando opportunamente, cm³ 0,5 di una brodocultura di 24 h di *Stafilococco aureo* per ogni 100 cm³ di agar. In ciascuna piastra si versano cm³ 15 di agar-germe, si lasciano solidificare e quindi si fanno stare 24 ore in ghiacciaia. Dopo di che si praticano nell'agar sei fori, per ciascuna piastra, servendosi di un foratappi di 8 mm di diametro e si asportano con una lancetta da vaccinazione infilata in un comune portapenna i dischetti di agar delimitati dal foratappi. Si ottengono così per ogni piastra sei pozzetti; in quattro pozzetti di ciascuna piastra si verseranno cm³ 0,05 di siero in esame, e nel 5° e 6° pozzetto cm³ 0,05 di due soluzioni a titolo noto di penicillina, contenenti rispettivamente 0,05 e 0,025 U/cm³. Le piastre così preparate sono

(³⁶) M. PIAZZA e P. FUGAZZA, Comunicazione alla Soc. Medico Chirurgica di Como, 18 marzo 1948.

(³⁷) A. STAZZI e E. BARENGO, Comunicazione al Congresso Nazionale Antibiotici, 1° ottobre 1948.

(³⁸) G. F. CODURI e M. PIAZZA, Comunicazione al XXI Congresso di Pediatria, Stresa, 4 novembre 1946.

(³⁹) I. PISTELLI, W. BONDAVALLI e P. LEVI, Boll. Soc. Med. Chir., Modena, 48 (1948).

(⁴⁰) B. ROVATTI, Rivista di terapia pratica, 47, 77 (1948).

(⁴¹) Comunicazione al Congresso di Tisiologia, Cortina d'Ampezzo, 2 marzo 1949.

(⁴²) G. BONEZZI, Ricerche sull'eliminazione della penicillina iniettata in soluzione con pectina, Lab. Igiene e Profilassi, Como.

(⁴³) A. GRECO, Comunicazione personale.

poste in termostato ed osservate dopo 24 ore, misurando il diametro dell'alone di inibizione ottenuto per ogni siero e per le due soluzioni controllo.

Nella tabella 1 sono indicati tali risultati, trascrivendo per ogni siero il valore medio di due misurazioni e tenendo presente che nei pozzetti controllo contenenti cm^3 0,05 della soluzione di penicillina con 0,05 U/ cm^3 si ottiene un alone di inibizione di cm 1,4-1,3, ed in quelli contenenti cm^3 0,05 della soluzione con 0,025 U/ cm^3 , un alone di cm^3 1,2-1,1. Da precedenti ricerche risulta che nelle nostre condizioni di esperimento, nessun alone misurabile si ottiene usando una soluzione di penicillina contenente 0,01 U/ cm^3 .

Come si vede dai risultati ottenuti, pur avendo inoculato un quantitativo così elevato di penicillina, noi riusciamo ad ottenere il livello ematico non inferiore a 0,025 U/ cm^3 fino alla 4^a ora nella totalità degli animali inoculati, fino alla 5^a ora in 4 su 6, fino alla 6^a ora in 2 su 6, fino all'8^a ora in un solo animale.

Ben diversi sono invece i risultati ottenuti inoculando sia penicillina in veicolo cereo-oleoso, secondo la prima formula Romansky, sia iniettando penicillina-procaina micromolecolare, sospesa in olio di arachidi, con monostearato di alluminio.

Nel primo caso la concentrazione della penicillina nel sangue raggiunge il titolo maggiore la 2^a e la 3^a ora, per poi decrescere progressivamente, pur mantenendosi in quantità dosabili fino alla 24^a ora.

La penicillina-procaina mostra invece un andamento del titolo molto caratteristico: sin dalla prima ora si determina nel sangue un livello piuttosto elevato che non decresce progressivamente e piuttosto sensibilmente, come nel caso della penicillina in veicolo cereo-oleoso, ma si mantiene più o meno stazionaria per molte ore, arrivando a concentrazioni ancora elevate alla 24^a ora ed ancora dosabili, nelle nostre condizioni di esperimento, sino alla 48^a ora.

Esiste quindi una differenza sostanziale tra assorbimento ritardato della penicillina cereo-oleosa e quello della penicillina-procaina. Si constata cioè che l'assorbimento della penicillina-procaina è *uniformemente* ritardato, così che la concentrazione ematica si mantiene ad un livello piuttosto elevato durante tutte le prime 24 ore.

Siamo passati quindi a studiare l'eventuale azione ritardante determinata dalla pectina. Per far ciò ci siamo serviti di una soluzione colloidale convenientemente purificata, al 2%, di pectina, in veicolo acquoso tamponato a pH 6,5. La penicillina (sale sodico G) veniva opportunamente disciolta mediante tale solvente, nella proporzione di 3 cm^3 di pectina per ogni 100.000 U. O. Tale quantitativo è stato inoculato sottocute a ciascun coniglio, praticando successivamente ad intervalli regolari di

TABELLA I.

Inoculazione sottocutanea di 100.000 U.	Salasso compiuto dopo ore													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	24	48	
Penicillina in soluzione acquosa	3,9	2,6	1,2	1,1	—	—	—	+	—	—	—	—	—	
	3,9	3,1	1,6	1,4	1,2	—	—	—	—	—	—	—	—	
		2,9	1,3	1,1	1,2	—	—	—	—	—	—	—	—	
		3,5	2	1,6	1,4	1,2	1,1	1,1	—	—	—	—	—	
Penicillina in olio e cera d'api		3,3	2,9	2	1,3	1,2	1,1	—	—	—	—	—	—	
		3,3	2,6	1,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	3,2	4,1	3,7	3,1	2,8	2,8	2,2	2,2	2,1	2,0	1,4	1,4	—	
	3,1	3,6	4,1	3,5	3,0	3,0	2,4	2,4	2,5	2,2	1,3	1,3	—	
Penicillina procaina in sospensione oleosa	3,4	2,8	2,9	2,7	2,9	2,7	2,9	3	2,9	2,6	2,8	2,8	1,2	
	3,6	3,6	3,5	3,0	3,2	3,2	2,7	2,6	2,5	2,5	2,6	2,6	1,2	
	3,5	3,5	3,5	3,2	3,3	3,0	8,9	2,9	3,0	2,9	3,0	3,0	1,5	
Penicillina disciolta in 3 cm ³ di pectina al 2 %	3,4	4,0	3,0	2,4	1,8	2,4	1,7	1,2	1,2	1,4	—	—	—	
	3,6	3,6	3,0	2,3	2,1	1,6	1,4	1,2	—	—	—	—	—	
	3,0	3,7	3,3	3,1	2,1	1,5	1,4	—	—	—	—	—	—	
	2,7	2,1	1,3	1,2	1,1	1,2	—	—	—	—	—	—	—	
	3,4	2,5	2	1,4	1,4	1,2	1,5	1,3	—	—	—	—	—	
		3,6	2,8	2,3	1,7	2,5	1,5	1,2	—	—	—	—	—	
					2,0	1,5	1,3	1,3	1,2	1,2	—	—	—	
		1,9			1,9	1,3	1,2	1,1	—	—	—	—	—	
		3,5	3,8	3,5		3,4	2,6	1,7	1,3	1,2	—	—	—	
	3,2	4,1		3,5		2,5	1,5	1,6	—	—	—	—	—	
		3,7		2,5		2,6	1,5	1,5	1,2	1,3	—	—	—	
		3,2		2,7		2,6	1,5	1,5	—	—	—	—	—	
		3,5		2,8		2,3	1,6	1,3	—	—	—	—	—	

tempo il salasso mediante puntato cardiaco, e procedendo quindi alla titolazione dell'antibiotico nel sangue, secondo la tecnica e con le modalità precedentemente descritte. Gli animali complessivamente trattati, in tre riprese, sono stati dodici; nessuno di essi è morto durante la pratica del salasso. I valori delle prove di titolazione in vitro sono riportati anche nella tabella I. Tali risultati ci portano a formulare le seguenti considerazioni:

1) La pectina determina effettivamente un prolungamento della permanenza della penicillina nel sangue, ma è bene intendersi, fin d'ora, si tratta soltanto di un'azione ritardatrice limitata, senza che minimamente si possa parlare di un ritardo prolungato come nel caso della penicillina cereo-oleosa e tanto meno della penicillina-procaina.

La pectina determina un rallentamento nell'eliminazione della penicillina, che, in rapporto alla soluzione acquosa, assume le proporzioni indicate nella tabella II.

Cioè noi vediamo che con la pectina il periodo di permanenza della penicillina nell'organismo *viene ad essere, a parità di dose, quasi raddoppiato in confronto alla penicillina in soluzione acquosa*, il che costituisce indiscutibilmente un notevole vantaggio, ma vantaggio in rapporto esclusivamente all'impiego della comune soluzione acquosa. Ma di questo parleremo meglio in seguito.

In un secondo gruppo di ricerche noi ci siamo proposti di osservare se facendo variare la quantità di pectina da unirsi alla penicillina, si avessero parallelamente differenze nell'azione ritardatrice determinata dalla sostanza. Abbiamo perciò inoculato due gruppi di animali, il primo con 100.000 U. di penicillina disciolte in cm^3 1,5 di soluzione di pectina, ed il secondo gruppo con 100.000 U. disciolte in cm^3 6 di pectina.

I risultati ottenuti (tabella III), paragonati con quelli avuti impiegando cm^3 3 di pectina (tabella I) mostrano che mentre aumentando da 3 a 6 cm^3 la quantità di pectina da unire alla penicillina non si determina alcuna apprezzabile variazione sul prolungamento della presenza dell'antibiotico nel sangue, con la diminuzione invece della pectina a cm^3 1,5 si ottiene un'azione ritardatrice sensibilmente minore.

Tutto questo deve essere preso in attenta considerazione, perchè mostra l'importanza del rapporto tra pectina e peso dell'organismo in cui si inocula l'antibiotico, importanza tanto maggiore qualora si tenga conto che nelle nostre prove abbiamo lavorato su animali come il coniglio il cui peso medio è di g 1.500.

Stabilita l'azione ritardatrice determinata dalla pectina, noi abbiamo voluto studiare con quale meccanismo si venisse a determinare tale rallentamento; varie ipotesi si possono formulare e di esse le principali possono essere così riassunte:



TABELLA II.

NUMERO DI ANIMALI CON LIVELLO EMATICO ANCORA DOSABILE, DOPO LE SEGUENTI ORE DALL'INOCULAZIONE

	Ora del salasso											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	24
Penicillina in soluzione acquosa	6	6	6	6	4	2	1	1	0	0	0	0
	100 %	100 %	100 %	100 %	66 %	33 %	16 %	16 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Penicillina con pectina	12	12	12	12	12	12	11	10	4	4	0	0
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	91 %	83 %	33 %	33 %	0 %	0 %

TABELLA III.

Inoculazione sottocutanea di 100.000 U.	Salasso compiuto dopo ore													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	24	48	
Penicillina sciolta in cm ³ 1,5 di pectina	3,5	3,4	2,5	1,3	1,2	1,2	1,1*	—	—	—	—	—	—	
	3,1	2,7	2,1	1,2	1,2	1,1	—	—	—	—	—	—	—	
		3,0	2,5	2,1	1,4	1,2	—	—	—	—	—	—	—	
Penicillina sciolta in cm ³ 6 di pectina	3,1	2,6	2,1	2,0	1,5	1,3	1,4	1,2	—	—	—	—	—	
	3	2,7	2,5	2,0	2,0	†	—	—	—	—	—	—	—	
	3,9	3,5	3,0	2,0	1,5	1,4	—	—	—	—	—	—	—	
		3,5		3,0		2,5	1,7	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	
		3,5		2,9		2,5	1,9	1,9	1,4	1,2	1,2			

1) La penicillina, sciogliendosi nella soluzione colloidale di pectina verrebbe effettivamente fissata o legata alle grosse molecole del colloide e quindi, dopo l'inoculazione verrebbe messa in libertà più o meno lentamente (39).

2) La pectina agirebbe mediante un meccanismo di protezione contro azioni distruttive enzimatiche da parte dell'organismo verso l'antibiotico (37-43).

3) La pectina, più che determinare un ritardo nell'assorbimento in situ, provocherebbe un aumento del deposito viscerale della penicillina, mediante un complesso meccanismo di accumulo (38).

4) La pectina eserciterebbe la sua azione ritardatrice mediante una diminuzione della permeabilità dei capillari che porterebbe come conseguenza un rallentato assorbimento della sostanza (40).

Onde valutare bene queste varie possibilità,, noi abbiamo creduto opportuno compiere un secondo gruppo di ricerche, con il seguente programma di lavoro:

A) Vedere anzitutto se iniettando la penicillina, disciolta nella soluzione di pectina, per via endovenosa anzichè per via sottocutanea, si determinasse ugualmente un ritardo nell'eliminazione dell'antibiotico. Gli animali inoculati sono stati complessivamente 14; 6 hanno ricevuto, per via endovenosa, 100.00 U. di penicillina in soluzione acquosa ed 8 invece 100.000 U. di penicillina con 3 cm³ di soluzione di pectina. Nella tabella v sono riportati i risultati ottenuti; essi dimostrano che anche per via endovenosa la pectina riesce a determinare un certo rallentamento nella eliminazione della penicillina, proporzionalmente, si capisce, alla rapidità con cui l'antibiotico si elimina, come del resto è noto, qualora venga iniettato direttamente nel circolo ematico.

TABELLA IV.

Inoculazione endovenosa di 100.000 U.	Salasso compiuto dopo ore							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Penicillina in soluzione acquosa	3,3	1,8	1,9	1,5	—	—	—	—
	3,0	1,5	1,1	—	—	—	—	—
	2,4	1,4	—	—	—	—	—	—
	2,5	1,8	1,9	1,3	1,4	—	—	—
	3,3	1,4	1,5	1,2	—	—	—	—
	4	1,4	1,4	1,1	—	—	—	—
Penicillina disciolta in cm ³ 3 di pectina	2,5	1,5	1,1	1,1	—	†	—	—
	3	2,5	1,3	1,2	—	—	—	—
	3,1	1,3	1,3	1,6	1,3	1,1	1,2	—
	3	1,5	1,2	1,7	1,2	—	—	—
	3,1	2,2	1,8	1,5	1,3	1,3	1,1	—
	2,9	2,2	1,8	1,8	1,9	1,5	1,2	—
	3,5	2,0	1,2	—	—	—	—	—
	3,5	1,7	1,2	—	—	—	—	—

Questi risultati però da soli non ci autorizzerebbero ad escludere un eventuale azione ritardatrice sull'assorbimento dell'antibiotico, determinata dal legame molecole di pectina+penicillina, in quanto tale azione potrebbe esplicarsi, qualunque fosse la via d'introduzione della soluzione.

B) Abbiamo quindi voluto ricercare se la pectina esercitasse un'azione ritardatrice, *senza essere preventivamente messa a contatto con la penicillina*, prima di venire inoculata.

Abbiamo perciò inoculato un gruppo di conigli con cm³ 3 di pectina mediante iniezione sottocute nel fianco sinistro dell'animale; quindi, servendoci di un'altra siringa, abbiamo iniettato in ogni animale, sottocute nel fianco destro, 100.000 U. di penicillina in soluzione acquosa. Nella tabella vi sono riportati i risultati ottenuti:

TABELLA V.

	Salasso compiuto dopo ore										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Inoculazione sottocutanea di cm ³ 3 di pectina e di 100.00 U. di penicillina separatamente	3,1	3,1	†								
	3,0	2,6	1,3	1,3	1,3	—	—	—	+		
	3,0	2,5	1,3	1,5	1,1	1,1	—	—	—	—	—
				1,5	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	—	—
				1,6	1,3	1,2	1,2	1,2	1,1	—	—
				1,4	1,2	1,1	1,0	1,1	1,1	—	—
	3,8	4,1	2,4	1,3	1,5	1,3	—	—	—	†	
	4	3,5	2,7	1,5	1,2	1,2	—	†	—	—	—
		3,3		1,2	1,2	1,2	1,3	1,3	1,1	1,1	—
		2,3		1,4	1,2	+					
		3,7		1,2	1,3	1,2	1,4	1,3	1,4	1,2	—
		3,5		†							

In questo gruppo di animali abbiamo avuto la maggior mortalità di tutte le nostre prove, determinata dalle ripetute punture intracardiache per il salasso; su 12 conigli trattati 3 sono morti quando ancora v'era un livello ematico dimostrabile, e pertanto non ne possiamo tener conto per le conclusioni; altri due animali sono morti alla fine dell'esperimento, quando già la penicillina non era più dosabile nel siero e pertanto non hanno in alcun modo influenzato le nostre prove.

I risultati, riportati nella tabella vi, ci inducono a supporre che se anche non esclusivamente certo in maniera prevalente la pectina agisce sull'assorbimento della penicillina, indirettamente, mediante un'azione che nulla vieta possa essere una diminuita permeabilità dei capillari, oppure un blocco degli enzimi che nell'organismo sono devoluti alla distruzione della penicillina.

C) Onde avere un'altra conferma di questi risultati abbiamo creduto utile ripetere la stessa prova inoculando separatamente e per via endovenosa prima la penicillina in soluzione acquosa (100.000 U.) e, subito dopo,

TABELLA VI.

NUMERO DI ANIMALI CON LIVELLO EMATICO ANCORA DOSABILE, DOPO LE SEGUENTI ORE DALL'INOCULAZIONE

	Ora del salasso											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	24
Penicillina e pectina inoculate separatamente												
Numero animali . .	9	9	9	9	9	7	5	5	9	2	0	0
Percentuali	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	77 %	55 %	55 %	55 %	22 %	0 %	0 %

TABELLA VII.

	Salasso compiuto dopo ore							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Inoculazione separata, per via endovenosa di 100.000 U. di penicillina in soluzione acquosa e di 3 cm ³ di pectina	3,9		1,2	1,2	1,1	1,1	—	—
	3,6	1,3	1,2	1,3	1,5	1,3	—	—
	3,8	3,6	3,5	2,8	2,8	2,4	2,2	—
	4	3,8	3,5	2,9	2,9	2,5	1,9	—
	4,3	2,0	1,2	1,2	1,2	—	—	—
	4	2,5	1,3	1,2	1,3	—	—	—

adoperando un'altra siringa, la pectina. I risultati sono riportati nella tabella VII e dimostrano che la pectina riesce ad esplicare la sua azione ritardatrice sull'eliminazione della penicillina, *anche se viene inoculata separatamente dall'antibiotico*, per via endovenosa. Tale ritardo, pur senza assumere le stesse proporzioni che si ottengono iniettando penicillina e pectina insieme, è tuttavia abbastanza notevole.

D) Poichè la pectina risulta costituita prevalentemente da ac. galatturonici, abbiamo voluto provare se anche questi esplicassero un'azione ritardatrice: ecco riportati nella tabella VIII i risultati ottenuti, i quali mostrano come non sia solo prerogativa della pectina l'azione ritardante, riuscendosi ad ottenere tutto ciò anche adoperando una semplice soluzione di ac. galatturonici.

TABELLA VIII.

	Salasso compiuto dopo ore					
	2	4	6	8	10	11
Penicillina sciolta in soluzione di acido galatturonico	2,7	1,4	1,2	1,1	1,2	—
	3.1	1,5	1,2	1,2	1,1	—

E) Un'altra prova che abbiamo voluto compiere è stata quella di ricercare se, dopo aver sciolto mediante la soluzione di pectina, una determinata quantità di penicillina, questa si dividesse in maniera uniforme fra tutti i componenti della soluzione colloidale. Per osservare questo abbiamo sciolto 200.000 U. di penicillina mediante 6 cm³ di pectina e quindi abbiamo sottoposto a prolungata centrifugazione (2.000 giri per 40') l'intera soluzione; dopo di che abbiamo aspirato dalla provetta della centrifuga prima 3 cm³ del liquido sovrastante e successivamente 3 cm³ costituenti la parte inferiore del materiale centrifugato. Ricorrendo alla titolazione in vitro abbiamo voluto anzitutto controllare la quantità di penicillina presente nelle due parti del liquido; i risultati sono stati identici, cioè la quantità di penicillina presente nelle due parti del centrifugato si è dimostrata, dalle prove in vitro, uguale.

Abbiamo allora inoculato ciascuna parte del centrifugato ad un coniglio allestendo la prova in serie, in maniera di inoculare complessivamente quattro animali. Le titolazioni sul siero, compiute ad intervallo regolare di tempo, secondo la nota tecnica, hanno dato valori sostanzialmente uguali. Questa prova pertanto non deporrebbe in favore dell'ipotesi che l'azione ritardatrice sia devoluta alla fissazione della penicillina ai grossi agglomerati molecolari, da cui poi si distaccerebbe lentamente, perchè in tal caso l'azione ritardatrice maggiore si sarebbe dovuta ottenere con il sedimento del centrifugato.

I^a) Un'ultima prova compiuta è stata quella di ricercare eventuali differenze riscontrate nel deposito della penicillina nei vari organi e tessuti, qualora venisse inoculata in soluzione acquosa o con pectina.

Gli organi esaminati sono stati il fegato, il polmone, la milza, il rene ed il tessuto muscolare. L'animale prescelto per l'esperimento è stata la cavia. La quantità di penicillina inoculata a ciascun animale, sia in soluzione acquosa che con pectina è stata di 25.000 U. Complessivamente sono state trattate 16 cavie; di queste, ogni 3-6-10 e 12 ore se ne uccidevano 4 mediante cloroformio (2 trattate con penicillina acquosa e 2 con penicillina pectina) e, dopo aver prelevato ogni organo e dopo averlo convenientemente lavato, si è proceduto a pestare opportunamente un determinato quantitativo di ciascun organo in un mortaio; dopo di che si è aggiunto al materiale così trattato acqua distillata fino al volume complessivo di cm³ 10; si è mescolato tutto bene e si è quindi proceduto alla titolazione della penicillina presente nel liquido così ottenuto, con la nostra tecnica dell'agar-germi. I risultati ottenuti, pur non essendo molto chiari, a noi sembra che siano insufficienti per ammettere un'azione di cumulo negli organi viscerali, determinata dalla pectina, come vorrebbero alcuni Autori. Siamo portati a questa conclusione perchè, pur avendosi in maniera però non sempre evidente, una maggiore persistenza dell'antibiotico negli organi degli animali trattati con pectina, tale persistenza può benissimo attribuirsi alla più lunga permanenza della penicillina nel sangue, a causa della ritardata eliminazione.

In base alle nostre ricerche crediamo che si possano formulare le seguenti conclusioni:

1) La pectina esercita effettivamente un'azione ritardante sull'assorbimento della penicillina; tale ritardo è però limitato ed assume una certa importanza solo se rapportato alla corrispondente durata del livello ematico ottenuto con la penicillina in soluzione acquosa.

2) Nessun raffronto o paragone può farsi sia con la penicillina in mestruo cereo-oleoso, sia con la penicillina-procaina in veicolo oleoso con monostearato di alluminio. Soltanto con questi due tipi di penicillina può effettivamente parlarsi di azione ritardante fino a 24-48 ore.

3) Le ricerche sperimentali sugli animali inducono a ritenere che, adoperata in clinica umana, *la pectina consente una diminuzione nel numero delle iniezioni da praticarsi giornalmente*, senza però che si arrivi all'affermazione che basti una sola iniezione ogni 24 ore, poichè è provato che anche dosaggi massivi (100.000 U. per kg. 1,5, nel coniglio) danno un livello ematico accertabile in vitro non oltre la 10^a ora.

4) La pectina pertanto non può nè deve sostituire la penicillina cereo-oleosa o la penicillina-procaina, che rimangono il mezzo ritardante

di scelta, *ove però possibile attuarlo*; l'impiego della pectina può e dovrebbe semplicemente *sostituire la soluzione fisiologica o l'acqua bidistillata*, comunemente impiegata per sciogliere la penicillina del commercio (sale di sodio, di potassio o solfato).

5) Ricerche compiute in clinica umana potrebbero stabilire con maggiore precisione dosaggio e numero di iniezioni necessarie nelle 24 ore.

6) Volendo poi dare una spiegazione della maniera come la pectina agisca, in base alle nostre ricerche, sembra si debba concludere che la sostanza influenzi più che altro indirettamente l'assorbimento della penicillina, forse diminuendo la permeabilità dei capillari, oppure bloccando gli enzimi che nell'organismo sono devoluti alla scissione della penicillina. Ulteriori ricerche sono però necessarie per chiarire tale probabile azione. Per ora può semplicemente affermarsi che perchè si esplichi l'azione ritardatrice della pectina, *non c'è bisogno di un contatto tra penicillina e pectina prima dell'iniezione*.

7) Quanto alla tollerabilità, la soluzione di pectina, purchè sufficientemente purificata, non determina alcun fenomeno reattivo apprezzabile sia locale (infiltrato) sia generale; anche se inoculata per via endovenosa ha dimostrato di non dare alcun inconveniente. Nelle nostre prove siamo arrivati ad inoculare fino a 9 cm³ di pectina per diversi giorni, in conigli con peso medio sui kg 1,5, senza rilevare alcun disturbo.

8) La praticità dell'impiego della pectina è evidente: la soluzione dell'antibiotico viene allestita nell'identica maniera che adoperando soluzione fisiologica e acqua bidistillata. Tanto il sale sodico che gli altri sali di penicillina si sciolgono rapidamente nella soluzione di pectina, che rimane sufficientemente fluida, così da poter essere facilmente iniettata.

Tutti questi requisiti, unitamente alla considerazione che una fiala di pectina viene a costare poco più di una fiale di soluzione fisiologica, ci inducono ad ammettere l'utilità dell'impiego di questa sostanza quale *mezzo ritardante* l'assorbimento della penicillina, con *quelle restrizioni e con quelle limitazioni* da noi chiaramente e ripetutamente espresse.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.
31 marzo 1949.
