

78. **Leonardo LILLO, Franco SCANGA e Nicolò GANDOLFO. —**
L'assorbimento della penicilina in veicolo idro-ematico.

Riassunto. — 1) La penicillina, in soluzione idro-ematica, iniettata per via sottocutanea, viene assorbita più lentamente che non la penicillina in semplice soluzione acquosa.

2) Tale risultato non si ottiene se l'inoculazione viene fatta per via endovenosa.

3) L'impiego di sangue citratato al posto di quello normale sembra che non porti a differenze sostanziali.

4) Il rallentato assorbimento dell'antibiotico sarebbe dovuto prevalentemente al legame che interviene tra penicillina e componenti del siero.

5) I fatti reattivi locali, determinati dall'ematoma artificiale, non influenzerebbero in maniera apprezzabile l'assorbimento della penicillina.

Résumé. — 1) La pénicilline en solution hydro-hématique, injectée par la voie sous-cutanée, est absorbée plus lentement que la pénicilline en solution simplement aqueuse.

2) Ce résultat n'est pas obtenu si l'inoculation est faite par la voie intraveineuse.

3) L'emploi de sang citraté au lieu du sang normal paraît ne pas conduire à des différences substantielles.

4) Le ralentissement de l'absorption de cet antibiotique paraît dû plus particulièrement à la double liaison qui s'établit entre la pénicilline et les constituants du sérum.

5) Les faits réactifs locaux, déterminés par l'hématome artificiel, ne paraissent pas influencer d'une façon sensible l'absorption de la pénicilline.

Summary. — 1) Penicillin in hydro-haematic solution, injected subcutaneously, is absorbed more slowly than penicillin in only aqueous solution.

2) This result is not obtained if the penicillin is inoculated intravenously.

3) The use of citrated blood instead of normal blood does not appear to lead to any substantial difference.

4) The slower absorption of the antibiotic seems to be caused mainly by the double bond which is formed between penicillin and serum constituents.

5) The local reactive facts, caused by the artificial haematoma, do not appear to influence to an appreciable extent the penicillin absorption.

Zusammenfassung. — 1) Penicillin in hydro-haematischer Lösung, subkutan injiziert, wird langsamer als Penicillin in einfacher wässriger Lösung absorbiert.

2) Dieses Resultat wird nicht erhalten wenn das Penicillin intravenös injiziert wird.

3) Die Verwendung von Zitrat-Blut anstatt des normalen Blutes soll keine wesentlichen Unterschiede veranlassen.

4) Die langsamere Absorption des Antibiotikums soll in der Hauptsache von der Doppelbindung verursacht werden, die zwischen Penicillin und Serumbestandteilen gebildet wird.

5) Die lokalen Reaktionserscheinungen, die durch das künstliche Hämatom verursacht werden, sollen die Absorption des Penicillins nicht in merklicher Weise beeinflussen.

E' risaputo che la penicillina viene rapidamente eliminata dall'organismo: sembra « che il rene consideri come proprio dovere eliminare quanta più penicillina gli è possibile nel minimo tempo » [Fleming ⁽¹⁾].

Pertanto onde ovviare all'inconveniente di dover iniettare continuamente, a brevi intervalli di tempo, l'antibiotico, si è cercato di ricorrere a mezzi che ritardassero l'escrezione della sostanza attraverso i reni o ne rallentassero l'assorbimento ⁽²⁾.

Poichè la penicillina viene quasi interamente eliminata per la via renale, prevalentemente attraverso i tubuli (80%) ⁽³⁾, si sperimentò se l'impiego di determinate sostanze, che fossero escrete come la penicillina

⁽¹⁾ A. FLEMING, Penicillin concentration in blood serum after various doses by various routes, J.A.M.A., 552 (1945).

⁽²⁾ F. SCANGA, Penicillina ritardo, Rend. Ist. Sup. di Sanità (1948), in corso di stampa.

⁽³⁾ C. H. RAMMELKAMP, Excretion of penicillin in bile, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 54, 31 (1943).

attraverso il filtro dei tubuli, potessero 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 confermarono la possibilità di un « blocco competitivo » della penicillina ⁽⁴⁾.

Le principali sostanze sperimentate sono state: lo *iodopirina* ⁽⁵⁻⁶⁾, comunemente impiegata in urologia per saggiare la funzionalità dei tubuli renali, l'*ac. paraminoippurico* ⁽⁷⁻⁸⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹²⁾, che ha il vantaggio, sulla iodopirina, di poter essere somministrato per via orale ⁽⁹⁻¹¹⁾, e la *caronamide* ⁽¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁾, la quale è molto meno tossica delle due precedenti sostanze.

⁽⁴⁾ G. RAKE and A. P. RICHARDSON, Pharmacology of penicillin, Ann. N. Y. Acad. Sci., 48, 143 (1946).

⁽⁵⁾ K. H. BEYER, New concept competitive inhibition of the renal tubular excretion of penicillin, Science, 105, 94 (1947).

⁽⁶⁾ C. H. RAMMELKAMP, Excretion of penicillin in man, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 53, 30 (1943).

⁽⁷⁾ L. LOEWE, P. ROSEBLATT, E. ALTURE-WERBER a. M. KOZAK, The prolonging action of penicillin by para-aminohippuric acid, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 58, 298 (1945).

⁽⁸⁾ 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 para-aminohippuric acid, Am. J. M. Sci., 209, 608 (1945).

⁽⁹⁾ E. H. SPANDING, jr. A. BONDI a. E. EARLY, The effect combining sodium benzoate with oral penicillin, Science, 105, 210 (1947).

⁽¹⁰⁾ L. LOEWE, P. ROSENBLATT a. E. ALTURE-WERBE, A refractory case of subacute bacterial endocarditis due to Veillonella gazogenes clinically arrested by a combination of penicillin sodium para-amino-hippurate and heparin, Am. Heart J., 32, 327 (1946).

⁽¹¹⁾ BRONFENBRENNER a. G. B. FAVOUR, Increasing and prolonging blood penicillin concentrations following intramuscular administration, Science, 101, 673 (1945).

⁽¹²⁾ K. H. BEYER, H. FLIPPIN, W. F. VERWEY a. R. WOODWARD, Effect of para-aminohippuric acid on plasma concentration of penicillin in the man, J.A.M.A., 126, 1007 (1944).

⁽¹³⁾ 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).

⁽¹⁴⁾ 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).

Altri AA. ⁽¹⁹⁻²⁰⁾ hanno anche consigliato di ricorrere a sostanze che agiscono non in senso specifico 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.

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

Un mezzo molto semplice per rallentare l'assorbimento della penicillina è quello basato sul raffreddamento della parte del corpo dove si praticano le iniezioni ⁽²¹⁾. In genere basta applicarvi un impacco di ghiaccio, iniziando 1-2 ore prima dell'inoculazione della penicillina: si determina così un'ischemia locale che porta come conseguenza un più lento assorbimento dell'antibiotico. Per lo stesso motivo si raccomanda di non praticare alcun massaggio sulla parte dopo l'inoculazione. Ugualmente, per le sue proprietà vasocostrittive, Fish, Parkins, e coll. ⁽²²⁻²³⁾ consigliano

⁽¹⁵⁾ A. O. SEELER, C. WILCOX a. M. FINLAND, Enhancement of blood levels by caronamide during intramuscular administration of penicillin, J. Lab. a. Clin. Med., 32, 807 (1947).

⁽¹⁶⁾ 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).

⁽¹⁷⁾ 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).

⁽¹⁸⁾ R. D. REID, L. C. FELTON a. M. A. PITTOFF, Prolongation of penicillin activity with penicillinasi, inhibiting compounds, 63, 438 (1946).

⁽¹⁹⁾ C. H. RAMMELKAMP a. C. S. KEEFER, The absorption, excretion and distribution of penicillin, J. Clin. Invest., 22, 425 (1943).

⁽²⁰⁾ C. MOEHLING a. L. S. LINKER, Harper Hosp. Bull., 3, 73 (1945).

⁽²¹⁾ M. TRUMPER a. A. M. HUTTER, Prolonging effective penicillin action, Science, 100, 432 (1944).

⁽²²⁾ R. T. FISK, A. G. FOORD a. G. ALLES, Prolongation of penicillin activity by means of adrenalin, Science, 101, 124 (1945).

⁽²³⁾ H. PARKINS H., M. WILEY, J. CHAUDY a. H. A. ZINTEL, Maintenance of blood level of penicillin after intramuscular injection, Science, 1, 203 (1945).

di associare l'adrenalina alla soluzione di penicillina prima dell'inoculazione.

Ricerche sono state pure compiute con altre sostanze come la gelatina, la lecitina ⁽²⁴⁻²⁵⁾, ma i risultati migliori e veramente utilizzabili da un punto di vista pratico si sono ottenuti con l'impiego di un veicolo cereo-oleoso. In un primo momento si era pensato di utilizzare una semplice emulsione oleosa della soluzione acquosa di penicillina ⁽²⁶⁾, ma in seguito si constatava che in tal maniera l'assorbimento non subiva un apprezzabile ritardo ⁽²⁷⁻²⁸⁾. Ricerche successive dimostrarono che solo incorporando *la penicillina in polvere* in un mestruo oleoso, era possibile ritardare l'assorbimento dell'antibiotico ⁽²⁹⁻³⁰⁻³¹⁾. Si arrivava così all'impiego come veicolo dell'olio di arachidi con cera d'api al 4,8%, preparato inizialmente sotto forma solida (I^a formula Romansky) ⁽³²⁻³³⁻³⁴⁾ e suc-

⁽²⁴⁾ E. R. DOLL a. W. W. DIMOCK, Efficacy of various agents for delaying absorption of penicillin, J. Am. Vet. Med. Ass., 108, 310 (1946).

⁽²⁵⁾ CH. P. ARMSTRONG, R. M. HALPERN a. W. C. CUTTING, Prolomgation of the action of penicillin after intramuscular injection, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 58, 74 (1945).

⁽²⁶⁾ A. W., HARRIS, C. WILCOX a. M. FINLAND, Plasma levels after repository injections of penicillin in water- in-oil- emulsion, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 63, 199 (1946).

⁽²⁷⁾ 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, 25 (1947).

⁽²⁸⁾ 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).

⁽²⁹⁾ D. W. ATCHESON a. D. EDMEADES, Blood levels and urinary excretion in peanut oil, beeswax and penicillin mixture, Science, 102, 199 ().

⁽³⁰⁾ F. SCHÜTZ a. J. N. HAWTHORNE, An agent delaying the absorptio of penicillin, Nature, 158, 132 (1946).

⁽³¹⁾ G. W. RAIZISS, Penicillin in oil suspension. Bacteriostatic and spirochetidal agent, Science, 100, 412 (1944).

⁽³²⁾ M. J. ROMANSKY a. G. E. RITTMAN, A metod for prolonging the action of penicillin, Science, 100, 196 (1944).

⁽³³⁾ M. J. ROMANSKI 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).

⁽³⁴⁾ 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).

cessivamente sotto forma « semifluida » (II^a formula Romansky) ⁽³⁵⁾, che avrebbe il vantaggio, sulla prima composizione, di essere di più pratica utilizzazione. Lloyd ⁽³⁶⁾ consiglia di unire al veicolo cereo-oleoso anche il solfato di magnesio, per l'azione competitiva che questo sale esercita sulla escrezione della penicillina attraverso i tubuli renali.

Recentemente è stata apportata un'ulteriore modificazione al veicolo oleoso, eliminando completamente la cera d'api onde rendere più fluido il mestruo. Trattasi di una sospensione di penicillina cristallizzata G con procaina in olio di arachidi, gelificato con il 2% di monostearato di alluminio. I risultati di questo nuovo preparato sarebbero veramente soddisfacenti.

Come si può vedere, i mezzi impiegati per ritardare l'assorbimento della penicillina sono numerosi e qualcuno sembra aver effettivamente eliminato l'inconveniente derivante dalla rapida eliminazione della penicillina dall'organismo.

Recentemente Tagliavia ⁽³⁹⁾ e Sannino ⁽⁴⁰⁾ hanno comunicato di aver ottenuto dei brillanti risultati nella terapia della blenorragia, mediante un'unica iniezione di 200.000 U. di penicillina in veicolo idro-ematico. Essi, cioè, consigliano di sciogliere la penicillina in 2-3 cm³ di acqua distillata, che viene aspirata in una siringa da 5 cm³; quindi con la stessa siringa si aspirano dalla vena del paziente in cura 2-3 cm³ di sangue; si agita rapidamente il liquido sino a completa omogeneizzazione e quindi si procede all'inoculazione, per via sottocutanea, della soluzione ottenuta.

Trattando con tale tecnica 50 casi di blenorragia, gli AA. avrebbero ottenuto una elevata percentuale di successi, e pertanto si domandano se tali risultati siano da attribuire:

a) ad un ritardato assorbimento dell'antibiotico a causa delle mo-

⁽³⁵⁾ H. F. DOWLING, M. J. ROMANSKY, H. WELCH, J. A. ROBINSON, V. L. CHANDLER, W. W. ZELLER a. H. L. HIRSH, « Liquid » versus « solid » penicillin in oil and wa, The effect of particle size and type of penicillin, J.A.M.A., 135, 567 (1947).

⁽³⁶⁾ T. R. JLOYD, Cura della blenorragia con iniezione unica di penicillina, Lancet (1946).

⁽³⁹⁾ TAGLIAVIA, Gazzetta Sanitaria, N. 3 (1947).

⁽⁴⁰⁾ M. SANNINO, Somministrazione in dose unica di penicillina in autosangue nella blenorragia acuta maschile, Med. Interna, 55, 275 (1947).

dificazioni dello stato fisico della soluzione acquosa di penicillina, per l'aggiunta del sangue, oppure a causa di una qualche combinazione intervenuta tra elementi del sangue e penicillina;

b) al fatto che l'ematoma prodotto artificialmente, agendo da corpo estraneo nei tessuti, provoca, intorno a sè, fatti reattivi delimitanti, che ritardano l'assorbimento;

c) ad una contemporanea esaltazione delle difese umorali e tissulari dell'organismo, per l'azione di stimolo esercitata dalla contemporanea inoculazione di sangue e acqua distillata (autoemolisiterapia) ⁽⁴⁰⁾.

Considerando che i risultati ottenuti da Sannino nella cura della ble-norragia sono piuttosto soddisfacenti e che la tecnica del metodo non comporta alcuna difficoltà pratica, anzi consente di utilizzare le penicillina in polvere di uso comune, noi abbiamo ritenuto opportuno studiare il metodo consigliato dagli AA. dal lato sperimentale, ricercando gli effetti prodotti negli animali dall'inoculazione di penicillina e sangue e studiando quindi, dal punto di vista chimico, le eventuali modifiche subite dalla penicillina in veicolo idro-ematico.

In una prima ricerca abbiamo voluto constatare se si potesse sperimentalmente mettere in evidenza un prolungamento dell'assorbimento della penicillina in animali inoculati con una soluzione idro-ematica dell'antibiotico.

Come animale di esperimento, abbiamo scelto il coniglio, sia perchè esso ci consentiva tecnicamente il sistematico prelevamento del sangue, ad intervalli regolari di tempo, sia perchè, per le successive ricerche chimiche, ci permetteva di poter disporre di una sufficiente quantità di sangue. Come penicillina abbiamo adoperato un sale sodico (G) cristallizzato, titolante non meno di 1435 U./mg.

Anzitutto abbiamo voluto controllare quale livello ematico si ottenesse con quantità differenti di penicillina in soluzione acquosa, ricercando anche la durata di tale livello.

Abbiamo perciò preparato una soluzione di penicillina in acqua distillata, inoculando a 2 conigli 25.000 U., a 4 conigli 50.000 U. ed a 2 conigli 100.000 U. Siamo ricorsi a questi quantitativi di penicillina proporzionalmente grandi, per metterci nelle identiche condizioni delle successive ricerche chimiche. Ad intervalli di 2 ore fino alla 12^a ora e

quindi dopo 24 ore abbiamo praticato un piccolo salasso dal cuore di ciascun animale, facendo quindi sierare e prelevando poi il siero, onde controllare la presenza in esso di penicillina.

Abbiamo quindi preparato una serie di piastre con agar-germe: piastre di 12 cm di diametro; agar a pH 7,2 fluidificato e quindi portato a 45° C. All'agar così disciolto si aggiunge lo stafilococco aureo (ceppo Oxford), proveniente da una brodocultura di 18-24 ore nella proporzione di cm³ 0,5 per 100 cm³ di agar. In ciascuna piastra si versano 15 cm³ di agar-germe. Si lascia solidificare e si fanno stare 24 ore in ghiacciaia. Quindi viene praticata nell'agar con un foratappi di 8 mm di diametro, 6 fori per ciascuna piastra.

In due pozzetti di ciascuna piastra si versano due gocce di una soluzione di penicillina contenente rispettivamente 0,01 e 0,05 U. per cm³. Negli altri 4 pozzetti di ciascuna piastra si versano 2 gocce del siero da esaminare. Le piastre sono quindi poste in termostato ed osservate dopo 24 ore, calcolando il diametro dell'alone d'inibizione, ottenuto per ogni siero.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella I.

TABELLA I.

	Salasso compiuto dopo:						
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
Penicillina in soluzione acquosa 25.000 U.	2,3	1,3	—	—	—	+	—
	2,1	1,5	—	—	—	—	—
Penicillina in soluzione acquosa 50.000 U.	3,1	1,9	1,5	—	—	—	—
	2,5	1,2	—	—	—	—	—
	2,7	1,2	—	—	—	—	—
	3,1	1,15	—	—	—	—	—
Penicillina in soluzione acquosa 100.000 U.	3,1	1,5	—	—	—	—	—
	1,8	1,2	1,2	1,2	—	—	—

Nei pozzetti controllo si constata un alone inibitorio solo con 0,05 U./cm³. Nonostante le notevoli quantità di penicillina iniettata, con 25.000 e 50.000 U. non si ritrova più nel sangue alla 6^a ora quantità apprezzabile di antibiotico e solo con 100.000 U. si arriva, in un coniglio su due, a rilevare un'attività antibiotica fino all'8^a ora.

Abbiamo quindi trattato altri 6 conigli con penicillina in sospensione cereo-oleosa; praticando sistematicamente per ogni animale un salasso ogni due ore fino alla 12^a ora e poi alla 24^a ora.

I risultati ottenuti, sempre impiegando la stessa tecnica, sono riportati nella II tabella.

TABELLA II.

	Salasso compiuto dopo :						
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
Penicillina in olio e cera d'api 25.000 U.	2,7	2,4	2,5	2,3	1,3	+	
Penicillina in olio e cera d'api 50.000 U.	3,2	3,1	2,5	2,4	1,4	1,4	1,10
	4,0	3,5	3,7	3,1	2,7	1,1	+
	3,9	2,9	3,0	3,0	2,4	1,4	1,05
Penicillina in olio e cera d'api 100.000 U.	4,1	3,8	3,7	3,7	3,7	2,9	1,4
		3,35	3,4	3,4	2,9	2,7	1,7

Il coniglio inoculato con 25.000 U. è morto dopo il salasso della 10^a ora. Il controllo dell'attività antibiotica del siero mostra un notevole prolungamento dei livelli ematici, dimostrabili anche sino alla 24^a ora sia con 50.000 U. (un coniglio su 3) sia con 100.000 U. (2 conigli su 2). Un particolare da rilevare in questi risultati è che il titolo dei livelli ematici è per nulla inferiore, anzi è *superiore* a quelli ottenuti con la penicillina in soluzione acquosa.

Probabilmente tale risultato è dovuto al fatto che l'assorbimento della penicillina in soluzione acquosa è così rapido da raggiungere il massimo della concentrazione nel sangue entro la 1^a ora, iniziandosi subito dopo, per la rapida eliminazione dell'antibiotico attraverso i reni, l'abbassarsi del titolo ematico.

Abbiamo quindi voluto ricercare quali risultati si ottenessero iniettando le stesse quantità di penicillina in veicolo idroematico, avendo come termine di paragone l'eliminazione dell'antibiotico sia in maniera rapida (veicolo acquoso, tabella I) sia in maniera lenta (veicolo cereo-oleoso, tabella II).

Nella prova sperimentale sugli animali noi ci siamo voluti mettere nelle stesse condizioni indicate da Sannino (⁴⁰) per il trattamento curativo rapido della blenorragia nell'uomo. Abbiamo perciò preparato tre solu-

zioni acquose di penicillina, contenenti in 2 cm³ rispettivamente 25.000, 50.000 e 100.000 U. di penicillina. Quindi, salassando di volta in volta ciascun coniglio, abbiamo prelevato ad ogni animale 3 cm³ di sangue; abbiamo poi aspirato rapidamente la quantità stabilita di penicillina contenuta in 2 cm³ di acqua distillata e subito abbiamo inoculato la soluzione idroemematica con penicillina, per via sottocutanea a ciascun coniglio.

Come risulta dalla tabella III, gli animali così trattati sono stati 9: (un animale è morto dopo il secondo salasso); due sono stati inoculati con

TABELLA III.

	Salasso compiuto dopo:						
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
Penicillina soluzione acquosa + sangue intero (3 cc.) 25.000 U.	1,9	2,1	1,5	—	—	+	—
	2,9	2,5	1,8	1,5	—	—	—
	3,1	+	—	—	—	—	—
Penicillina soluzione acquosa + sangue intero (3 cc.) 50.000 U.	3,3	2,5	1,4	1,15	1,2	—	—
	2,7	1,9	1,5	1,0	1,15	1,1	—
	2,9	2,4	2,1	2,1	1,25	—	—
	3,2	2,0	1,05	1,05	—	—	—
	—	2,2	1,7	1,2	1,2	—	—
Penicillina soluzione acquosa + sangue intero (3 cc.) 100.000 U.	—	2,8	2,2	1,4	1,15	1,15	—
	3,4	2,8	2,8	2,4	1,1	1,1	—

25.000 U. ed il siero di questi animali ha rivelato un'attività antibiotica in un caso fino alla 6^a ora ed in un altro fino all'8^a. Altri 5 conigli sono stati inoculati con 50.000 U., ottenendosi un potere inibente del siero dimostrabile in vitro in quasi tutti gli animali fino alla 10^a ora ed in uno anche fino alla 12^a. Con 100.000 U. l'attività antibiotica era dimostrabile in tutti e due gli animali sino alla 12^a ora.

Si può pertanto ammettere che la penicillina, iniettata per via sottocutanea in veicolo idro-ematico raggiunge e mantiene un livello ematico batteriostatico per un periodo di tempo superiore a quello che si ottiene con l'inoculazione della penicillina in semplice soluzione acquosa; tale prolungamento però non raggiunge la durata e l'intensità che si ottiene con la penicillina in veicolo cereo-oleoso.

Onde chiarire il meccanismo con cui la presenza del sangue determina un rallentato assorbimento della penicillina, noi abbiamo voluto provare:

a) se aumentando la quantità del sangue da unire alla soluzione di penicillina, si riuscisse a rallentare ancora maggiormente l'assorbimento dell'antibiotico (tabella iv);

TABELLA IV.

	Salasso compiuto dopo :						
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
Penicillina ⁷ soluzione acquosa + sangue intero (6 cc.) 50.000 U.	3,2	1,9	1,7	1,2	1,2	—	—
		3,1	2,0	1,1	1,1	—	+
		2,8	2,6	2,0	1,3	—	+
Penicillina soluzione acquosa + sangue intero (6 cc.) 100.000 U.	3,5	3,1	1,9	1,5	1,2	1,2	+
		2,5	2,3	1,2	1,2	—	—

b) se unendo la soluzione di penicillina con sangue citratato ed iniettando la miscela così ottenuta in alcuni animali subito ed in altri dopo 10 minuti di contatto, si modificasse in senso favorevole o sfavorevole la durata dell'assorbimento (tabella v);

TABELLA V.

	Salasso compiuto dopo :						
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
Penicillina soluzione acquosa + sangue citratato (3 cc.) (inoculati subito) 50.000 U.	2,7	2,5	2,2	1,4	—	—	—
	2,8	2,25	2,25	1,3	1,15	—	—
Penicillina soluzione acquosa + sangue citratato (3 cc.) (inoculati dopo 10' di contatto) 60.000 U.	2,5	2,4	2,4	1,2	1,25	+	+
	2,8	2,3	2,3	1,05	—	—	+

c) se, iniettando la soluzione idro-ematica di penicillina per via endovenosa, anzichè per via endomuscolare, l'assorbimento avvenisse ugualmente in maniera ritardata (tabella vi).

I risultati di queste tre prove ci hanno mostrato che aumentando la quantità di sangue da aggiungere alla soluzione di penicillina, non si ottiene un maggiore prolungamento nell'assorbimento. L'impiego di sangue citratato al posto di quello normale sembra che non porti differenze sostanziali. L'inoculazione della soluzione idro-ematica di penicillina per

TABELLA VI.

	Salasso compiuto dopo:						
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
Penicillina + soluzione acquosa (inoculazione endovenosa 25.000 U.	1,6	—	—	—	—	—	—
	1,1	—	—	—	—	—	—
Penicillina + soluzione acquosa (inoculazione endovenosa) 50.000 U.	1,5	—	—	—	—	—	+
	1,4	—	—	—	—	—	—
Penicillina soluzione acquosa + 3 cc. sangue intero (inoculazione endovenosa) 25.000 U.	2,4	—	—	—	—	—	—
	1,4	—	—	—	—	—	—
Penicillina soluzione acquosa + 3 cc. sangue intero (inoculazione endovenosa) 60.000 U.	1,4	1,2	—	—	—	+	—
	1,65	—	—	—	—	—	—

via endovenosa annulla quasi completamente il fenomeno del ritardato assorbimento.

Da queste nostre ricerche risulta perciò sperimentalmente che:

1) la penicillina in soluzione idro-ematica, iniettata per via sottocutanea, viene assorbita più lentamente che non la penicillina in semplice soluzione salina;

2) tale risultato non si ottiene più se l'inoculazione viene fatta per via endovenosa;

3) aumentando la quantità di sangue da unire alla soluzione di penicillina, l'effetto ritardante non è aumentato;

4) l'impiego di sangue citratato sembra che non dia risultati sostanzialmente differenti da quelli ottenuti usando sangue normale.

In base a questi risultati, quale potrebbe essere la causa o le cause che determinano questo rallentamento sul meccanismo di assorbimento della penicillina?

Noi abbiamo già visto che sono state prespettate cause che possiamo chiamare « specifiche » o « generiche », nel senso che le prima attribuiscono l'effetto ritardante ad eventuali combinazioni o modifiche che intervengono tra i componenti del sangue e la penicillina; le cause « generiche » invece attribuiscono il ritardo dell'assorbimento alla barriera infiammatoria che si determina per azione del sangue intorno alla zona dell'iniezione.

Per cercare di rispondere a tali quesiti, noi ci siamo riferiti a precedenti ricerche compiute al riguardo da Bacon, Chow e Mc Kee (³⁷⁻³⁸), che avrebbero già portato alle seguenti conclusioni:

1) tra penicillina e sieroproteine si determinerebbe non un semplice adsorbimento fisico, ma, sembra, una vera e propria combinazione chimica;

2) la penicillina, entrata in questa combinazione, non perderebbe, al contrario della sulfamide, la sua originaria attività antibiotica;

3) tale complesso, inoculato per via sottocutanea al topino, permetterebbe un assorbimento dell'antibiotico più lento di quello che si ottiene impiegando la penicillina in semplice soluzione acquosa.

Le nostre esperienze nel campo chimico, sono state perciò non tanto dirette a confermare i risultati ottenuti da Chow e coll., quanto soprattutto a dimostrare se tali modifiche intervenissero tra penicillina e sangue, *nelle nostre condizioni di esperimento*. Se cioè tenendo a contatto per breve tempo (qualche minuto al massimo) una soluzione acquosa di penicillina con del sangue non coagulato si determinassero quei tali cambiamenti nello stato chimico della penicillina sufficienti per giustificare il successivo rallentamento nel processo di assorbimento dell'antibiotico.

I trattamenti fatti subire al sangue dopo l'aggiunta della penicillina sono fondati principalmente sulla proprietà che ha il sale sodico di penicillina di essere solubile a freddo (circa 5° C) in alcool a 50%; con lo stesso solvente precipitano invece le varie proteine del siero assieme all'eventuale complesso proteino-penicillinico.

Pertanto la prima nostra ricerca è stata la seguente: a 50 cm³ di sangue ottenuti con puntato cardiaco da un coniglio, sono stati aggiunti 100.000 U. di penicillina. Dopo defibrinazione meccanica, si è centrifugato il plasma precedentemente raffreddato in bagno di ghiaccio e le due porzioni ottenute (siero e parte corpuscolare) sono state trattate con alcool

(³⁷) B. F. CHOW a. C. M. Mc KEE, Interaction between chystallin penicillin and humana plasma proteins, Science, 101, 67 (1945).

(³⁸) C. M. Mc KEE, G. RAKE a. B. F. CHOW, Serum levels and excretion studies in mice following injection of a penicillin-albumin complex, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 63, 126 (1946).

al 50% anch'esso freddo. Per centrifugazione si è separato dal liquido idroalcoolico il precipitato e questo si è lavato con nuovo alcool per due o tre volte. Mentre nel caso della porzione sierosa tale residuo ha rivelato con le prove in vitro, una discreta attività antibiotica, nel caso della parte corpuscolare l'attività è stata in confronto minore.

Questa prima ricerca conferma pertanto che la porzione del sangue a cui maggiormente si lega la penicillina sono i costituenti della parte sierosa.

Abbiamo perciò compiuto una seconda prova per constatare se, unendo la penicillina separatamente al siero ed alla parte corpuscolata del sangue, ottenuta per centrifugazione del plasma, ed iniettando queste due parti separatamente agli animali, si verificasse in entrambi i casi lo stesso ritardo nell'assorbimento dell'antibiotico, così come si era ottenuto iniettando la miscela penicillina-sangue intero.

Abbiamo perciò prelevato del sangue ad un coniglio mediante puntato cardiaco; 6 cm³ di questo sangue sono stati uniti a 100.000 U. di penicillina in soluzione acquosa (4 cm³) e quindi sono stati inoculati in parte uguale due conigli, per via sottocutanea (5 cm³ per ciascun animale). Il resto del sangue è stato defibrinato per via meccanica e poi sottoposto a centrifugazione, ottenendo così la separazione della parte corpuscolata e del siero. Mediante due pipette si sono quindi aspirati, separatamente, 6 cm³ di siero e 6 cm³ di corpuscoli, aggiungendo quindi a ciascuna parte 100.000 U. di penicillina in soluzione acquosa.

Abbiamo così inoculato, per via sottocutanea, 2 conigli con la miscela siero (3 cm³) + penicillina (50.000 U.) ed altri 2 animali con la mi-

TABELLA VII.

	Salasso compiuto dopo:						
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
Penicillina soluzione acquosa + sangue intero 50.000 U.	2,7	1,8	1,5	1,2	1,10	—	—
	2,8	2,6	2,0	2,1	1,15	—	—
Penicillina soluzione acquosa + siero 50.000 U.	2,6	1,1	1,2	1,1	—	—	—
	2,7	2,5	2	1,3	1,15	—	—
Penicillina soluzione acquosa + emazie 50.000 U.	2,4	2	1,4	—	—	—	—
	2,5	1,6	1,1	—	—	—	—
Penicillina soluzione acquosa 50.000 U.	2,7	1,2	—	—	—	+	—

scela parte corpuscolata (3 cm^3) + penicillina (50.000 U.); un altro coniglio è stato inoculato semplicemente con 50.000 U. in soluzione acquosa. I risultati sono riportati nella tabella VII.

I numeri posti nelle varie colonne stanno ad indicare, come al solito, il diametro degli aloni di inibizione, ottenuti sempre con le stesse modalità di esperimento.

L'inoculazione del complesso penicillina + siero determina un ritardo nell'assorbimento dell'antibiotico quasi corrispondente a quello della penicillina + sangue intero; anche la parte corpuscolata ritarda l'assorbimento della penicillina, ma in maniera sensibilmente minore.

Vale a dire, noi osserviamo che il maggior rallentamento nel processo di assorbimento dell'antibiotico viene determinato da quella parte del sangue (siero) alla quale, in base alle precedenti ricerche, risulta che si lega una maggiore quantità di penicillina.

Ricerche chimiche sono attualmente in corso per determinare sia la natura particolare di tale legame sia in quali proporzioni quest'unione avviene.

Quanto all'influenza che può avere nel processo di assorbimento della penicillina l'ematoma prodotto artificialmente, a causa dei fatti reattivi delimitanti che si determinano intorno al punto di inoculazione dell'antibiotico, noi pensiamo che esso giochi un ruolo del tutto secondario e di scarsa importanza. Tale considerazione si basa sul fatto che, aumentando la quantità di sangue da unire alla penicillina (tabella IV), con il che si renderebbero più accentuati i fatti reattivi locali, non si determina invece alcun prolungamento nel processo di assorbimento dell'antibiotico. Inoltre abbiamo constatato che se, dopo aver inoculato per via sottocutanea 50.000 U. di penicillina in soluzione acquosa, disinne- stiamo la siringa dall'ago, lasciando questo infilato nel tessuto sottocutanea e quindi reinoculiamo attraverso il medesimo ago 5 cm^3 di sangue normale, in maniera ch'esso s'infiltri nella stessa zona della penicillina, determinando così quei tali fatti reattivi locali, non si constata alcun rallentamento nel processo di assorbimento della penicillina.

E' vero che l'inoculazione del complesso penicillina + sangue per via endovenosa non influisce in alcuna maniera sull'assorbimento dell'antibiotico, ma verosimilmente tale fatto è imputabile ad altre circostanze.

CONCLUSIONI

Queste nostre ricerche confermano sperimentalmente che la penicillina, iniettata per via sottocutanea in veicolo idro-ematico, secondo la tecnica indicata da Tagliavia e Sannino, subisce un ritardo nel suo processo di assorbimento. Tale rallentamento sembra sia dovuto se non esclusivamente, per lo meno prevalentemente alle combinazioni che intervengono tra i componenti del sangue e la penicillina. Circa la natura di queste combinazioni in base alle nostre ricerche attuali, non è ancora possibile dare indicazioni precise. Possiamo soltanto affermare che la penicillina si lega in maniera prevalente ai componenti del siero e solo in proporzioni minori alla parte corpuscolata del sangue. Sarebbe il legame penicillina-siero quello che, prevalentemente, determina il rallentamento nel processo di assorbimento dell'antibiotico. I fatti reattivi che si determinano localmente nella sede dell'inoculazione, per azione dell'ematoma artificiale che si produce, non influenzerebbero in maniera apprezzabile l'assorbimento della penicillina.

Ulteriori ricerche ci condurranno ad una più completa spiegazione dei risultati ottenuti.

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