

20. Littoria von LORCH e M. PRINCIVALLE. — **Studio comparativo sperimentale di due nuovi derivati della tiamina: la ditiopropiltiamina cloridrato (DTPT) e lo zinco-tannato di ditiopropiltiamina (ZTPT).**

Riassunto. — E' stato eseguito uno studio comparativo « in vitro » e « in vivo » di due derivati della tiamina: la ditiopropiltiamina cloridrato (DTPT) e lo zinco-tannato di ditiopropiltiamina (ZTPT), prodotto di coniugazione della ditiopropiltiamina con lo zinco-tannato.

Le esperienze « in vitro » erano intese a studiare l'attività dei due derivati nel promuovere la crescita di microrganismi tiamino-dipendenti.

La DTPT possiede un'attività stimolante del 70% e lo ZTPT del 40%, rispetto all'attività della tiamina cloridrato.

La somministrazione intramuscolare nel coniglio dei due derivati ha determinato livelli ematici in tiamina più alti, rispetto a quelli ottenibili con la somministrazione di tiamina cloridrato, con una persistenza in circolo di 72 ore.

Summary. — Comparative *in vitro* and *in vivo* studies have been performed on two thiamine derivatives: dithiopropylthiamine hydrochloride (DTPT) and dithiopropylthiamine zinc-tannate (ZTPT) produced by the conjugation of dithiopropylthiamine with zinc-tannate. The *in vivo* experiments investigated the activities of the compounds in promoting the growth of thiamine dependent micro-organisms. DTPT had 70% and ZTPT 40% of the stimulating activity of thiamine hydrochloride. Intramuscular administration of the derivatives to the rabbit produced higher blood thiamine levels than were obtained with thiamine hydrochloride. They persisted for 72 hr.

Recentemente alcuni Autori giapponesi [FUJIWARA e coll. (1); MASUKAWA e coll. (2, 3, 4); FUJIWARA e coll. (5)] hanno descritto alcuni derivati della tiamina caratterizzati da un anello tiazolico aperto avente l'atomo di zolfo fissato a un radicale zolfo-alchilico; questi derivati, liposolubili come base, danno un cloridrato solubile in acqua.

Uno di tali derivati, la ditiopropiltiamina cloridrato (DTPT) [FUJIWARA e coll. (5)], è risultato particolarmente interessante in quanto dotato, rispetto alla tiamina cloridrato, di bassa tossicità, rapido assorbimento per via digerente, con determinazione di livelli ematici in tiamina più alti; la DTPT entra nel metabolismo cellulare sotto forma di

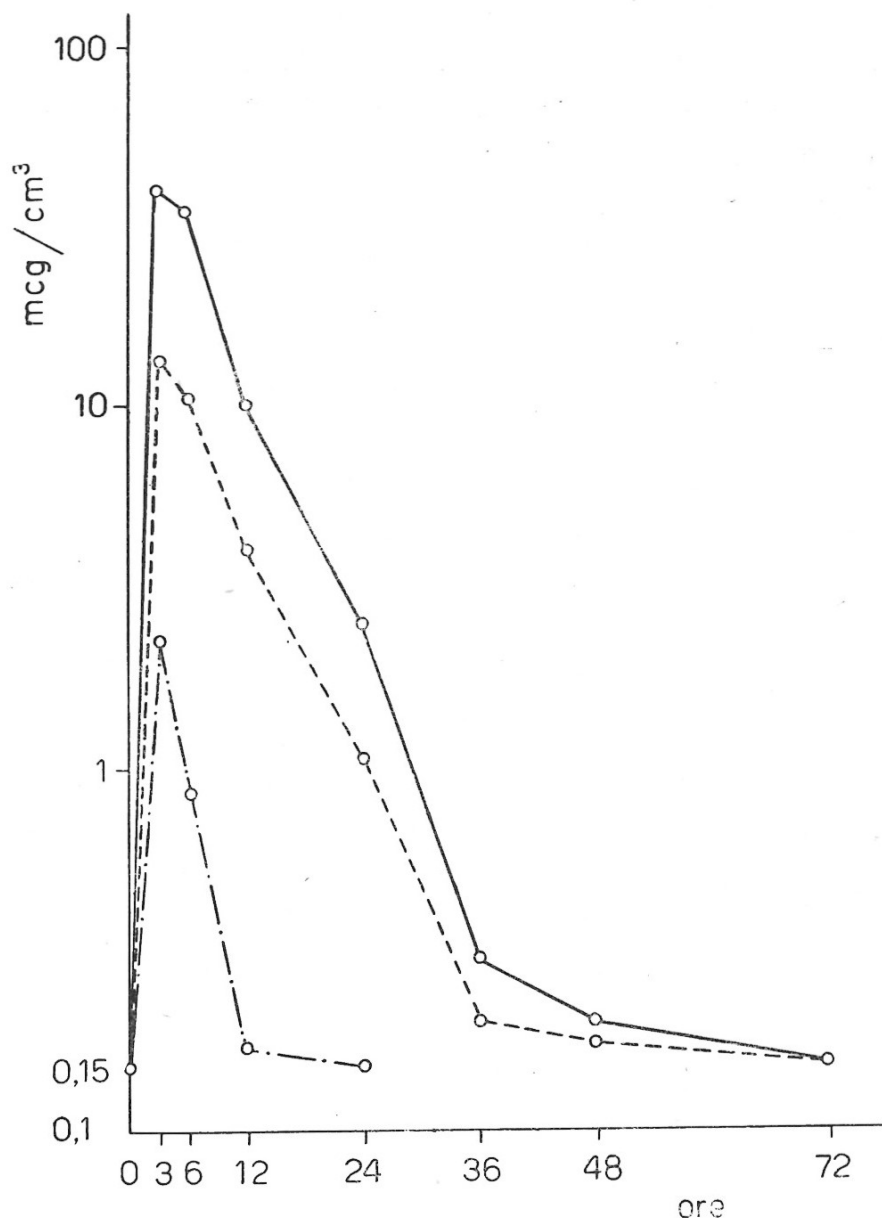


Fig. 4. - Livelli ematici in tiamina.

— · — · — · — Tiamina cloridrato
 ----- Zinco-tannato di ditiopropiltiamina (ZTPT)
 ————— Ditiopropiltiamina cloridrato (DTPT)

cocarbossilasi e tale coenzima viene elaborato, con particolare rapidità, a livello del tessuto epatico [HIICO e coll. (6); WESTENBRINK e coll. (7); OCHOA e coll. (8); SIMMONET e coll. (9); HIICO e coll. (10)].

Per queste caratteristiche la DTPT troverà probabilmente impiego terapeutico. Date queste premesse, abbiamo ritenuto interessante realizzare un particolare derivato della ditiopropiltiamina, lo zinco-tannato di ditiopropiltiamina (ZTPT), ottenuto con procedimento analogo a quello impiegato per la vitamina B₁₂ da THOMPSON e coll. (11) (*).

Questi Autori hanno recentemente proposto una nuova formulazio-

(*) Ringraziamo il Dott. Riccardo Monacelli per averci dato utili suggerimenti nella preparazione dello zinco-tannato di ditiopropiltiamina.

ne della cianocobalamina combinata e resa insolubile per interazione con zinco e acido tannico. Lo zinco-tannato di cianocobalamina (« long acting ») presenta una caratteristica di notevolissima importanza: determina livelli ematici in vitamina B₁₂ che si prolungano fino al ventottesimo giorno dalla somministrazione, risultando pertanto di gran lunga più persistenti di quelli che si ottengono con la cianocobalamina.

Lo zinco-tannato di ditiopropiltiamina (ZTPT) è stato da noi realizzato allo scopo di associare alle caratteristiche proprie della DTPT (bassa tossicità, rapida fosforilazione e assorbimento con conseguenti elevate concentrazioni ematiche in tiamina), il notevole vantaggio di una lunga persistenza in circolo, analoga a quella del derivato della cianocobalamina.

Nella preparazione dello ZTPT, impiegato nel corso delle nostre ricerche, la ditiopropiltiamina è stata coniugata con lo zinco-tannato nella proporzione del 50%, restando libera per il 50%. Detti rapporti sono stati considerati idonei ai fini della iniettabilità del preparato. Scopo delle nostre ricerche è stato, pertanto, quello di esaminare il comportamento « in vivo » e « in vitro » dello ZTPT nei confronti della DTPT e della tiamina cloridrato.

Le prove « in vivo » erano intese ad evidenziare i livelli ematici in tiamina determinati dalla somministrazione intramuscolare della tiamina cloridrato e dei suoi due derivati e la loro persistenza in circolo.

Quale animale da esperimento è stato scelto il coniglio. Prove preliminari avevano evidenziato, nel sangue di coniglio normale, un contenuto medio in tiamina di 0,15 mcg/cm³, in accordo con determinazioni eseguite da altri Autori [EDWARDS e coll. (12)].

Le prove « in vitro » erano intese ad evidenziare la capacità di stimolare la crescita di microrganismi tiamino-dipendenti, nei confronti della tiamina cloridrato, da parte dei due derivati della tiamina (DTPT e ZTPT).

MATERIALI

Vitamina campione: tiamina cloridrato Roche.

Derivati della tiamina: ditiopropiltiamina cloridrato Takeda (DTPT); zinco-tannato di ditiopropiltiamina (ZTPT).

Animali: conigli dei due sessi del peso di kg 2 circa.

Microrganismi titolatori: mutante di *Escherichia coli* K 12, tiamino-dipendente; *Penicillium chrysogenum* Istisan 152.

Piastre: cm 32 × 23.

Microcilindri di porcellana.

Terreno di prova per l'Escherichia coli K 12:

Nitrato di ammonio	g	2
Cloruro di ammonio	g	2
Solfato di magnesio .7 H ₂ O	g	0,2
Fosfato bisodico .2 H ₂ O	g	10
Fosfato monopotassico	g	10
Glucosio	g	10
Agar	g	25
Acqua distillata	cm ³	1000
pH 6,8		

Terreno di prova per il Penicillium chrysogenum: terreno Czapek-Dox.

Reattivi per l'estrazione della vitamina dal sangue: acido tricloroacetico al 20%; acetato di sodio 2 N.

TECNICA

Prove « in vivo ». — Gli esperimenti sono stati eseguiti su 12 conigli divisi in tre gruppi di 4 conigli ciascuno. Ogni coniglio era tenuto a digiuno per 24 ore prima dell'inoculazione. Le inoculazioni venivano eseguite per via intramuscolare, nel quadrante superiore della zona glutea, iniettando mg 5/kg della vitamina in esame, veicolata in cm³ 2 di soluzione fisiologica sterile. I salassi venivano eseguiti dopo 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 ore dall'inoculazione, prelevando cm³ 2 di sangue da ciascun animale.

Il sangue prelevato veniva immediatamente mescolato con cm³ 2 di acido tricloroacetico; dopo 30' di permanenza a + 4°C, si aggiungevano, a ciascun campione, cm³ 2 di acetato sodico in modo da portare il pH tra 6,5 e 6,8.

Il sangue così trattato veniva centrifugato e il supernatante utilizzato per le determinazioni microbiologiche.

In ogni campione di sangue la tiamina veniva ricercata con due metodi microbiologici: uno basato sull'impiego di un mutante di *Esche-*

richia coli K 12 [MACCACARO e coll. (13)] e l'altro basato sull'impiego del *Penicillium chrysogenum* [PRINCIVALLE (14)].

Nel primo metodo venivano impiegate, per la costruzione della curva campione, soluzioni scalari contenenti da 0,1 a 0,01 mcg/cm³ di tiamina cloridrato; nel secondo metodo soluzioni contenenti da 0,5 a 0,05 mcg/cm³ di tiamina cloridrato.

I campioni di sangue venivano, pertanto, opportunamente diluiti in modo da avere concentrazioni in tiamina comprese entro i limiti delle curve campione.

Prove « in vitro ». — Sono state eseguite in piastra, applicando gli stessi metodi microbiologici usati per la ricerca della tiamina nel sangue.

L'attività microbiologica della DTPT e dello ZTPT veniva evidenziata per confronto diretto con quella della tiamina cloridrato.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Entrambi i metodi microbiologici impiegati nel corso delle nostre ricerche (prove « in vivo » e « in vitro »), si sono dimostrati idonei alla titolazione della tiamina e dei suoi derivati (ditiopropiltiamina cloridrato e zinco-tannato di ditiopropiltiamina), nelle nostre condizioni sperimentali, fornendo risultati sovrapponibili.

Il comportamento della tiamina e dei suoi derivati (DTPT e ZTPT), dopo inoculazione intramuscolare nel coniglio, viene illustrato nel grafico dove sono riportati i valori della concentrazione ematica in tiamina a 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 ore dall'inoculazione. Nei conigli trattati con tiamina cloridrato, la concentrazione di tiamina è massima dopo 3 ore dalla somministrazione (circa 2,3 mcg/cm³ di sangue) e discende dopo 12 ore a valori pressochè normali (0,175 mcg/cm³ di sangue).

I livelli ematici in tiamina, nei conigli trattati con DTPT e ZTPT, raggiungono anch'essi il loro massimo dopo 3 ore dall'inoculazione (rispettivamente 40 e 16 mcg/cm³ di sangue) per decadere con andamento rettilineo fino alla 36^a ora, indi subire una flessione e rientrare nel valore normale alla 72^a ora.

Le prove « in vitro » hanno evidenziato che la DTPT e lo ZTPT, nei confronti della tiamina cloridrato, posseggono un'attività rispettivamente del 70% e del 40% nello stimolare la crescita di microrganismi specificamente tiamino-dipendenti.

Le nostre esperienze hanno dimostrato, pertanto, che i livelli ema-

tici in DTPT e ZTPT sono più alti e persistenti di quelli ottenuti con la somministrazione di tiamina cloridrato.

Il comportamento « in vivo » dello ZTPT e della DTPT si è dimostrato, inoltre, analogo per persistenza in circolo (72 ore), mentre i livelli ematici in tiamina sono risultati più bassi per lo ZTPT. Per cui si può concludere che la DTPT realizza livelli ematici in tiamina più elevati sia della tiamina cloridrato che dello ZTPT, con una persistenza in circolo di 72 ore.

Tale azione ritardo è però sovrapponibile a quella ottenuta con lo ZTPT per cui la coniugazione della ditiopropiltiamina con lo zinco-tannato non è in grado di realizzare un derivato di tiamina che, analogamente allo zinco-tannato di cianocobalamina, sia capace di determinare livelli ematici in vitamina dotati di particolari caratteristiche di persistenza in circolo.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) FUJIWARA M. e WATANABE H. - Proc. Jap. Acad., 28: 456 (1952).
 - (2) MATSUKAWA T. e YORUGI S. - Proc. Jap. Acad., 28: 446 (1952).
 - (3) FUJIWARA M. e coll. - J. Biochem., 44: 273 (1953).
 - (4) MATSUKAWA T. e coll. - Proc. Jap. Acad., 4: 43 (1954).
 - (5) FUJIWARA M. e coll. - J. Biochem., 44: 29 (1954).
 - (6) HIICO D. e coll. - Compt. rend. Acad. Sciences, 248-44: 2438 (1959).
 - (7) WESTENBRINK H. G. K. e GOULDSMIT J. - Enzimol., 44: 44 (1943).
 - (8) OCHOA S. e PETERS R. A. - J. Biochem., 32: 4504 (1938).
 - (9) SIMMONET H. e coll. - Therapie, 44: 970 (1959).
 - (10) HIICO D. e coll. - Bull. Soc. Chim. Biol., (24 aprile 1959).
 - (11) THOMPSON R. E. e coll. - Am. J. clin. Nutrition, 7: 344 (1959).
 - (12) EDWARDS M. A. e coll. - Am. J. clin. Nutrition, 5: 54 (1957).
 - (13) MACCACARO G. A. e coll. - Boll. Soc. it. Biol. sper., 29: 484 (1953).
 - (14) PRINCIVALLE M. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 704 (1958).
-