

55. G. P. CANTORE (*) e S. BETTINI. — Contributo allo studio del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi.

Riassunto. — Gli autori hanno studiato la composizione chimica del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. L'omogenato di ghiandole velenifere è stato separato elettroforeticamente e sono stati frazionati 5 componenti proteici. Attività proteolitica è stata osservata solo da parte del veleno fresco del ragno. Attività anti-colinesterasica si è ottenuta solo sulla colinesterasi vera, nessuna attività sulla pseudo-colinesterasi. E' stata inoltre messa in evidenza una spiccata attività ialuronidasica da parte del veleno, ma nessuna attività emolitica, né *in vivo*, né *in vitro*. Infine gli autori hanno dimostrato un netto potere inattivante sul veleno stesso da parte della tripsina, pancreatina e clorofilla.

Résumé. — Les auteurs ont étudié la composition chimique du venin de *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi. L'homogène de glandes vénimeuses a été séparé par électrophorèse et on a fractionné 5 composants protéiques. Une activité protéolithique a été observée seulement de la part du venin frais d'araignée. Une activité anti-colinestérasique a été obtenue exclusivement sur la colinestérase vraie, tandis qu'aucune activité ne s'est manifestée sur la pseudo-colinestérase. On a, en outre, mis en évidence une activité ialuronidasique marquée de la part du venin, mais sans aucune activité hémolytique, ni *in vitro* ni *in vivo*. Les auteurs, enfin, ont démontré que la tripsine, la pancréatine et la chlorophylle ont un pouvoir inactivant sur le venin.

Summary. — The chemical composition of *Latrodectus tredecimguttatus* Rossi has been studied. Homogenates of the poison glands were separated electrophoretically into five protein components. Proteolytic activity was observed only with the fresh venom of this spider. Anti-cholinesterase activity was found only against true-cholinesterase and not against pseudo-cholinesterase. An active peak was also found for hyaluronidase but no hemolytic activity could be detected either *in vivo* or *in vitro*. Finally, a clear inactivation of the venom by trypsin, pancreatin and chlorophyll was shown.

Zusammenfassung. — Die Verfasser haben die chemische Zusammensetzung des Giftes von *Latrodectus decimoguttatus* Rossi untersucht. Die homogenisierten Giftdrüsen wurden einer elektroforetischen Trennung un-

(*) Ospite.

terworfen und es könnten 3 proteische Bestandteile dargestellt werden. Proteolytische Wirksamkeit konnte nur in frischem Gift der Spinne beobachtet werden. Antikolinesterase Wirkung konnte nur gegenüber der pseudo-Kolinesterase blieb die Wirkung aus. Es konnte auch eine ausgeprägte Jalunoridase Wirkung des Giftes beobachtet werden; eine hämolytische Wirkung fehlt dagegen vollständig so *in vivo* wie *in vitro*. Die Verfasser beweisen schliesslich, dass das Gift durch Tripsin, Pankreatin und Chlorophyll Wirkungslos gemacht wird.

La biologia, le caratteristiche e l'attività del veleno di *Latrodectus tredecimguttatus*, e la terapia del latrodectismo, sono state oggetto di una recente tesi sperimentale di uno di noi (*). Riteniamo utile riferire alcuni risultati ottenuti (relativi solo a parte di questa tesi), sulla composizione chimica, sull'attività proteolitica, anticolinesterasica, jalunoridastica ed emolitica del veleno di *L. tredecimguttatus* e sulla sua inattivazione.

Composizione chimica del veleno. — Il veleno di *L. tredecimguttatus* usato nelle nostre esperienze, è stato ottenuto per mezzo di due tecniche diverse, sia facendo mordere da parte del ragno il bordo di strisce di carta bibula o di altro materiale, sia asportando le ghiandole dal cefalotorace. Le ghiandole così prelevate sono state usate immediatamente, cioè allo stato fresco, oppure liofilizzate e mantenute nel vuoto a 4°C; la soluzione del veleno è stata preparata omogeneizzando una quantità nota di ghiandole, fresche o essiccate, in soluzione fisiologica, centrifugando e prelevando il centrifugato (il sedimento di 10 ghiandole inoculato in una cavia di 250 g non è letale; quindi la frazione tossica è solubile e viene estratta completamente dalla soluzione fisiologica).

Il veleno secreto dal ragno è un liquido incolore, con pH8.

Il veleno (omogenato di ghiandole secche) dializzato per mezzo di una membrana di collodio, mantiene inalterato il suo potere tossico in vivo e contratturante sugli intestini isolati per cui è verosimile che tale potere sia dovuto alle grandi molecole non dializzabili.

LEBEZ (¹, ²) ritiene che il veleno sia costituito principalmente da proteine; tale ipotesi è confermata dalla azione inattivante esplicata sul veleno dalla tripsina e dalla pancreatina, come è dimostrato in seguito, e

(*) CANTORE G. P.: Tesi di laurea in medicina e chirurgia presentata il 20 novembre 1956; Università di Roma.

dalla facilità con cui si possono separare, per mezzo di elettroforesi i vari componenti dello stesso veleno.

MUIC, STANIC e MENIGA (5) hanno separato per mezzo di elettroforesi su carta 6 componenti del veleno fresco raccolto con tamponi di cotone, usando una soluzione tamponata di Veronal-Veronal sodio a pH 8,6, forza ionica 0,03, Volt/cm 5, mA 0,75; e per mezzo di cromatografia hanno separato 5 componenti, di cui 2 colorabili con ninidrina e 3 con bleu di bromofenolo.

Al fine di indagare sulla tossicità del veleno, abbiamo eseguito l'elettroforesi del centrifugato di un omogenato di 50 coppie di ghiandole in 0,5 cm³ di soluzione tampone.

Sono state usate varie soluzioni tampone (veronal pH 8,5; fosfati pH 7,4; borati secondo ADJUDANTIS (3), pH 8,6 e forza ionica 0,07). Abbiamo ottenuto i migliori risultati con la soluzione di borati: a 250 cm³ di una soluzione madre contenente 12,045 g di H₃BO₃ e 9,46 g di Na₂SO₄ per litro, vengono aggiunti 60 cm³ di una soluzione 0,2 M di NaOH, e il volume finale viene portato ad un litro. L'elettroforesi viene effettuata a 10-20°C, per 7 ore, con 10-12 V/cm (4). Usando tale metodo e colorando la striscia con amidoschwarz, si separano 5 componenti come risulta dal grafico della figura 1. Abbiamo sempre aggiunto al veleno una piccola quantità (1:1000) di albumina di siero bovino, per saturare la striscia. La velocità di migrazione dei componenti il veleno è minore di quella dell'albumina. Prove orientative sulla tossicità delle varie bande eluite in soluzione fisiologica hanno messo in evidenza una maggiore attività dell'eluato della banda n. 5.

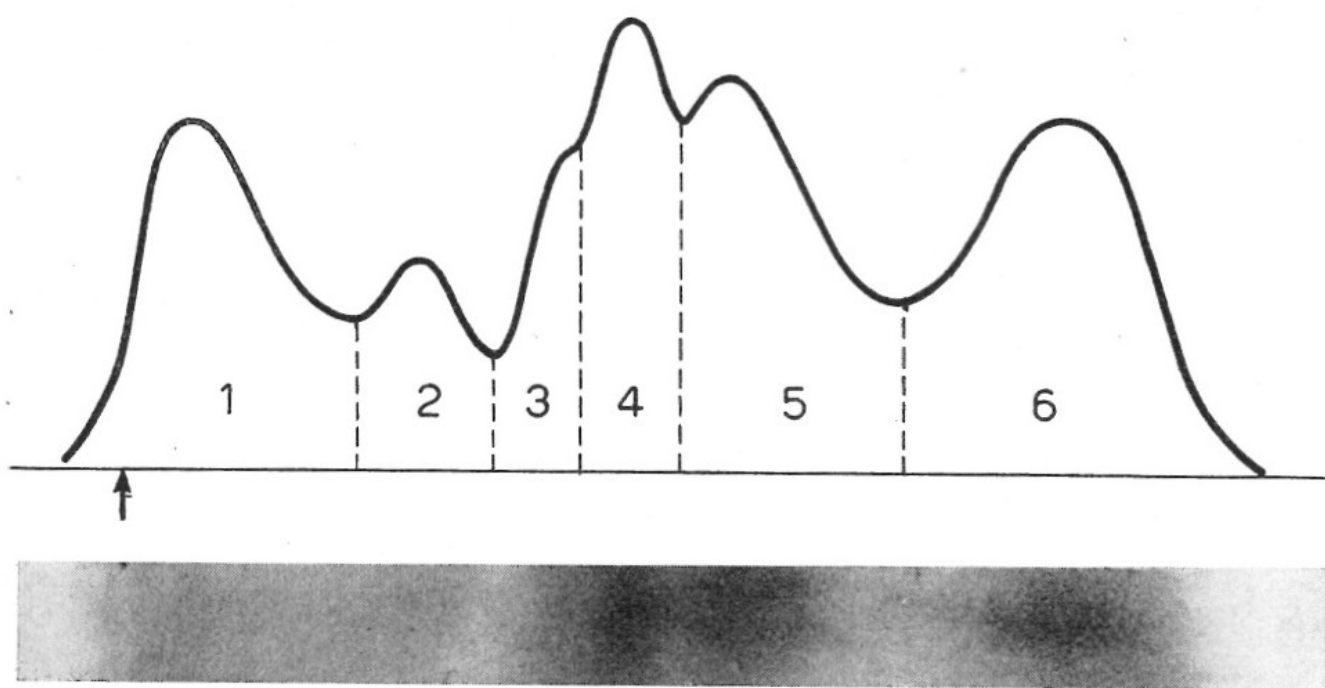


Fig. 1. - Elettroforesi di omogenato di ghiandole secche.

Poichè LEBEZ (¹) riferisce di aver trovato una considerevole quantità di lipidi nel veleno di *tredecimguttatus* nei confronti di quello di *Lycosa tarentula*, sostanze che egli ritiene essere probabilmente legate alle proteine, abbiamo compiuto la ricerca degli eventuali componenti lipoproteici del veleno di *L. tredecimguttatus* seguendo la classica tecnica elettroforetica usata per il siero di sangue, ma le strisce elettroforetiche trattate con Sudan nero, non hanno messo in evidenza alcuna banda colorata riferibile a componenti lipoproteici.

Attività proteolitica: LEBEZ (^{1, 2}) accenna soltanto ad una spiccata attività proteolitica del veleno di *L. tredecimguttatus* raccolto con i tamponi, attività che l'A. non osserva nel veleno ottenuto con ghiandole secche.

Per mettere in evidenza il potere proteolitico del veleno, abbiamo seguito la tecnica adottata da BURDON e MUDO (⁶), usata da questi AA. per individuare le frazioni con potere proteolitico nelle strisce di carta dopo elettroforesi. A questo scopo abbiamo impiegato tratti di pellicola fotografica non sviluppata, mettendo a contatto, con la parte di pellicola ricoperta di gelatina, la sostanza in esame. E' stato saggiato il potere proteolitico di:

- a) veleno secreto mediante morso del ragno sul bordo della pellicola;
- b) carta W. 1 imbevuta di veleno fresco secreto;
- c) ghiandole fresche schiacciate sulla pellicola;
- d) carta W. 1 imbevuta di omogenato di ghiandole secche all'1:1000.

Le pellicole con le strisce di carta che venivano continuamente inumidite con la soluzione di tamponi fosfati a pH 7, sono state mantenute a 37° per 7 ore.

Abbiamo osservato che soltanto il veleno fresco mostra una spiccata attività proteolitica, infatti già dopo 15 minuti si nota un alone trasparente della pellicola nei preparati con veleno secreto o con carta imbevuta dello stesso veleno fresco; mentre le ghiandole fresche schiacciate sulla pellicola e l'omogenato di ghiandole secche non mostrano tale attività entro 7 ore di osservazione.

Questi risultati quindi, confermano quelli ottenuti da LEBEZ con veleno fresco secreto e con ghiandole secche.

La proprietà proteolitica di veleno di *Latrodectus* ci porta a quanto scrive BERLAND (⁷). Egli riferendosi agli studi del MONTEROSSO, il quale aveva osservato che le ghiandole di *Scytodes* invece del veleno produco-

no seta per la cattura della preda, intuisce che il veleno può avere una azione digestiva. E' infatti verosimile che l'attività proteolitica, in primo luogo sia responsabile della colliquazione che avviene nell'interno dell'esoscheletro dell'artropodo predato.

Volendo speculare sul fine del veleno stesso, che secondo il VELARD ⁽⁸⁾ è principalmente un'arma per la caccia e secondariamente un mezzo di difesa, si può supporre che oltre ai fini di colliquare i tessuti della preda, l'attività proteolitica del veleno, insieme all'attività jalunoridasica descritta in seguito, è importante per la penetrazione della sostanza tossica sia nell'artropodo allo scopo di paralizzare il sistema nervoso e così renderlo immobile, sia nel vertebrato per una rapida azione tossica a solo scopo difensivo.

Attività anti-colinesterasica. LEBEZ ⁽¹⁾ riferisce, senza tuttavia riportare dati, che il veleno di *L. tredecimguttatus* presenta un potere inibitore sulla colinesterasi degli eritrociti (acetilcolinesterasi o colinesterasi vera). Sono state ripetute le prove anche perchè il suddetto A. non accenna ad esperienze sulla colinesterasi del siero (pseudo-colinesterasi).

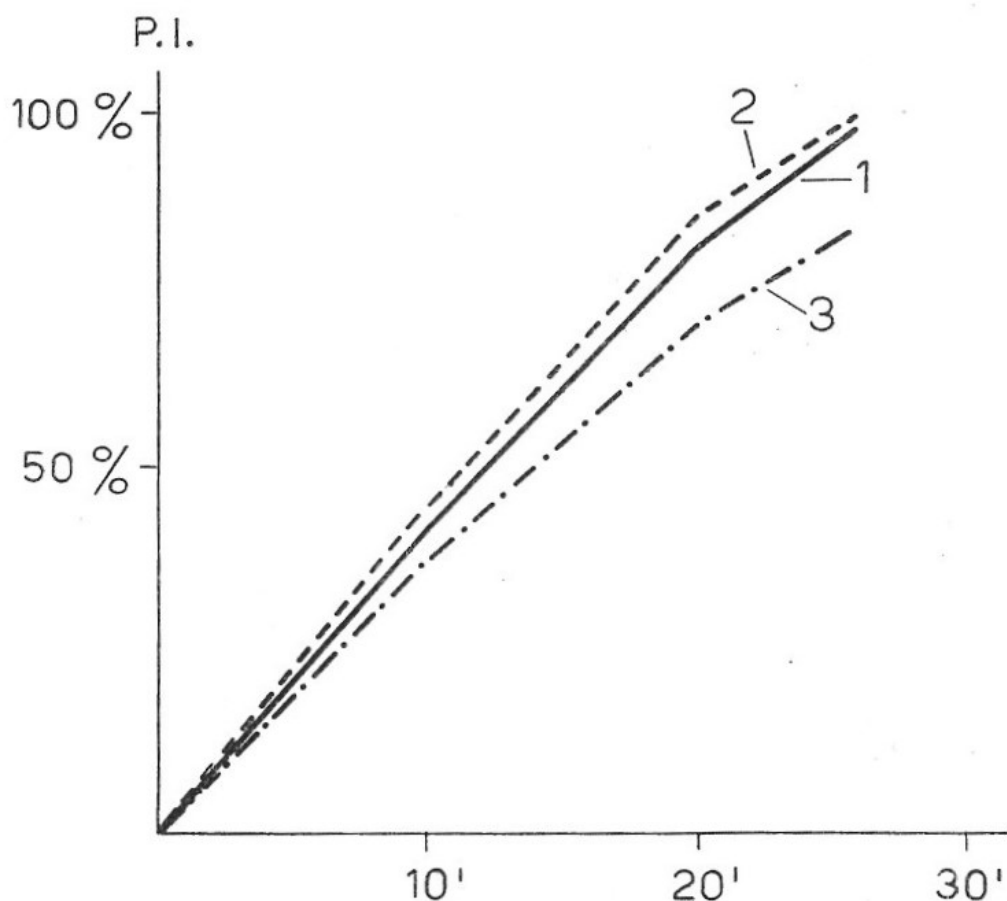


Fig. 2. - Attività anti-colinesterasica del veleno (omogenato di ghiandole essiccate) di *L. tredecimguttatus*.

P.I. : Percentuale d'idrolisi

- 1: Acetilcolina + true-colinesterasi
- 2: Acetilcolina + true-colinesterasi + veleno all'1/10.000
- . - 3: Acetilcolina + true-colinesterasi + veleno all'1/1.000

Abbiamo seguito il classico metodo manometrico (Warburg) mettendoci in condizioni molto simili a quelle adottate da AMMON ⁽⁹⁾. È stata usata la soluzione salina Ringer 20. Per osservare l'azione del veleno sull'acetilcolinesterasi abbiamo utilizzato un estratto di organo elettrico di torpedine diluito al 5%, mentre per la pseudo-colinesterasi abbiamo usato siero equino diluito al 25%. Tutte le esperienze sono state eseguite a temperatura di 37°C.

L'omogenato di ghiandole secche si è dimostrato 5.000 volte meno attivo dell' eserina, infatti alla concentrazione di 1:1000 inibisce del 17% l'acetilcolinesterasi (figura 2), mentre l' eserina a 1:10⁻⁶ la inibisce del 75% ^(10, 11).

Nessuna azione inibitrice si è osservata invece sulla pseudo-colinesterasi di siero di cavallo da parte del veleno alle concentrazioni di 1:1000, 1:10.000, e 1:50.000.

Per quanto riguarda l'acetilcolinesterasi, questi risultati confermano le conclusioni di LEBEZ.

Attività jalunoridasica. — La jalunoridasi si associa a vari veleni animali. Fu identificata per la prima volta da DURAN-REYNALS ⁽¹²⁾ nei veleni dei serpenti, delle api e nelle ghiandole salivari delle zanzare. CLAUDE ⁽¹³⁾ l'ha trovata nella testa della *Hirudo officinalis*, TARABINI-CASTELLANI ^(14, 15) nel veleno degli scorpioni e di alcuni pesci (*Trachinus vipera*, *Scorpaena* sp.), e MARETIC ⁽¹⁶⁾ nel veleno di *T. draco*, ed *S. scropha*. Considerando quindi la presenza di questo enzima in varie sostanze tossiche di origine animale, abbiamo indagato sulla attività jalunoridasica del veleno di *L. tredecimguttatus*.

Sebbene siano molti i metodi di valutazione ⁽¹⁷⁾, abbiamo preferito usare sia il metodo biologico basato sull'aumento dell'area di diffusione nel derma di una sostanza colorata che viene iniettata insieme ad una soluzione contenente jalunoridasi, sia col metodo viscosimetrico basato sull'azione enzimatica depolimerizzante e idrolizzante della jalunoridasi sull'acido ialuronico.

Con questi due metodi abbiamo messo in evidenza una spiccata attività jalunoridasica da parte del veleno di *L. tredecimguttatus*.

Per il metodo biologico abbiamo seguito la tecnica proposta da BACHERACH ⁽¹⁸⁾ scegliendo come sostanza indicatrice la emoglobina ⁽¹⁹⁾.

Abbiamo usato l'omogenato di ghiandole essiccate all'1:1000, oppure abbiamo costretto il ragno a mordere direttamente sul ponfo prodotto dall'indicatore + soluzione fisiologica iniettati nel derma di conigli albini. Nella prova di controllo con indicatore + jalunoridasi è stato usato il prodotto « Jalovis » della ditta Vister. Come risulta dalla tabella n. 1,

TABELLA I.

Attività ialuronidasi del veleno di *L. tredecimguttatus*

Sostanze inoculate intraderma	Diametri raggiunti dalla diffusione delle macchie cutanee 20' dopo l'inoculazione	
	Coniglio N. 1	Coniglio N. 2
Indicatore cm ³ 0,1 + sol. fisiol. cm ³ 0,05 + morso di 1 ragno	cm 1,75 × 1,21	cm 1,40 × 2,00
Indicatore cm ³ 0,1 + sol. fisiol. cm ³ 0,05 (controllo)	cm 1,70 × 1,70	cm 1,60 × 2,20
Indicatore cm ³ 0,1 + omogenato ghiandole secche all'1:1000 cm ³ 0,05	cm 2,32 × 2,55	cm 2,20 × 2,80
Indicatore cm ³ 0,1 + ialuronidasi cm ³ 0,05 (controllo)	cm 2,55 × 2,05	cm 2,40 × 2,50

i diametri raggiunti dalla diffusione delle macchie cutanee, 20 minuti dopo l'iniezione intradermica del veleno + emoglobina, sono praticamente eguali a quelli delle macchie prodotte dalla ialuronidasi + emoglobina.

Per il metodo viscosimetrico abbiamo seguito la tecnica proposta da MC CLEAN e HALE (2°) usando come substrato ialunorato di potassio Merk

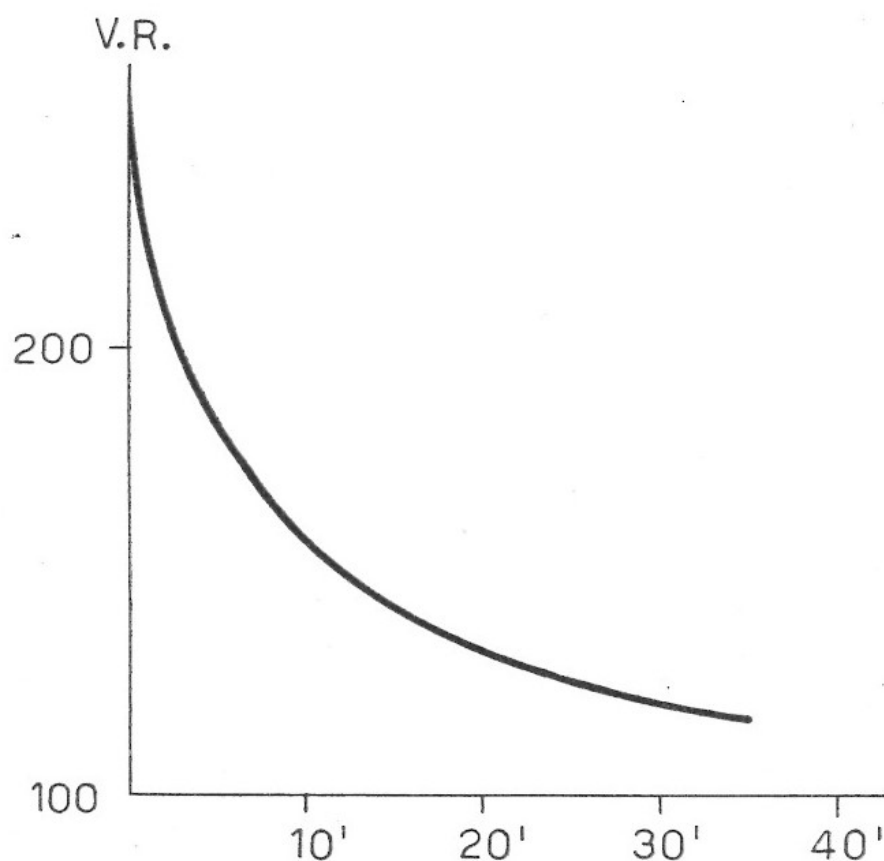


Fig. 3. - Attività ialuronidasi del veleno (omogenato di ghiandole) di *L. tredecimguttatus*.
V.R.: Viscosità relativa secondo McClean.

alla concentrazione finale di 2:1000, e come veleno l'omogenato di ghiandole secche alla concentrazione finale di 0,07:1000. Le esperienze sono state eseguite con il viscosimetro di Ostwald alla temperatura di 34°C. Come risulta dal grafico della figura 3, si mette in evidenza una rapida caduta della viscosità relativa; valutando questi risultati, secondo il metodo di Mc Clean ed Hale per la determinazione del potere jalunoridasico, risulta che le ghiandole essiccate contengono circa 150.000 U.R.V./g.

Considerando che JELASIC, MARETIC e RADEJ ⁽²¹⁾ hanno dimostrato un'azione terapeutica da parte del veleno di *L. tredecimguttatus* in casi di artropatie croniche, si potrebbe pensare che l'effetto terapeutico sia dovuto alla spiccata attività jalunoridasica del veleno. Infatti molti AA. hanno ottenuto buoni risultati dalla terapia con jalunoridasi in molte affezioni reumatiche ^(22, 23, 24, 25, 26, 27). BERTHIER e collaboratori ⁽²⁸⁾ avanzano l'ipotesi che per quanto riguarda il meccanismo di azione della jalunoridasi, nell'artrosi in particolare, questo enzima provochi la formazione di corpi anti-jalunoridasici che agiscono sulle lesioni reumatiche.

Inoltre JELASIC e collaboratori ⁽²¹⁾ affermano che inoculando sottocute nel gatto una soluzione di penicillina e veleno di *L. tredecimguttatus*, l'antibiotico passa in maggiore quantità nel cervello e nel liquido cefalorachidiano. Quindi il potere permeabilizzante esplicito dal veleno sulla barriera cefalo-rachidiana potrebbe essere anche attribuito all'attività jalunoridasica di questo.

Attività emolitica. — PINI ⁽²⁹⁾ studiando il potere emolitico del veleno di *L. tredecimguttatus* (ghiandole spremute in soluzione fisiologica e glicerina) ottiene una emolisi abbastanza rapida (completa dopo 4 ore) e più attiva di quella prodotta dal veleno di cobra, scorpione ed ape. Tale emolisi è attivata dalla lecitina e ritardata solo da alte dosi di colesterina. TROISE ⁽³⁰⁾ non ottiene emolisi da parte del veleno di *L. mactans* su emazie di montone, cavia, ratto e cane nemmeno con aggiunta di lecitina. FINLAYSON ⁽³¹⁾ osserva che il veleno di *L. indistinctus* (cefalotoraci estratti a 0°C con H₂O distillata) non ha potere emolitico su emazie di cavia; inoltre nota che tale veleno, anche con aggiunta di siero fresco di cavia, non emolizza le emazie umane e di cavia, mentre emolizza rapidamente le emazie di coniglio ed in minimo grado quelle di montone; lo stesso A. osserva che il potere emolitico dell'« aracnolisina », cioè una soluzione del corpo secco dello stesso ragno emolizza le emazie umane e di coniglio (per le emazie di coniglio, l'aracnolisina si comporta come il veleno del ragno), mentre non ha effetto sulle emazie di montone a meno che non venga aggiunto siero fresco di cavia. LEBEZ ^(1, 2) infine riporta che il veleno di *L. tredecimguttatus* raccolto con il metodo dei

tamponi, non provoca emolisi. Essendo discordi i pareri circa il potere emolitico di questo veleno, abbiamo ritenuto opportuno compiere alcune prove emolitiche su emazie di montone, animale in cui la sindrome tossica da veleno di *L. tredecimguttatus* è imponente e caratteristica.

Sono stati seguiti due metodi: per il primo metodo abbiamo allestito 4 batterie di provette A, B, C, D; ogni batteria era composta di 5 provette, di cui 4 contenenti rispettivamente 1 cm³ di omogenato di ghiandole essiccate a varie concentrazioni (1:500, 1:5000, 1:50.000, 1:500.000) + 1 cm³ di una soluzione di globuli rossi di montone al 2,5:100, ed una quinta provetta di controllo con 1 cm³ di soluzione fisiologica + 1 cm³ della soluzione di globuli rossi di montone al 2,5:100. Le batterie A, B, C, D, sono state tenute per 2 ore: a) in ghiaccio fondente; b) a 37°; c) ad entrambe le temperature secondo il seguente schema:

1^a) ora A e B a ghiaccio fondente

» » C e D a 37°

2^a) ora A e C a ghiaccio fondente

» » B e D a 37°

Una seconda serie di batterie è stata allestita aggiungendo 0,5 cm³ di siero normale di montone, onde assicurare la presenza di complemento.

Ciascuna provetta della prima e della seconda serie di batterie, è stata centrifugata per 10 minuti a 2500 giri e il centrifugato è stato osservato al colorimetro (Coleman-Junior Spectrophotometer) alla lunghezza d'onda di 540 m. In nessuna provetta è stata messa in evidenza traccia di emolisi.

Per dimostrare un eventuale potere emolitico del veleno fresco secreto direttamente dal ragno, abbiamo seguito un secondo metodo secondo D'ARCA SIMONETTI (³²), già impiegato dal detto autore per mettere in evidenza la proprietà emolitica della tossina stafilococcica dopo cromatografia su carta. Si sono usati globuli rossi di montone preparati sterilmente al 5% in agar semplice, sul quale sono state poste le strisce di carta W. 1 inumidite con veleno fresco secreto dal ragno, con omogenato di ghiandole secche e con omogenato di ghiandole fresche all'1:1000 e all'1:10.000. Alcune piastre sono rimaste per 24 ore a 37°C, altre a temperatura ambiente ed altre ancora a 4°C. Le strisce, sia mantenute sulla superficie dell'agar + globuli rossi, sia tra due strati dello stesso terreno, non hanno mostrato alcun potere emolitico.

Queste prove di laboratorio convalidano l'opinione di una parte degli AA. già citati, e cioè che il veleno di *Latrodectus* non provochi emolisi né *in vitro*, né *in vivo*, sia nell'uomo che nei comuni animali da

esperimento. I casi in cui il fenomeno emolitico è apparso, possono cadere nelle eccezioni dovute a particolari condizioni di esperimento.

Inattivazione del veleno. — TROISE (³⁰) riporta che il veleno di *L. mactans* (ghiandole secche nel vuoto) perde la tossicità con il calore. CASTELLI (³³) osserva che il veleno di *L. tredecimguttatus* diminuisce di tossicità se mantenuto in ghiacciaia, e che viene neutralizzato se mantenuto per 30 minuti a 56°C. D'AMOUR, BECKER e VAN RIPER (³⁴) riferiscono che la tossicità del veleno di *L. mactans* (ghiandole omogeneizzate) viene annullata dalla pancreatina e dalla pepsina (d'altra parte l'ambiente acido necessario per l'azione di quest'ultima sostanza è già capace di per se ad alterare il veleno). FINLAYSON (³¹) osserva che il potere tossico del veleno di *L. indistinctus* viene ridotto riscaldando il veleno per 30 minuti a 55°C e viene distrutto a 60° per lo stesso tempo. L'A. nota inoltre che il cloruro d'oro e il permanganato di potassio al 0,01% o la formalina al 40% annullano la tossicità del veleno. Sempre il FINLAYSON frazionando il veleno per mezzo di CO₂ ottiene una frazione solubile ed una insolubile altamente tossica. Dalle esperienze di DEL VECCHIO (³⁵) risulta che la clorofilla Allen all'1:100, unita ad una eguale quantità di veleno all'1:10.000 per tre ore a temperatura ambiente (20°C) svolge una azione inattivante completa sul veleno di *L. tredecimguttatus*.

Durante le numerose prove di tossicità abbiamo notato che il veleno di *L. tredecimguttatus* ottenuto dall'omogenato di ghiandole secche in soluzione fisiologica, mantiene le sue proprietà tossiche per almeno 20 giorni se mantenuto a 4°C; e se tenuto per tre ore a 37°C, mantiene inalterato il suo potere tossico.

Al fine di indagare ulteriormente sulla natura del veleno stesso, abbiamo compiuto alcune prove di inattivazione con soluzioni di tripsina e pancreatina. Se una soluzione di tripsina all'1:10.000 viene aggiunta ad una eguale quantità di omogenato di ghiandole all'1:10.000 a temperatura ambiente (20°C) per 15 minuti, il veleno perde completamente il suo potere tossico. Affinchè la pancreatina possa esercitare la stessa azione inattivante occorre che una soluzione molto più concentrata (1:100) di questa sostanza venga aggiunta ad una eguale quantità di omogenato di ghiandole all'1:10.000 per almeno 90 minuti a temperatura ambiente. Questa spiccata proprietà inattivante, esercitata specialmente dalla tripsina ed anche dalla pancreatina conferma la natura proteica del veleno. Il meccanismo d'azione con cui la clorofilla inattiva questa, come altre tossine, non è ancora ben chiaro (³⁶, ³⁷).

Considerata la sensibilità dell'intestino isolato di coniglio (³⁸) al veleno di *L. tredecimguttatus*, è stata impiegata questa tecnica per mette-

re in evidenza l'azione inattivante sul veleno esplicata dalla tripsina, pancreatina e clorofilla. Infatti queste sostanze alle dosi, temperatura e tempo di permanenza col veleno necessari per annullare il suo potere tossico, inattivano anche il potere contratturante che ha il veleno stesso sugli intestini in vitro (figura 4). Per quanto riguarda la clorofilla, tut-

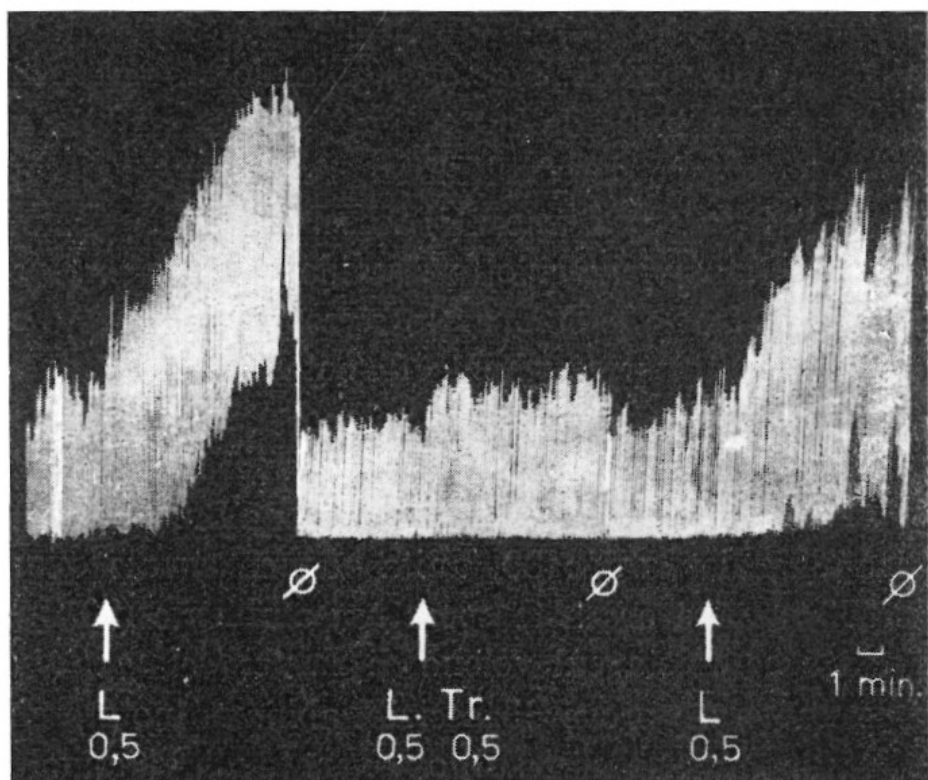


Fig. 4. - Risposta motrice degli intestini isolati di coniglio al veleno di *L. tredecimguttatus*, ed allo stesso veleno + tripsina. - Al punto Ø il chimografo si ferma per 15 minuti ed il tyrode viene rinnovato. L.: aggiunta al bagno di 0,03 mg/l di omogenato di ghiandole. L.Tr.: aggiunta al bagno di 0,03 mg/l di omogenato di ghiandole + 0,03 mg/l di tripsina (le due soluzioni sono state unite 15 minuti prima della aggiunta al bagno).

tavia è necessario seguire determinati accorgimenti perchè questa sostanza alla concentrazione di 5:100 è capace di provocare, di per se, un notevole aumento di tono dell'organo isolato, per cui prima dell'aggiunta al bagno del veleno + clorofilla, bisogna desensibilizzare l'intestino con 3-4 somministrazioni di quest'ultima sostanza seguite da ripetuti lavaggi. Dopo l'azione non contratturante del veleno + clorofilla sull'intestino isolato, il solo veleno agisce ancora sull'organo producendo una normale risposta motrice.

BIBLIOGRAFIA

- (1) LEBEZ D. - Bull. Sc. Yugosl. 4: 74 (1953).
 - (2) LEBEZ D. - Zeitsch. Phys. Chemie, 298: 72 (1954).
 - (3) ADJUDANTIS G. - Nature, 173: 539 (1954).
 - (4) TOSCHI G. e MARINI-BETTÒLO G. B. - Bioch. Biophysica Acta, 21: 531 (1956).
 - (5) MUIC N., STANIC M. e MENIGA A. - Z. Phys. Chem., 305: 70 (1956).
 - (6) BURDON K. L. e MUDO R. P. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 72: 330 (1949).
 - (7) BERLAND L. - Les Arachnides, Paris, Lechevalier (1932).
 - (8) VELLARD J. - Le venin des Araignées, Masson, 312 (1936).
 - (9) AMMON R. - Arch. Gen. Physiol., 233: 486 (1934).
 - (10) AMMON R. - Ergebn. Enzymforsch., 4: 102-110 (1935).
 - (11) LEVY J. - J. Physiologie, 39: 443 (1947).
 - (12) DURAN-REINALS F. - Science, 83: 286 (1936).
 - (13) CLAUDE A. - J. Exp. Med., 66: 353 (1937).
 - (14) TARABINI-CASTELLANI G. - Arch. It. Med. Sper., 2: 969 (1938).
 - (15) TARABINI-CASTELLANI G. - Boll. Ist. Sier. Mil., 49: 332 (1940).
 - (16) MARETIC Z. - Acta Trop., 14: 137 (1957).
 - (17) BOLTRAFFIO C. - Farmaco, 4: 51 (1949).
 - (18) BACHERAACH A. L., CHANCE M. R. e MIDDLETON T. R. - Biochem. J., 34: 1464 (1940).
 - (19) MADINAVEITIA J. - Biochem. J., 32: 1806 (1938).
 - (20) MCCLEAN D. e HALE C. W. - Biochem. J., 35: 159 (1941).
 - (21) JELASIC V. F., MARETIC Z., e RADEJ I. - Liječnickivjesnik, 76: 628 (1954).
 - (22) FLUCKIGER P. - Praxis, 41: 536, (1952).
 - (23) MOTTA L. - Gazz. Int. Chir., 59: 22 (1955).
 - (24) MUNNICH A. - Dtsch. med. Wschr., 78: 1636 (1953).
 - (25) ROSSING P. - Aerztl. Wschr., 6: 686 (1951).
 - (26) ROSSING P. - Z. Rheumaforsch, 11: 176 (1952).
 - (27) ROSSING P. e LUTTERBACH L. - Rheumatism, 10: 76 (1954).
 - (28) BERTHIER, DUPRÉ e DESLOUS - Rev. Lyonn. Med., 2: 387 (1953).
 - (29) PINI O. - Policlinico, Sez. Med., Fasc. 5 (1909).
 - (30) TROISE E. - C. R. Soc. Biol., 99: 1431 (1928).
 - (31) FINLAYSON M. H. - South Afr. J. Med. Sci., 2: 431 (1937).
 - (32) D'ARCA SIMONETTI A. - Atti del IV Congr. Int. Microbiol., 1: 756 (1953).
 - (33) CASTELLI A. - Arch. Farm. Sper. Sc. aff., 16: 183-192 (1913).
 - (34) D'AMOUR F. E., BECKER F. E. e VAN RIPER W. - Quart. Rev. Biol., 2: 123 (1936).
 - (35) DEL VECCHIO V. - Igiene e Sanità Pubblica, 13: 265 (1957).
 - (36) DEL VECCHIO V. - Congr. Intern. Microbiol. Roma, (1953).
 - (37) DEL VECCHIO V. - Congr. Intern. odontoiatria. Roma, (1953).
 - (38) CANTORE G. P. - Riv. Parass., 49: 136 (1958).
-