

84. S. BETTINI e M. BOCCACCI. — Azione tossica degli acidi iodo- e cloroacetico sugli insetti. Inibizione della triosofosfatodeidrogenasi. (*)

Riassunto. — Gli AA., dopo aver accennato ai loro precedenti lavori sull'argomento, riportano per esteso le loro esperienze sulla azione degli acidi iodo- e cloroacetico su *P. americana* e su vari ceppi di *M. domestica*. Queste sostanze hanno dimostrato di possedere una notevole azione insetticida per contatto, espletata attraverso l'inibizione della triosofosfatodeidrogenasi (TPD).

Viene descritto dettagliatamente il metodo elaborato dagli AA. per il dosaggio della TPD, effettuato colorimetricamente usando il 2,6-diclorofenolindofenolo come accettore d'idrogeno. Inoltre gli AA. riportano le tecniche impiegate per le prove di inibizione della TPD da parte dell'acido iodoacetico in vitro ed in vivo in *P. americana* e per le prove di mortalità in *M. domestica*.

Gli AA. hanno riscontrato che non vi è sostanziale differenza nei valori della DL_{50} (acido cloroacetico per contatto), per due ceppi di *M. domestica*, uno sensibile e l'altro resistente alle sostanze insetticide « clorurate » (DDT, ecc.), e che i valori dell'attività TPDasica sono eguali per le due specie di insetti (*P. americana* e *M. domestica*).

E' stato inoltre rilevato che l'inibizione in vitro della TPD in estratti di *P. americana* è proporzionale al tempo di incubazione con acido iodoacetico e che, in vivo, l'inoculazione di 1 mg di acido iodoacetico/g di blatta determina una inibizione completa della attività TPDasica. Nelle prove di inibizione in vivo su *M. domestica* è risultato che la curva della inibizione TPDasica è parallela, ma più bassa, di quella di mortalità.

Gli AA. hanno tentato di ottenere un aumento della tolleranza verso l'acido cloroacetico in ceppi di *M. domestica*. Dopo aver descritto il metodo da essi seguito, riportano di non aver ottenuto, dopo 30 generazioni, un sensibile aumento della tolleranza all'acido cloroacetico nei due ceppi selezionati, nè una variazione dei valori dell'attività TPDasica degli estratti muscolari.

Résumé. — Les auteurs, après avoir rappelé leurs travaux précédents sur ce sujet, font un rapport détaillé de leurs expériences sur l'action des acides iodo- et chloroacétique sur *P. americana* et sur

(*) Il presente lavoro rientra nel piano di ricerche sulla mosca domestica concordato fra la Fondazione Rockefeller e l'Istituto Superiore di Sanità.

différentes souches de *M. domestica*. Ces substances se sont montrées capables d'une action insecticide considérable par contact, causée par l'inhibition de la triosophosphatedéhydrogénase (TPD).

On décrit en détail la méthode colorimétrique suivie par les auteurs pour le dosage de la TPD, effectuée à l'aide du 2,6-dichlorophénolindophénol accepteur d'hydrogène. Les auteurs rapportent en outre les techniques employées dans les essais d'inhibition de la TPD par l'acide iodoacétique *in vitro* et *in vivo* chez *P. americana* et dans les essais de mortalité chez *M. domestica*.

Les auteurs ont trouvé qu'il n'y a pas de différence substantielle dans les valeurs de la DL_{50} (acide chloroacétique par contact), pour deux souches de *M. domestica*, l'une sensible et l'autre résistante aux insecticides « chlorurés » (DDT, etc.) et que les valeurs de l'activité de la TPD sont égales pour les deux espèces d'insectes (*P. americana* et *M. domestica*).

On a noté en outre que l'inhibition *in vitro* de la TPD en extraits de *P. americana* est proportionnelle au temps d'incubation avec l'acide iodoacétique et que, *in vivo*, l'injection de 1 mg d'acide iodoacétique/g de blatte cause une inhibition complète de l'activité de la TPD. Dans les essais d'inhibition *in vivo* chez *M. domestica* on a trouvé que la courbe d'inhibition de la TPD est parallèle, mais plus basse, que celle de mortalité.

Les auteurs ont essayé d'obtenir une augmentation de la tolérance vis-à-vis de l'acide chloroacétique chez les souches de *M. domestica*. Après avoir décrit la méthode suivie, ils rapportent qu'ils n'ont pas obtenu, après 30 générations, une augmentation appréciable de la tolérance vis-à-vis de l'acide chloroacétique dans les deux souches sélectionnées, ni une variation dans les valeurs de l'activité de la TPD des extraits musculaires.

Summary. — The authors summarize their previous work and give a complete report of their experiments on the action of iodo- and chloroacetic acid on *Periplaneta americana* and on two strains of *Musca domestica*. These substances have been shown to be capable of considerable insecticidal action by contact through the inhibition of triosephosphate dehydrogenase (TPD).

They describe in detail the colorimetric method employed for the estimation of TPD using 2,6-dichlorophenolindophenol as hydrogen acceptor, and the technique employed for *in vitro* and *in vivo* tests for TPD inhibition by iodoacetic acid and for the house-fly « kill » tests.

The authors have shown that there is no substantial difference in

the LD₅₀ values (chloroacetic acid by contact) of two strains of *M. domestica* one of which is susceptible and the other resistant to chlorinated hydrocarbons (DDT, &c.). They have shown, moreover, that the TPD activities for the two insect species (*P. americana* and *M. domestica*) are equal.

It has also been demonstrated that TPD inhibition *in vitro* in *P. americana* extracts is proportional to the time of incubation with iodoacetic acid, and that the injection of 1 mg of iodoacetic acid per g of roach *in vivo* determines a complete inhibition of TPD activity. In the *in vivo* inhibition tests on *M. domestica* the TPD inhibition curve was parallel to the mortality curve, but lower.

The authors tried to obtain an increase of tolerance towards chloroacetic acid in strains of *M. domestica*. They describe their selection method and report that in 30 generations they did not succeed in obtaining a noticeable increase in tolerance towards chloroacetic acid in the two strains subjected to selection nor a variation in the TPD activity value of their muscle extracts.

Zusammenfassung. — Nach einem Hinweis auf ihre früheren Arbeiten über dieses Thema berichten die Verfasser eingehend über ihre Versuche über die Wirkung der Jod- und Chloressig-Säuren auf die *P. americana* und verschiedene Stämme der *M. domestica*. Die genannten Substanzen haben eine bemerkenswerte Wirkung als Kontaktinsektizide bewiesen, und zwar erfolgte diese Wirkung durch Inhibierung der Triosphosphat-Dehydrogenase (TPD).

Das von den Verfassern zwecks Dosierung der TPD ausgearbeitete Verfahren wird eingehend beschrieben, und zwar wird dieses Verfahren mittels Farbmessung unter Verwendung von 2,6-Dichlorphenolindophenol zur Aufnahme des Wasserstoffs durchgeführt. Weiterhin berichten die Verfasser über die Verfahren zur Durchführung der Versuche der TPD-Inhibierung mittels Jodessigsäure *in vitro* und *in vivo* bei der *P. americana* sowie der Vernichtungsversuche bei der *M. domestica*.

Die Verfasser haben festgestellt, dass kein nennenswerter Unterschied in den DL₅₀-Werten (Chloressigsäure durch Kontakt) bei den beiden Stämmen der *M. domestica* besteht, von denen der eine gegenüber Chlor-Insektiziden (DDT usw.) empfindlich und der andere gegen diese Insektizide resistent war, und dass die Werte der TPD-Aktivität bei beiden Insektenarten gleich sind (*P. americana* und *M. domestica*).

Es wurde weiter gefunden, dass die TPD-Inhibierung *in vitro* bei Extrakten der *P. americana* im Verhältnis zur Inkubationszeit mit Jodessigsäure steht, und dass die Inokulierung von 1 mg Jodessigsäure

pro Gramm Schaben eine völlige Inibierung der TPD-Aktivität bedingt. Bei den Inibierungsversuchen in vivo mit der *M. domestica* ergab sich, dass die TPD-Inibierungskurve parallel der Sterblichkeitskurve wenn auch tiefere als die letztere ist.

Die Verfasser haben versucht, eine grössere Tolleranz von Stämmen der *M. domestica* gegenüber der Chloressigsäure zu erhalten, und berichten hierzu unter Beschreibung der zu diesem Zweck benutzten Verfahren, nach 30 Generationen noch keine merkbare Tolleranzerhöhung gegenüber der Chloressigsäure bei den beiden ausgewählten Stämmen und auch keine Veränderung der Werte der TPD-Aktivität bei den muskle Extrakten festgestellt zu haben.

Studiando l'azione sugli insetti di alcune sostanze contenenti alogeni, alchilanti dei gruppi tiolici (*), notammo che tali sostanze possiedono notevole azione insetticida per contatto. Il gruppo di sostanze sperimentate comprende gli acidi iodo- e cloroacetico ed alcuni loro esteri (¹).

Come dimostrato da M'CHAEELIS e SCHUBERT (²), in condizioni fisiologiche, l'acido iodoacetico reagisce con i gruppi tiolici e non con i gruppi amminici o idrossilici. Difatti nei vertebrati la azione tossica dell'acido iodoacetico è dovuta all'inibizione degli enzimi-SH (^{3, 4, 5}) e principalmente della triosofosfatodeidrogenasi (TPD). L'inibizione della TPD provoca paralisi in contrattura dei muscoli, dovuta al mancato apporto di ATP (⁶⁻⁷). La contrattura muscolare dovuta all'azione di alcuni alchilanti alogenati, tra cui l'acido bromoacetico, è stata anche dimostrata da GODEAUX (⁸) sugli invertebrati.

Come da noi dimostrato (¹), quasi tutto lo iodio penetrato per contatto nell'insetto sotto forma di acido iodoacetico si ritrova come ioduro; è logico supporre una reazione del tipo



SELIGMAN e RUTENBURG (⁹) avevano notato che l'acido iodoacetico non inibiva sensibilmente la succinodeidrogenasi dei muscoli dei vertebrati.

Per quanto riguarda gli insetti, come da noi dimostrato (¹⁰), l'acido iodoacetico non ha sensibile azione inibente sulla succinodeidrogenasi del muscolo di *Periplaneta americana*, nè in vitro nè in vivo.

(*) Per brevità, tali sostanze saranno denominate, in questo lavoro, « alchilanti alogenati ».

Nel presente lavoro riportiamo i risultati ottenuti studiando negli insetti l'azione degli acidi iodo- e cloroacetico sulla TPD.

Per il dosaggio della TPD, tra i metodi attualmente in uso vi sono quelli manometrici di MEYERHOF e OHLMEYER ⁽¹¹⁾ e di QUASTLE e WHEATLEY ⁽¹²⁾, quello spettrofotometrico di DRABKIN e MEYERHOF ⁽¹³⁾ oltre al classico metodo generale di THUNBERG, di più semplice esecuzione.

Ci siamo serviti di un metodo colorimetrico ancora più semplice, usando il 2,6-diclorofenolindofenolo come accettore d'idrogeno, in luogo del bleu di metilene. Tale metodo ha il vantaggio di non richiedere l'uso di tubi speciali da vuoto poichè la forma ridotta del 2,6-diclorofenolindofenolo si riossida solo lentamente all'aria. Si può quindi far avvenire la reazione direttamente nei tubi del colorimetro di cui si dispone.

Come materiale da esperimento abbiamo usato *Periplaneta americana* e *Musca domestica*. Di *M. domestica* si sono scelti due ceppi, uno sensibile e l'altro resistente agli insetticidi « clorurati » (*).

Essi sono stati paragonati, sia per l'attività TPDasica dei loro estratti, che per la suscettibilità agli alchilanti alogenati.

Per il ceppo resistente sono state confrontate le curve di abbattimento e le curve di inibizione della TPD a varie concentrazioni di acido cloroacetico per contatto.

Ambedue i ceppi sono stati selezionati al fine di ottenere una diminuzione della loro suscettibilità verso l'acido cloroacetico per contatto.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALE BIOLOGICO

Ci siamo serviti del seguente materiale:

Periplaneta americana, allevamento di laboratorio.

Musca domestica dei seguenti ceppi:

1) Ceppo sensibile proveniente da Roma (S-Roma), allevato in laboratorio.

2) Ceppo multiresistente, proveniente dalla Sardegna (R.Sardegna), allevato in laboratorio e selezionato periodicamente verso il chlordane. Risulta altamente resistente al chlordane e notevolmente resistente al DDT ed analoghi ed al lindano.

(*) Si intendono per « clorurati » quegli insetticidi, contenenti cloro nella loro molecola, rappresentati da: DDT ed analoghi, chlordane ed analoghi, lindano.

METODO DI DOSAGGIO DELLA TRIOSOFOSFATODEIDROGENASI

Prodotti usati — Cozimasi (DPN) pura al 75% della Ditta Schwarz. Fruttosio-1,6-difosfato (HDP) di buona purezza (90%) sotto forma di sale di bario, della Ditta Schwarz. Le soluzioni del sale sodico si preparano eliminando il bario con Na_2SO_4 ed aggiustando quindi il pH con idrato sodico (pH 6,5 per estratti di *P. americana* e pH 5,9 per quelli di *M. domestica*).

Tutti gli altri prodotti usati sono quelli puri per analisi forniti da Ditte italiane.

Preparazione degli estratti. — Nella preparazione degli estratti si è seguito un procedimento simile a quello usato da CORI e coll. ⁽¹⁴⁾ per la preparazione di TPD pura cristallina dal muscolo di vertebrati.

Per preparare gli estratti di tessuto muscolare di *P. americana*, vengono prelevate agli insetti, sotto anestesia, le zampe metatoraciche tagliandole a livello del trocantino ed eliminando il femore e gli altri segmenti distali. Il materiale così ottenuto, costituito dalle sole coxe, viene posto a 0°C subito dopo il prelievo. Tutte le successive operazioni vanno compiute alla temperatura di 0°. E' bene non far trascorrere molto tempo dal momento del prelievo al momento della preparazione degli estratti.

Si tritura 1 g di coxe (la quasi totalità del peso è costituita da tessuto muscolare) in un piccolo mortaio di vetro, con poca sabbia di quarzo, dopo aggiunta di 2 cm³ di NaOH 0,02 N. Quando il materiale risulta ben triturato, si aggiunge 1 cm³ di acqua, si mescola bene col pestello e si lascia a se per 20-30 minuti.

Trascorso tale periodo, l'estratto viene centrifugato per 20 minuti alla velocità di 16.000 giri al minuto. Il centrifugato limpido, viene prelevato e conservato a 0° sino al momento del dosaggio.

Gli estratti così preparati, tenuti a 0°, conservano intatta solo per qualche ora la loro attività TPDasica; in 24 hr. si ha una diminuzione di attività del 40% circa. A temperatura ambiente si ha una rapida perdita della attività.

Per la preparazione degli estratti di tessuto muscolare di *M. domestica*, le mosche vengono anestetizzate per raffreddamento a 0° e quindi private della testa e dell'addome. Il torace così ottenuto, è costituito principalmente (90%) da tessuto muscolare, come indicato da BALDWIN e NEEDHAM ⁽¹⁵⁾ per *Lucilia* e *Calliphora* sp.

Partendo da una quantità di toraci pari ad 1 g (circa 100 individui) si prepara l'estratto seguendo le modalità già indicate per *P.americana*.

Nella maggior parte degli esperimenti si sono usati estratti di mosche intere, variando i volumi dei liquidi di estrazione.

Si tritura 1 g di mosche intere nel mortaio con poca sabbia di quarzo dopo aggiunta di 1,6 cm³ di NaOH 0,02 N. Si aggiungono quindi 0,8 cm³ di acqua, si mescola bene e si lascia a se per 20-30 minuti. Si centrifuga poi per 20 minuti a 16.000 giri al minuto. L'estratto così ottenuto ha una attività TPDasica pressochè uguale a quella degli estratti di soli toraci di mosche e di zampe di *P. americana* come risulta dalla Tabella 1.

TABELLA 1. — Attività TPDasica di estratti di tessuto muscolare di *P. americana* e di *M. domestica*, e di estratti di *M. domestica* in toto.

Specie	Materiale	Attività enzimatica (valori arbitrari)
<i>P. americana</i>	estratti preparati dalle coxe	12.7
<i>M. domestica</i>	estratti preparati da soli toraci	12.0
<i>M. domestica</i>	estratti preparati da mosche intere	12.2

Conservazione del tessuto muscolare a —30°C. — Mentre gli estratti, preparati come descritto e tenuti a 0°, conservano la loro attività per qualche ora, si è notato che il tessuto muscolare tenuto a —30° conserva intatta la sua attività TPDasica anche per parecchie settimane.

Attività aldolasica degli estratti. — Per la determinazione della attività aldolasica si è seguito il metodo usato da BRUNS ⁽¹⁶⁾ per la determinazione della aldolasi del siero.

Gli estratti preparati come già descritto hanno una marcata attività aldolasica. Per gli estratti di mosche in toto, con 0,05 cm³ di estratto in 5 minuti di reazione a 37°, si ottiene nelle condizioni indicate da BRUNS un valore di $E_{1\text{ cm}} = 0,500$ a 540 mμ.

Dosaggio della attività TPDasica. — Avendo dimostrato negli estratti la presenza di aldolasi, si è usato come substrato il fruttosio-1,6-di-fosfato. E' noto che l'aldolasi non viene inibita dall'acido iodoacetico ⁽⁴⁾.

Ai liquidi di reazione si aggiunge NaF per inibire l'enolasi ed evitare quindi l'eventuale formazione di acido piruvico che in presenza della lattico deidrogenasi potrebbe competere con il 2,6-diclorofenolindofenolo come accettore di idrogeno.

Metodo I. - Nel tubo del colorimetro si pone: 1 cm³ tampone fosfati 0,13 M (pH 6,5 per estratti di *P. americana* e pH 5,9 per estratti di *M. domestica*) + 0,15 cm³ NaF 0,4 M + 0,4 cm³ di DPN al 0,1% + 0,25 cm³ HDP al 2% + cm³ di 2,6-diclorofenolindofenolo 0,0005 M + 0,3 cm³ di acqua. Al tempo 0 si aggiungono 0,2 cm³ di estratto, si agita

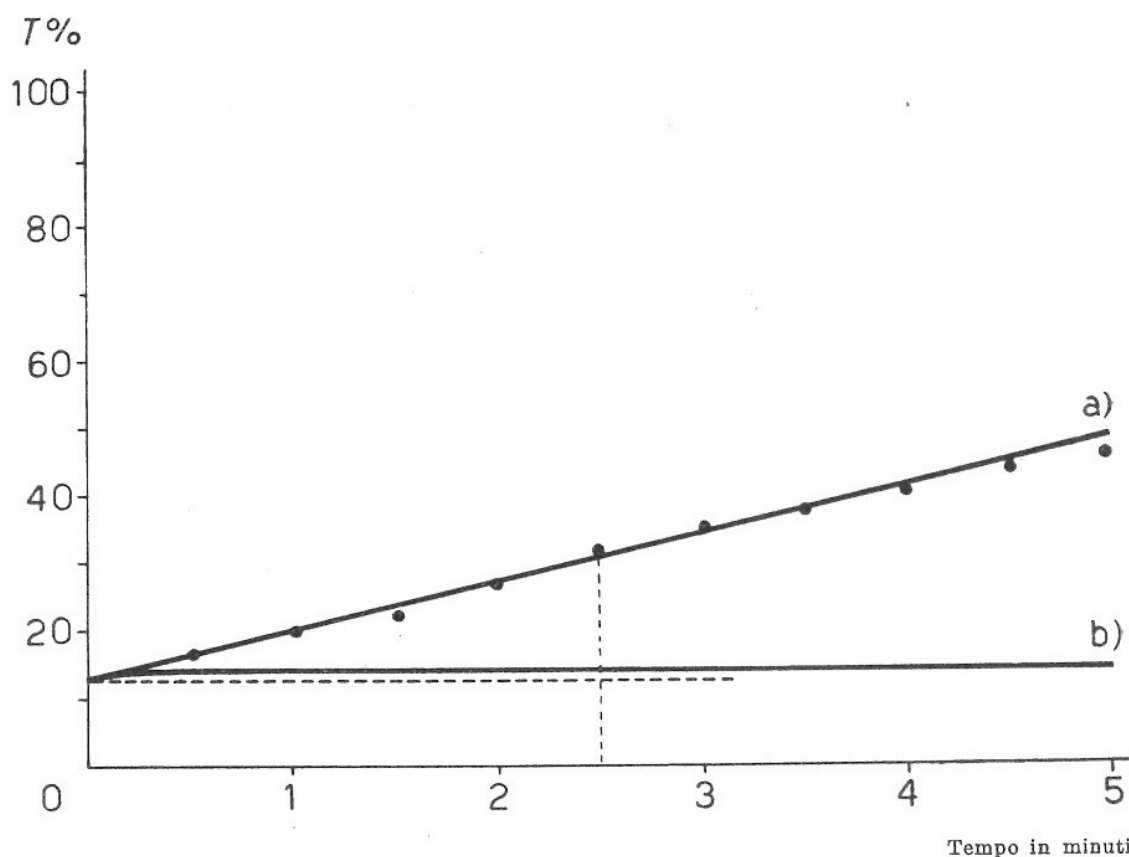


Fig. 1. - Andamento della reazione enzimatica con estratto di coxe di *P. americana*, secondo il metodo I, a) in presenza di substrato, b) in assenza di substrato.

e si fanno le letture, ogni 30 secondi per 5 minuti, alla lunghezza d'onda di 600 mμ o con filtro adeguato. Si ottengono delle curve di reazione come quella riportata nella figura 1. Nella stessa figura è anche riportata la curva di una reazione in assenza di substrato (HDP). Si nota che in tal caso la decolorazione del 2,6-diclorofenolindofenolo in 5 minuti è del tutto trascurabile.

Come valore dell'attività enzimatica, si considera l'entità della decolorazione nei primi due minuti e mezzo di reazione (figura 1).

In tutte le prove si è operato a temperatura ambiente prossima ai 22°. Dato che anche da un giorno all'altro le oscillazioni di temperatura sono state molto modeste, non si sono mai apportate delle correzioni.

Il pH ottimale di reazione è stato determinato, secondo la tecnica usuale, dosando l'attività di uno stesso estratto a vari valori del pH. Le curve attività enzimatica/pH sono riportate nella figura 2. Per gli

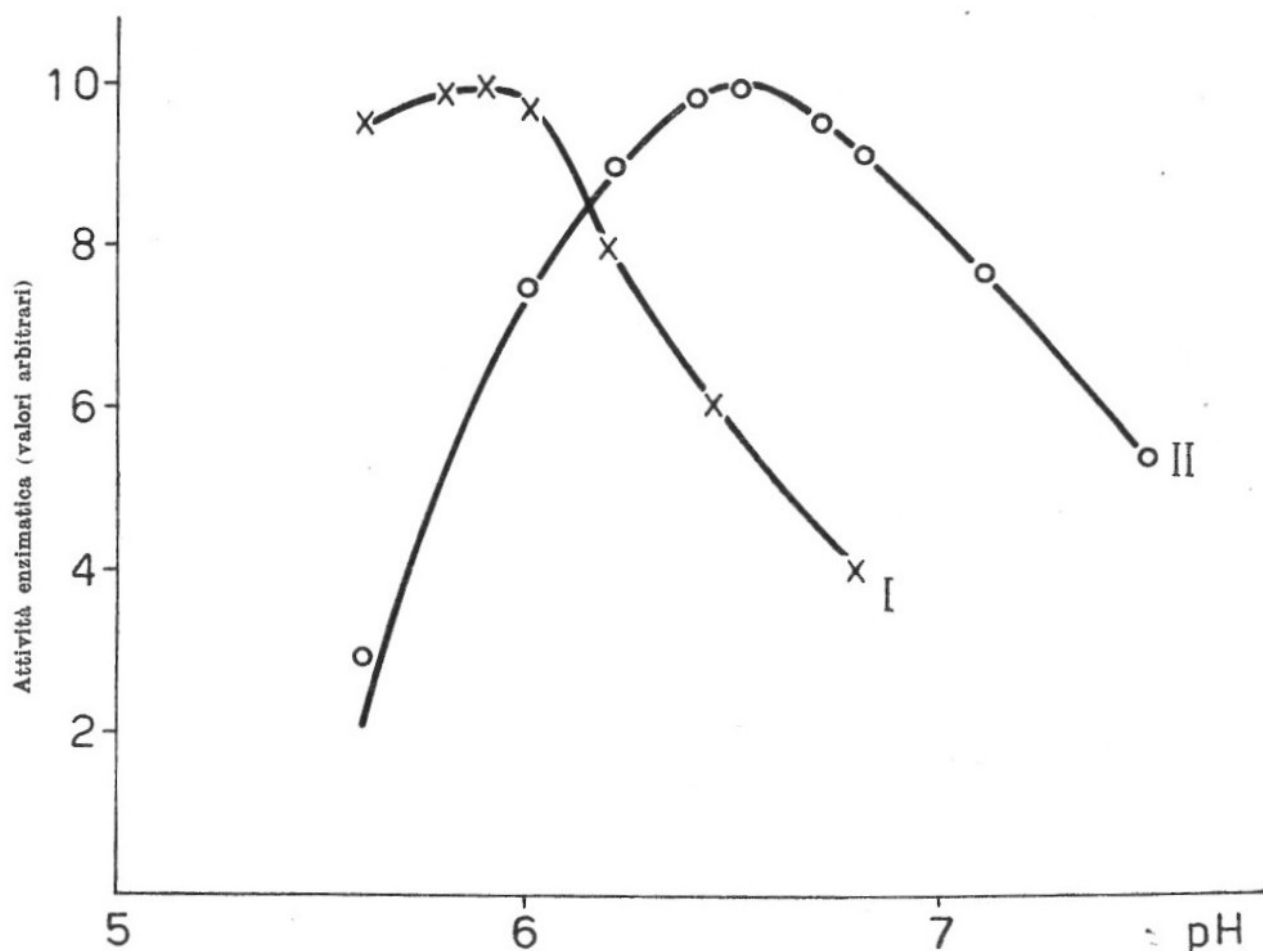


Fig. 2. - Influenza del pH sulla attività TPDasica in estratti di: I) *M. domestica* in toto, II) tessuto muscolare di *P. americana*.

estratti di tessuto muscolare di *P. americana* il pH ottimale è 6,5 mentre per gli estratti di *M. domestica* in toto è 5,9. Per tutta la gamma di pH presa in esame si è usata la soluzione tamponante di fosfati.

E' stato anche determinato il rapporto concentrazione dell'enzima attività enzimatica, misurando l'attività di varie quantità di uno stesso estratto di tessuto muscolare di *P. americana*.

Dalla figura 3 si può notare che vi è proporzionalità fra concentrazione dell'enzima e attività enzimatica.

Durante le prime prove di dosaggio dell'attività TPDasica, si è notato che gli estratti torbidi, per centrifugazione insufficiente, davano

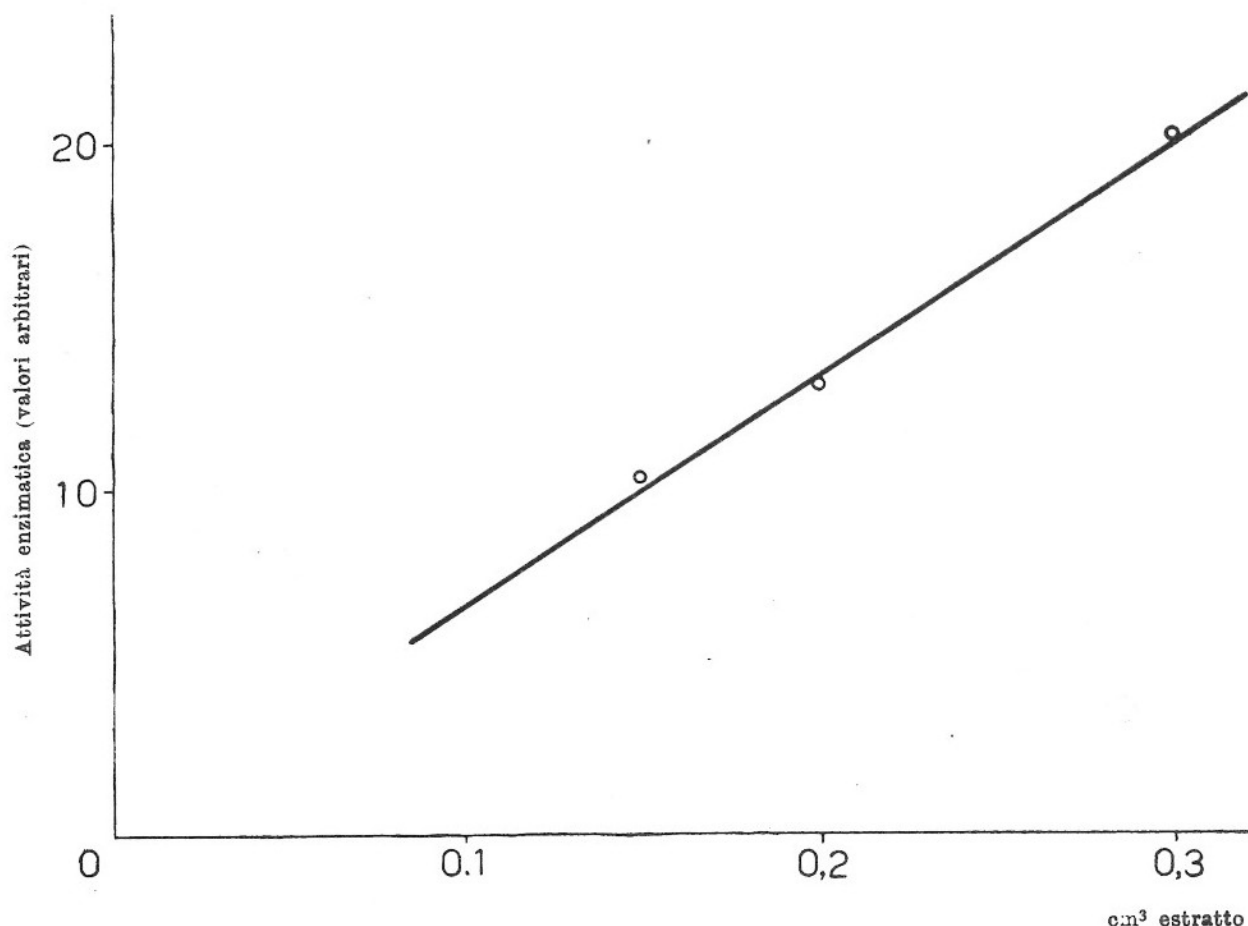


Fig. 3. - Relazione tra attività TPDasica e concentrazione dell'enzima. In ascisse sono indicate le quantità di un estratto di *P. americana* impiegate nella reazione enzimatica secondo il metodo I.

delle curve di reazione alterate e valori della attività enzimatica notevolmente più bassi. Nella figura 4 sono riportate le curve di reazione di un estratto di mosche in toto, centrifugato per 20 minuti, prima a 8.000 giri/minuto (torbido) e poi a 16.000 giri/minuto (limpido).

Se si aggiunge del KCN agli estratti torbidi, le curve di reazione riprendono la loro forma regolare ed i valori dell'attività enzimatica risultano anche più alti di quelli ottenuti con lo stesso estratto, limpido, ma in assenza di KCN (figura 4). Il KCN quindi, oltre ad eliminare l'effetto competitivo del materiale difficilmente centrifugabile con il 2,6-dicloro-fenolindofenolo, riattiva quella frazione di enzima che si è ossidata durante la preparazione dell'estratto. Difatti, poichè la TPD è un enzima tiolico attivo solo nella sua forma ridotta, si ha presumibilmente un effetto attivante del KCN simile a quello già descritto da LEDOUX ⁽¹⁷⁾ per la ribonucleasi.

Un attivatore molto più energico è la cisteina, usata anche da CORI e coll. ⁽¹⁴⁾ nelle loro preparazioni di enzima cristallino. Nel nostro caso la cisteina non può essere usata perchè nelle condizioni del metodo essa

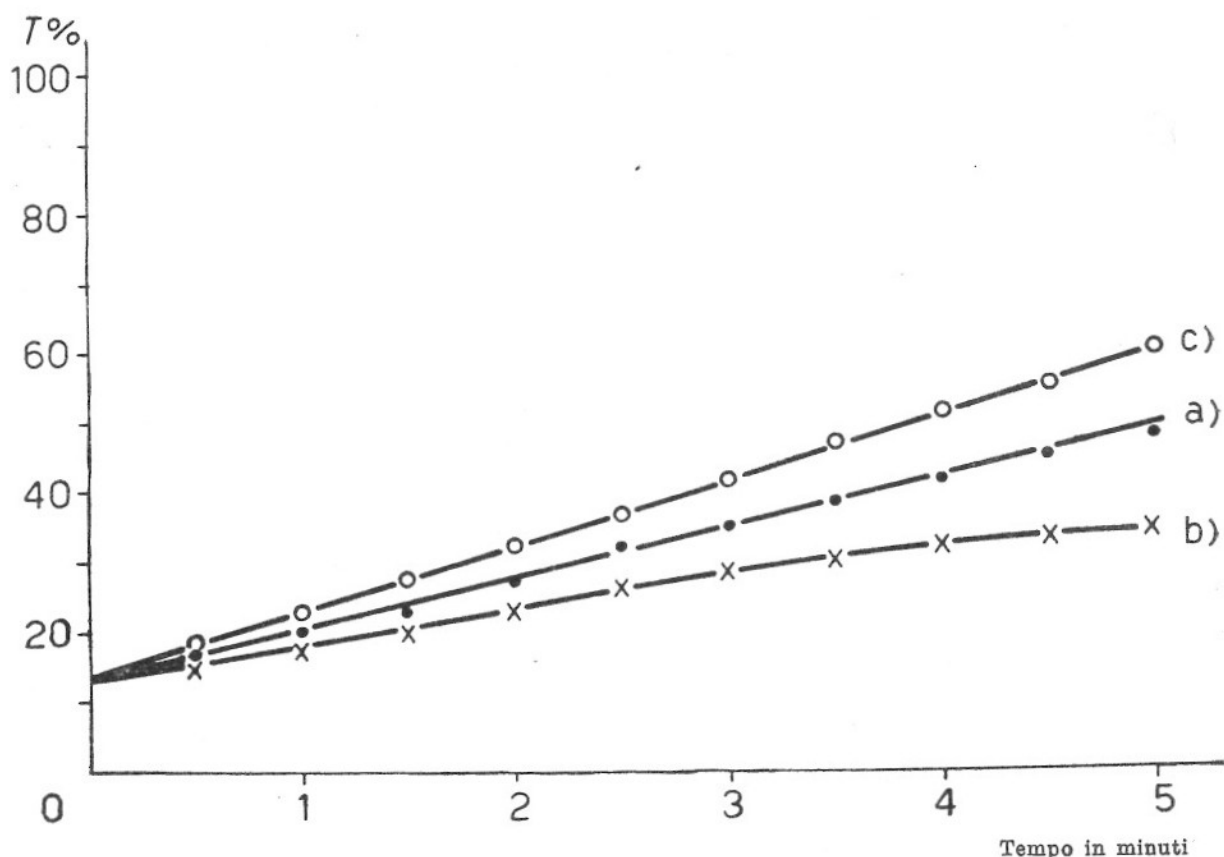


Fig. 4. - Andamento della reazione enzimatica con estratto di *M. domestica* in toto: a) estratto limpido in assenza di KCN (metodo I), b) estratto torbido in assenza di KCN (metodo I), c) estratto torbido con KCN (metodo II).

riduce rapidamente il 2,6-diclorofenolindofenolo. Nella esecuzione del metodo si dovrà quindi far uso di KCN. Il metodo di dosaggio definitivo, da noi usato in tutte le successive prove, è il seguente:

Metodo II. - Nel tubo del colorimetro si pone: 1 cm³ tampone fosfati 0,13 M (pH 6,5 per estratti di *P. americana* e pH 5,9 per estratti di *M. domestica*) + 0,15 cm³ NaF 0,4 M + 0,4 cm³ DPN al 0,1% + 0,25 cm³ HDP al 2% + 0,1 cm³ KCN 0,003 M + 0,2 cm³ di acqua. Si aggiungono poi 0,2 cm³ di estratto e si lascia a temperatura ambiente per 3 minuti. Trascorso tale periodo di tempo, si aggiungono rapidamente 0,7 cm³ di 2,6-diclorofenolindofenolo e si eseguono le letture ogni 30 secondi per 5 minuti.

TECNICA IMPIEGATA NELLE PROVE DI INIBIZIONE IN VITRO DELLA TPD CON ACIDO IODOACETICO.

Abbiamo seguito le modalità indicate da CORI e coll. ⁽¹⁴⁾ per la TPD dei muscoli di vertebrati. A 0,5 cm³ di estratto di tessuto muscolare di *P. americana*, vengono addizionati 0,5 cm³ di una soluzione 0,001 M di

acido iodoacetico in modo da avere una concentrazione finale 0,0005 M in acido iodoacetico. Si mantiene a 0° e dopo 15 minuti e dopo 30 minuti si prelevano dalla soluzione 0,4 cm³ (corrispondenti a 0,2 cm³ di estratto) per il dosaggio della attività enzimatica secondo il metodo I.

INOCULAZIONE IN « P. AMERICANA ».

Per le nostre esperienze, sono state usate femmine di *P. americana*. Le inoculazioni sono state eseguite direttamente nella cavità celomatica, inserendo l'ago (n. 20, con la estremità smussata) fra il 3° ed il 4° urotergo, nel punto di mezzo tra la linea mediana ed il margine laterale dell'addome, facendo scorrere l'ago sotto l'esoscheletro, senza ledere perciò gli organi vitali dell'insetto.

Le soluzioni del materiale in esame sono state inoculate per mezzo di siringa micrometrica, precisa al 0,25 µl. (La precisione della vite micrometrica, del tipo corrente, è stata aumentata inserendo alla base della vite un disco goniometrico diviso in 400° e fornendo al supporto della vite un traguardo fisso. In tale maniera, 1/10 di giro, che rappresenta una lunghezza considerevole sulla periferia del disco goniometrico e quindi ben determinabile sul traguardo fisso, fornisce µl 0,25 usando una comune siringa da tubercolina).

PREPARAZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO PER LE PROVE DI INIBIZIONE DELLA TPD IN VIVO.

A gruppi di 10 femmine di *P. americana* sono state prelevate le zampe metatoraciche di un solo lato, recidendole a livello del trocantino ed eliminando il femore e gli altri segmenti distali. Su tale materiale (coxe), costituito nella sua quasi totalità da tessuto muscolare, è stata dosata l'attività enzimatica come controllo dei valori normali. Gli stessi individui sono stati quindi inoculati con soluzione acquosa di iodoacetato di sodio e, trascorsi 60 minuti, sono state prelevate le zampe metatoraciche del lato opposto per rilevare la eventuale inibizione della TPD da parte della sostanza inoculata.

PROVE DI ABBATTIMENTO.

Per le prove di abbattimento, abbiamo dovuto impiegare un metodo standard per evitare le molteplici cause di errore che avrebbero alterato i valori delle DL₅₀.

I ceppi di *M. domestica* sono stati allevati nei mezzi colturali e con

gli accorgimenti di tecnica comunemente usati in laboratorio. Si è posta particolare attenzione affinché il numero di uova seminate nei terreni fosse sempre proporzionato alla quantità di terreno, per evitare diversità nelle dimensioni degli esemplari nelle varie generazioni. Sono stati usati esemplari maschi e femmine di 4-7 giorni di età. Le mosche sono state prelevate dall'allevamento generale con un aspiratore, cercando di evitare ogni inutile trauma, quindi immesse in gabbiette, tenendo separati i sessi, a gruppi di 50 esemplari ognuno. Al momento della prova, la gabbietta veniva collocata in un sacchetto di materiale plastico ove veniva immessa anidride carbonica. Le mosche anestetizzate si passavano quindi nei recipienti trattati con acido cloroacetico ove si mantenevano per il periodo di un'ora. Alla fine di tale periodo, dopo nuova anestesia con anidride carbonica, le mosche venivano poste ancora nelle loro gabbiette (con acqua e zucchero) e tenute in osservazione per 24 ore al termine delle quali venivano contati gli individui abbattuti.

Poichè l'azione tossica delle sostanze in esperimento è irreversibile, il termine « abbattimento » è stato sostituito da quello « mortalità » ed abbiamo considerato morti anche gli individui abbattuti e quelli moribondi.

TRATTAMENTO DELLE SUPERFICI DI CONTATTO.

Le superfici di contatto sono costituite da fogli di carta bibula trattati con soluzione di acido cloroacetico in olio di oliva. Per una buona riproducibilità del metodo, è indispensabile usare sempre lo stesso tipo di carta. Nelle nostre prove abbiamo impiegato una comune carta da filtro martellata.

Si è usato come solvente l'olio di oliva poichè questo oltre a non essere tossico per le mosche domestiche (¹⁸) nelle condizioni dell'esperimento, ha mostrato di essere un ottimo solvente per l'acido cloroacetico e di diminuirne notevolmente la volatilità. E' stata impiegata una soluzione di acido cloroacetico in olio di oliva-etere 1:2 onde facilitare la distribuzione della sostanza sulla carta bibula. Il liquido è stato distribuito con pipette graduate su porzioni di carta aventi le seguenti dimensioni: rettangoli di $24 \times 12,5$ cm, dischi del diametro di 10 e 6 cm. La carta, per il trattamento, veniva appoggiata sulle punte di spilli disposti verticalmente su un piano. Dopo il trattamento le carte venivano sospese per 60 minuti a temperatura ambiente onde permettere al liquido di distribuirsi uniformemente sulla carta bibula ed all'etere di evaporare. Con la carta da noi impiegata, la quantità ottimale di olio di oliva da distribuire sulla carta, è di $0,85 \text{ cm}^3/100 \text{ cm}^2$.

Quindi i rettangoli di carta venivano piegati in modo da formare dei cilindri aperti alle basi unendo i due lati più corti fra di loro con due punti metallici si da ottenere dei cilindri con diametro non superiore a quello dei beakers da noi usati come supporto della carta. Sul fondo del beaker veniva collocato il disco di carta del diametro di 6 cm, quindi veniva introdotto il cilindro e sopra veniva posto il secondo disco del diametro di 10 cm ove era stato previamente praticato un foro del diametro di 0,5 cm. In tal maniera abbiamo ottenuto dei recipienti cilindrici di carta le pareti dei quali erano state trattate uniformemente con quantità note di acido cloroacetico in olio di oliva.

Il foro praticato nella base superiore del cilindro veniva coperto con un vetrino portaoggetto onde permettere l'osservazione nell'interno del cilindro. Il foro inoltre serve ad introdurre CO_2 per anestetizzare le mosche ad esposizione avvenuta, senza pericolo di fuoriuscita degli insetti.

SELEZIONE DI CEPPI DI « *M. DOMESTICA* » CON ACIDO CLOROACETICO.

Al fine di determinare se è possibile ottenere un aumento della tolleranza verso l'acido cloroacetico in ceppi di *M. domestica*, abbiamo sottoposto una serie di generazioni a trattamenti seguendo le modalità appresso riportate.

Dai ceppi S-Roma ed R-Sardegna, da tempo allevati in questo Laboratorio, sono state originate due nuove linee che sono state selezionate verso l'acido cloroacetico per contatto, e si è continuato ad allevare i ceppi di origine, come precedentemente descritto.

Per ciascuna generazione delle nuove linee sono stati separati i maschi dalle femmine prima di fornir loro qualsiasi nutrimento, evitandone così l'accoppiamento.

Circa 300 maschi e 300 femmine di ogni generazione venivano esposti separatamente per un tempo determinato all'azione per contatto dell'acido cloroacetico a concentrazioni tali da avere una sopravvivenza di circa il 40% sia delle femmine che dei maschi. Tutti i sopravvissuti furono usati per ottenere la generazione successiva.

RISULTATI

DL₅₀ NEI VARI CEPPI DI « *M. DOMESTICA* ».

Le DL₅₀ sono state determinate, secondo il metodo già descritto, nei seguenti ceppi di *M. domestica*: S-Roma ed R-Sardegna.

I risultati sono riportati nella Tab. 2. In essa si nota che i valori delle DL₅₀ non sono sostanzialmente diversi per i due ceppi.

TABELLA 2. — DL_{50} di acido cloroacetico, per contatto, in ♂♂ e ♀♀ di *M. domestica* dei ceppi S-Roma e R-Sardegna.

Ceppo	Data	DL_{50} ♀♀ gr/m ²	DL_{50} ♂♂ gr/m ²
S-Roma	13/1/1934	1.50	0.50
»	13/3/1934	0.65	0.37
»	21/4/1934	1.25	0.65
R. Sardegna	13/1/1934	1.70	0.80
»	13/3/1934	0.80	0.40
»	21/4/1934	1.40	0.60

ATTIVITÀ TPDASICA IN ESTRATTI DI « P. AMERICANA » E DI « M. DOMESTICA ».

Abbiamo determinato l'attività TPDasica in estratti di coxe di *P. americana* ed in estratti di *M. domestica* in toto, preparati secondo le modalità già descritte nel metodo.

I risultati sono riportati nella Tab. 3. Da essa risulta che le due

TABELLA 3. — Attività TPDasica di estratti di *P. americana* e di estratti di *M. domestica*

Specie	Materiale	Attività enzimatica (valori arbitrari)	pH ottimale per la reazione enzimatica
<i>P. americana</i> ♀♀	Estratto delle coxe	{ 12.5 12.9 13.7	6.5
<i>M. domestica</i> (S-Roma) ♀♀	Estratto in toto	{ 13.4 11.0 13.4	5.9
<i>M. domestica</i> (R-Sardegna) ♀♀	Estratto in toto	{ 13.5 10.5 13.7	5.9

specie di insetti danno valori pressochè eguali di attività TPDasica. Tale attività è eguale anche per ceppi diversi di *M. domestica*. Il pH ottimale di reazione è diverso per le due specie.

INIBIZIONE DELLA TPD CON GLI ACIDI IODO- E CLOROACETICO.

Inibizione in vitro. — Per studiare l'azione inibente dell'acido iodoacetico in vitro sulla TPD, si sono usati estratti di coxe di *P. americana*. Gli estratti sono stati incubati a 0° per 15 minuti e per 30 minuti con acido iodoacetico 0,0003 M, secondo le modalità già descritte.

TABELLA 4. — Inibizione della TPD in estratti dei muscoli coxali di *P. americana* ♀♀ incubati a 0°C, per vari tempi, in acido iodoacetico 0,0003 M.

	Estratti non trattati	Estratti incubati per 15'	Estratti incubati per 30'
attività enzimatica (valori arbitrari)	13.03	5.2	2.6

Come risulta dalla Tab. 4 e dalle curve riportate nella figura 5, si ottiene una sensibile inibizione della attività enzimatica proporzionale al tempo di incubazione con acido iodoacetico.

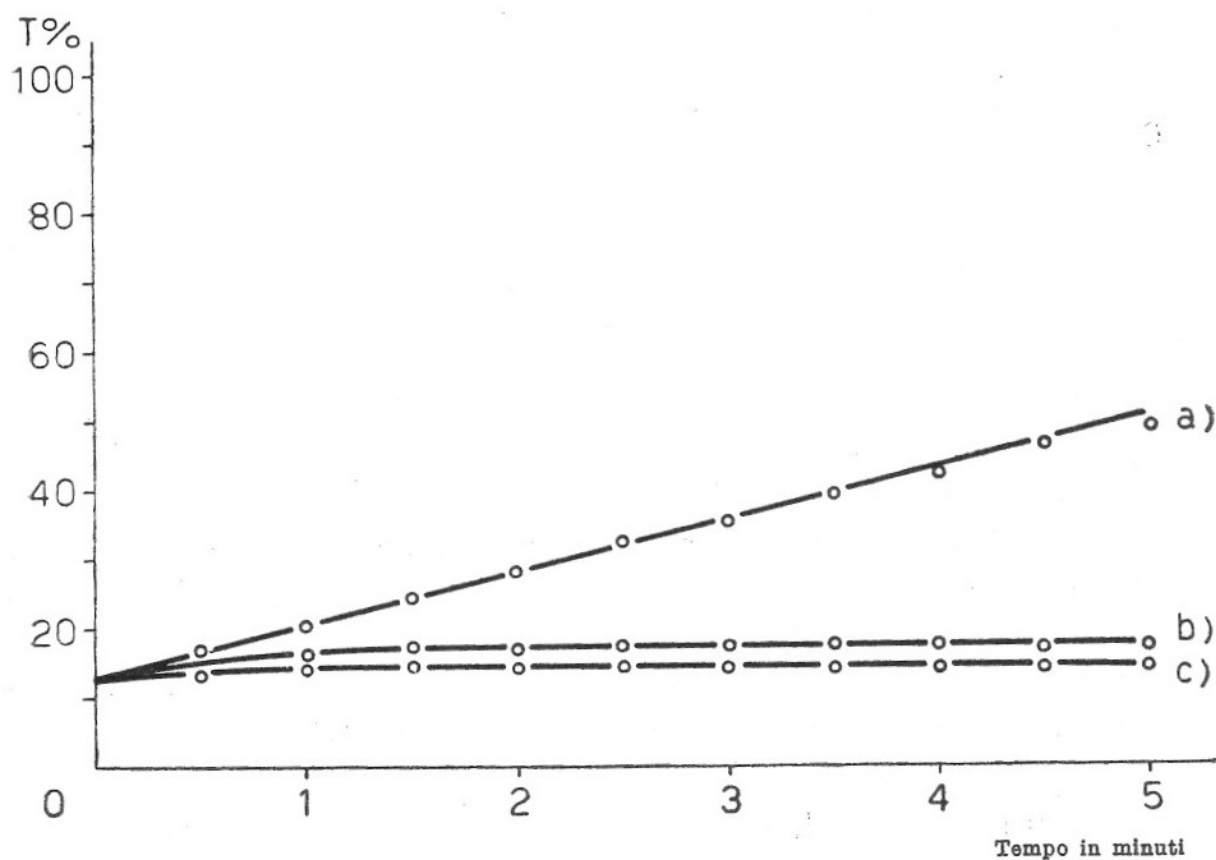


Fig. 5. - Azione dell'acido iodoacetico sulla TPD in estratti di *P. americana*: a) andamento normale della reazione enzimatica, b) andamento della reazione enzimatica, dopo 15' di incubazione a 0°C, in acido iodoacetico, 0,0003 M, c) idem dopo 30'.

Inibizione in vivo. — Nelle prove di inibizione della attività TPDasica in vivo nella *P. americana*, i dosaggi sono stati eseguiti su estratti di coxe, prima e dopo inoculazione di acido iodoacetico, come già descritto.

Dosi di 1 mg di acido iodoacetico per grammo di blatta (DL_{50} per femmina di *P. americana* = 0,1 mg/g) ⁽¹⁾ determinano una inibizione completa della attività enzimatica, come si osserva nel grafico della figura 6.

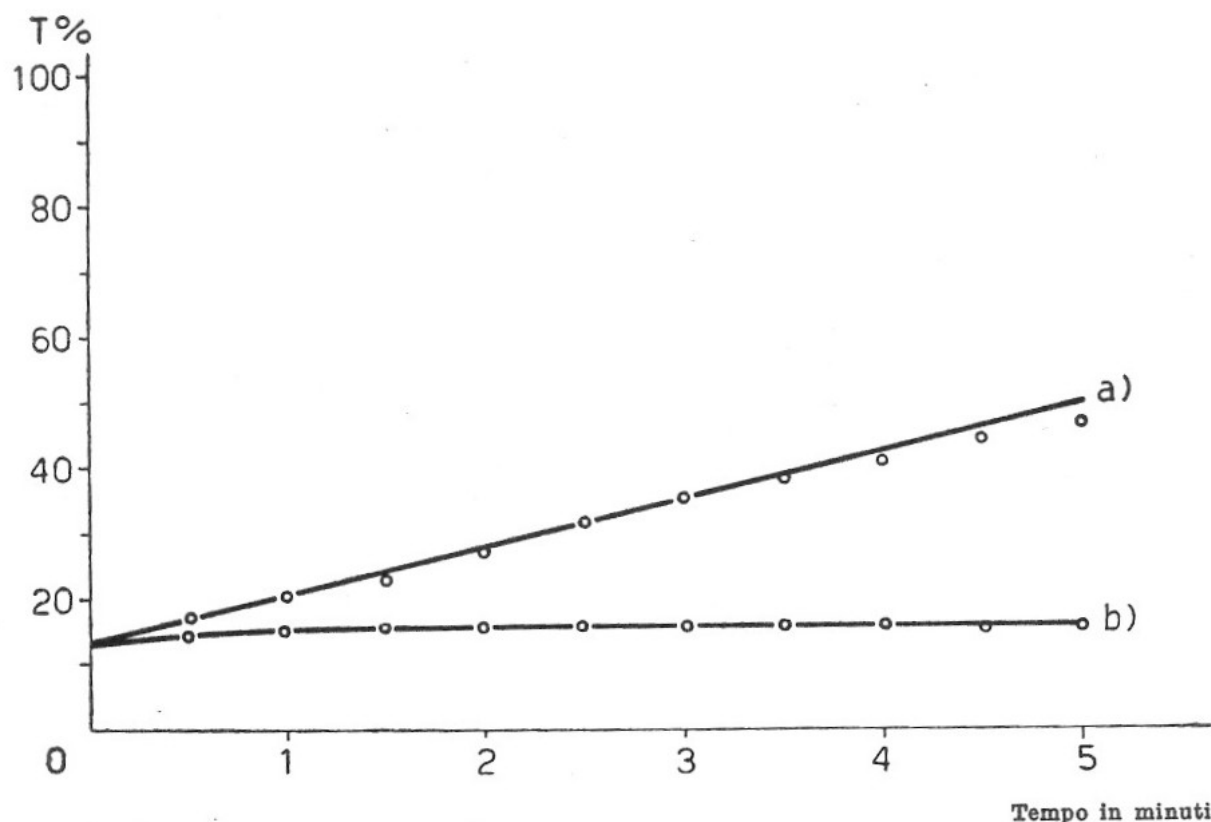


Fig. 6. - Azione in vivo dell'acido iodoacetico sulla TPD nella *P. americana*: a) andamento della reazione enzimatica di estratti di coxe, b) idem dopo inoculazione di acido iodoacetico, 1 mg/g di blatta.

Per le prove di inibizione in vivo su *M. domestica*, gruppi di 100 femmine del ceppo R-Sardegna sono stati posti, secondo la tecnica già descritta, a contatto di carta bibula imbevuta di olio di oliva contenente acido cloroacetico a differenti concentrazioni sì da avere 0,25—6,00 g/m². Per i vari gruppi si è determinata sia la percentuale di mortalità che l'inibizione percentuale dell'attività enzimatica.

Come risulta dal grafico della figura 7, la curva di inibizione enzimatica è parallela, ma più bassa, di quella di mortalità.

SELEZIONE DI CEPPI DI « *M. DOMESTICA* » CON ACIDO CLOROACETICO.

Seguendo il metodo già descritto, abbiamo selezionato due ceppi di *M. domestica* (S-Roma ed R-Sardegna) verso l'acido cloroacetico.

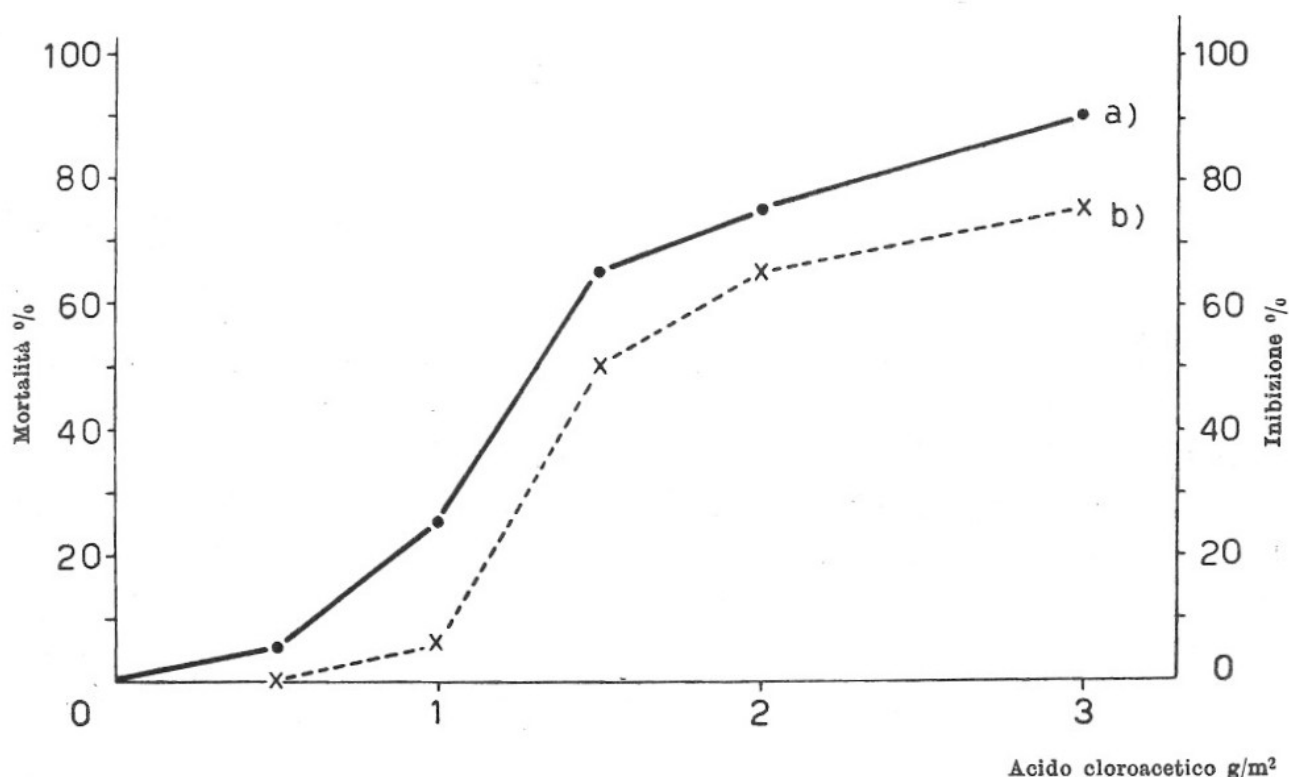


Fig. 7. - Rapporto fra percentuale di abbattimento e percentuale di inibizione TPDasica in *M. domestica* (R-Sardegna) contatto con varie concentrazioni di acido cloroacetico: a) mortalità percentuale, b) inibizione TPDasica percentuale.

I risultati sono riportati nella Tab. 5. Da questa risulta che dopo 30 generazioni non si ha una sensibile diminuzione della suscettibilità all'acido cloroacetico nei due ceppi, nè una variazione dei valori dell'attività TPDasica.

TABELLA 5. — Grado di sensibilità all'acido cloroacetico ed attività TPDasica degli estratti di ceppi di *M. domestica*, selezionati verso la stessa sostanza, a livello di varie generazioni.

Ceppi di <i>M. domestica</i>	Generazione	DL ₅₀ acido cloroacetico g/m ²	Attività TPDasica (valori arbitrari)
S-Roma	prima della selezione	1.25	12.6
»	F ₁	1.25	—
»	F ₁₀	1.50	—
»	F ₂₆	2.20	—
»	F ₂₇	1.50	12.3
R-Sardegna	prima della selezione	1.40	12.6
»	F ₁	1.40	—
»	F ₁₂	1.60	—
»	F ₂₆	1.10	—
»	F ₂₈	1.65	—
»	F ₂₉	3.35	—
»	F ₃₀	2.40	13.0

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'esame dei risultati ottenuti nel corso degli esperimenti sopra riportati e di quelli altrove pubblicati, conducono alle seguenti considerazioni.

L'attività TPDasica di estratti muscolari, nelle specie *M. domestica* e *P. americana*, risulta di egual grado, mentre è diverso il pH ottimale per la reazione enzimatica. Ceppi di *M. domestica* sensibili e resistenti agli insetticidi « clorurati » (intendendo per « clorurati » quegli insetticidi contenenti cloro nella loro molecola, rappresentati da: DDT ed analoghi, chlordan e analoghi, lindano) mostrano eguale grado di attività enzimatica dei loro estratti.

La tossicità delle sostanze alchilanti alogenate verso gli insetti sembrerebbe legata alla inibizione della TPD. A dimostrazione di ciò stanno i seguenti fatti:

1) L'attività TPDasica viene inibita sia in vitro che in vivo dagli acidi iodo- e cloroacetico.

2) La curva della inibizione enzimatica è parallela a quella della mortalità, per mosche poste a contatto di acido cloroacetico.

3) La paralisi in contrazione dei muscoli negli insetti in seguito ad intossicazione con gli alchilanti alogenati, è analoga a quella che si riscontra nei vertebrati.

Altra considerazione degna di rilievo è che, sia ceppi sensibili di *M. domestica* che ceppi già altamente resistenti verso i composti « clorurati », sono in egual misura suscettibili agli alchilanti alogenati. Il meccanismo di azione tossica dei « clorurati » sarebbe quindi sostanzialmente diverso da quello proprio alle sostanze alchilanti alogenate. Se così non fosse, i ceppi di *M. domestica* resistenti ai « clorurati » dovrebbero mostrare almeno un certo grado di resistenza anche verso gli alchilanti alogenati. Quindi è chiaro che il meccanismo della resistenza comune verso tutti i prodotti « clorurati », pur tanto differenti chimicamente fra di loro ma aventi tutti il cloro presente nella loro molecola, non si manifesta nei confronti degli alchilanti alogenati, neppure nel caso dell'acido cloroacetico.

Altro fatto emerso dagli esperimenti è che ceppi di *M. domestica* selezionati verso gli alchilanti alogenati non mostrano una sensibile diminuzione della loro suscettibilità verso tali sostanze, anche nel caso in cui la selezione sia effettuata per 30 generazioni nella maniera più idonea per ottenere il maggior grado di resistenza nel minor numero di genera-

zioni. (Nei ceppi così selezionati non risulta neanche aumentata la attività TPDasica).

DECKER e BRUCE ⁽¹⁹⁾ riportano invece che un ceppo sensibile, selezionato verso il chlordane, sviluppò in 30 generazioni un grado di resistenza espresso da una DL_{50} 6 volte maggiore dell'originale, mentre lo stesso ceppo selezionato verso il DDT raggiunse in 30 generazioni un grado di resistenza di 250 volte circa. (Per altri « clorurati » sono stati ottenuti valori intermedi).

Quanto sopra conferma che il meccanismo di azione degli alchilanti alogenati è sostanzialmente diverso da quello dei « clorurati ».

E' opportuno mettere in evidenza l'interesse che possono avere questi risultati ai fini di un impiego pratico di sostanze insetticide del tipo degli alchilanti alogenati. Una analogia nel senso della limitata tendenza a sviluppare un grado di resistenza, può essere fatta tra gli alchilanti alogenati e gli esteri fosforici. In ambedue i casi si tratta di inibitori specifici di enzimi di importanza vitale per l'organismo. Inoltre, ambedue le classi di sostanze non determinano, per selezione, un apprezzabile aumento di tolleranza. Difatti, per il parathion, sono state necessarie 60 generazioni per ottenere una resistenza di 6 volte ⁽²⁰⁾.

Che la TPD del tessuto muscolare degli organismi animali venga inibita dagli alchilanti alogenati, è cosa indubbia. Bisogna però ancora dimostrare, per gli insetti, se vi siano muscoli colpiti selettivamente, e fra questi, quali siano i muscoli di importanza vitale. Esperimenti in corso hanno dimostrato che l'inoculazione di 4 DL_{50} nella *P. americana* porta, innanzi tutto, ad un arresto dell'attività cardiaca e, solo dopo qualche ora, alla paralisi muscolare generale.

Si ringrazia il Prof. R. Milani per i preziosi suggerimenti a riguardo della selezione dei ceppi di *M. domestica*. La nostra riconoscenza va anche al tecnico Signor G. Pierdominici il quale ha assiduamente prestato la sua valida opera nel corso degli esperimenti.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Parassitologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BETTINI S. e BOCCACCI M. - Riv. Parass., 13: 163 (1951).
- (2) MICHAELIS L. e SCHUBERT M. P. - J. Biol. Chem., 106: 331 (1934).
- (3) BARRON G. - Advances in Enzymology, 11: 201 (1951).
- (4) MACKWORTH J. F. - Bioch. J., 42: 82 (1948).
- (5) RAPKINE L. - Bioch. J., 32: 1729 (1938).
- (6) LUNDSGAARD E. - Bioch. Zeit., 217: 162 (1930); ibid., 220: 1 (1930); ibid., 220: 8 (1930).

- (7) LOHMAN K. - *Bioch. Zeit.*, 271: 264 (1934).
 - (8) GODEAUX J. - *Physiol. Compar. et Oecol.*, 1: 352 (1948).
 - (9) SELIGMAN K. e RUTENBURG A. M. - *Science*, 113: 317 (1951).
 - (10) BETTINI S. e BOCCACCI M. - *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 17: 188 (1954).
 - (11) MEYERHOF O. e OHLMEYER P. - *Naturwissenschaften*, 24: 741 (1936).
 - (12) QUASTEL J. H. e WHEATLEY A. H. M. - *Bioch. J.*, 32: 936 (1938).
 - (13) DRABKIN D. L. e MEYERHOF O. - *J. Biol. Chem.*, 157: 571 (1945).
 - (14) CORI G. T., SLEIN M. W. e CORI C. F. - *J. Biol. Chem.*, 173: 605 (1948).
 - (15) BALDWIN E. e NEEDHAM D. M. - *J. Physiol.*, 80: 221 (1934).
 - (16) BRUNS F. - *Bioch. Zeit.*, 325: 156 (1954).
 - (17) LEDOUX L. - *Bioch. et Biophys. Acta*, 13: 121 (1954).
 - (18) KOCHER C. e ASCHER K. R. S. - *Riv. Parass.*, 13: 103 (1954).
 - (19) DECKER G. C. e BRUCE W. N. - *Conf. on Insect Physiol.*, Cincinnati, 26 (1952).
 - (20) MARCH R. B. - *Ibid.* 47 (1952).
-