

proteiche nello stesso senso mostrato dalla tionina, cioè la colorazione assunta, ad es., dalla mucina con ciascun colorante corrispondeva in prevalenza al colore della soluzione acquosa concentrata dello stesso colorante (che assorbe sempre nelle lunghezze d'onda più corte), mentre quella assunta dalle nucleoproteine era simile al colore della soluzione diluita (che assorbe nelle lunghezze d'onda più lunghe) (figg. 8, 9).

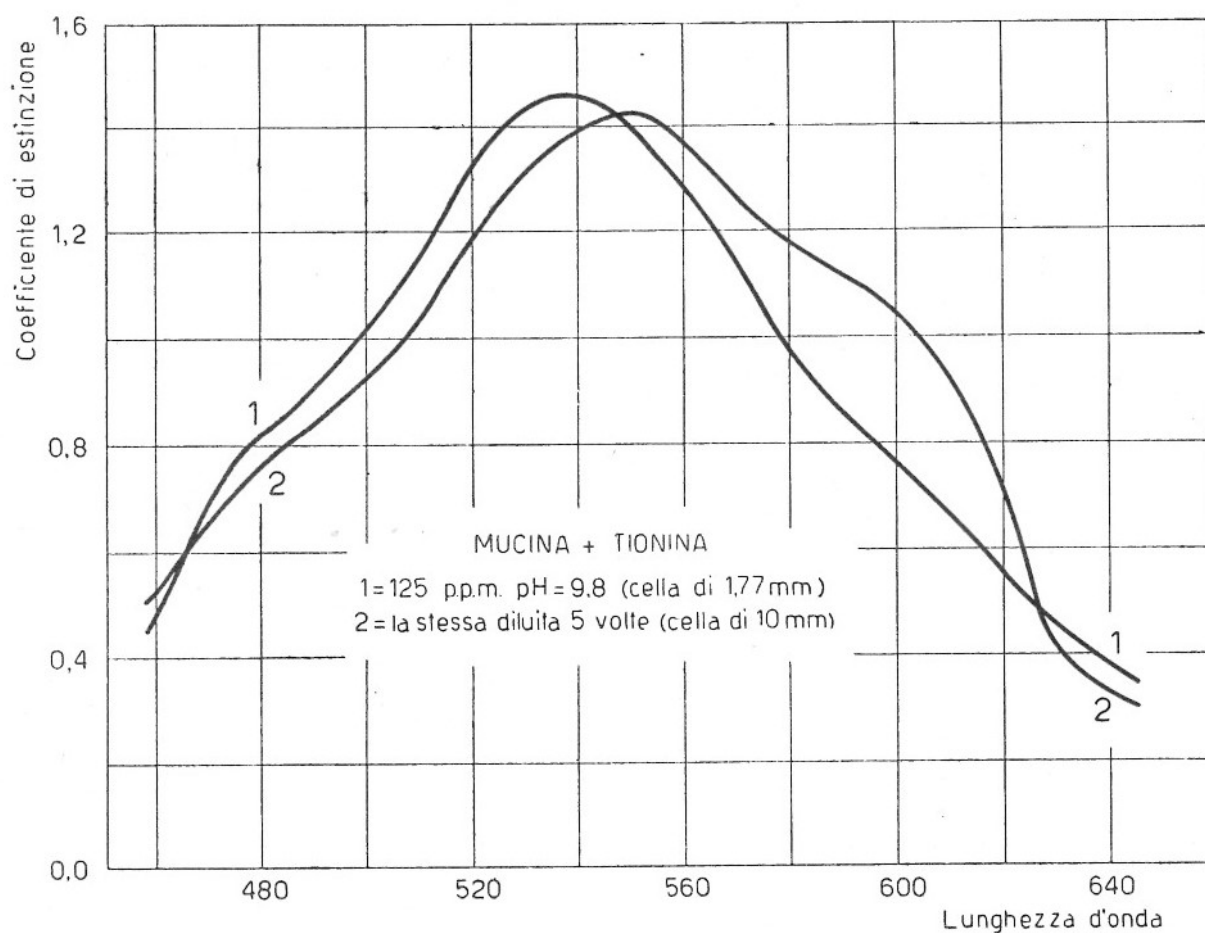


Fig. 8. - Effetto della mucina sullo spettro di assorbimento della tionina [da KELLEY e MILLER (³⁸)] (p.p.m. = parti di colore per 1 milione di parti di acqua).

I coloranti metacromatici in soluzione acquosa sono sempre ortocromatici in alcool, acetone, ac. acetico glaciale ecc. e seguono la legge di LAMBERT-BEER; ma vi sono sostanze, come la pararosanilina, che, pur non avendo dicromasia in soluzione acquosa, presentano, ma meno pronunciata, la colorazione differenziale delle proteine; gli AA. constatarono che, in tal caso, è la soluzione alcoolica del colore che presenta il noto spostamento dei massimi di assorbimento rispetto alla posizione assunta nella soluzione acquosa; questo vuol dire che dicroma-

sia e relativo spostamento non si manifestano per effetto della diluizione ma per effetto del solvente.

Gli altri coloranti che, come il verde di malachite, non presentano

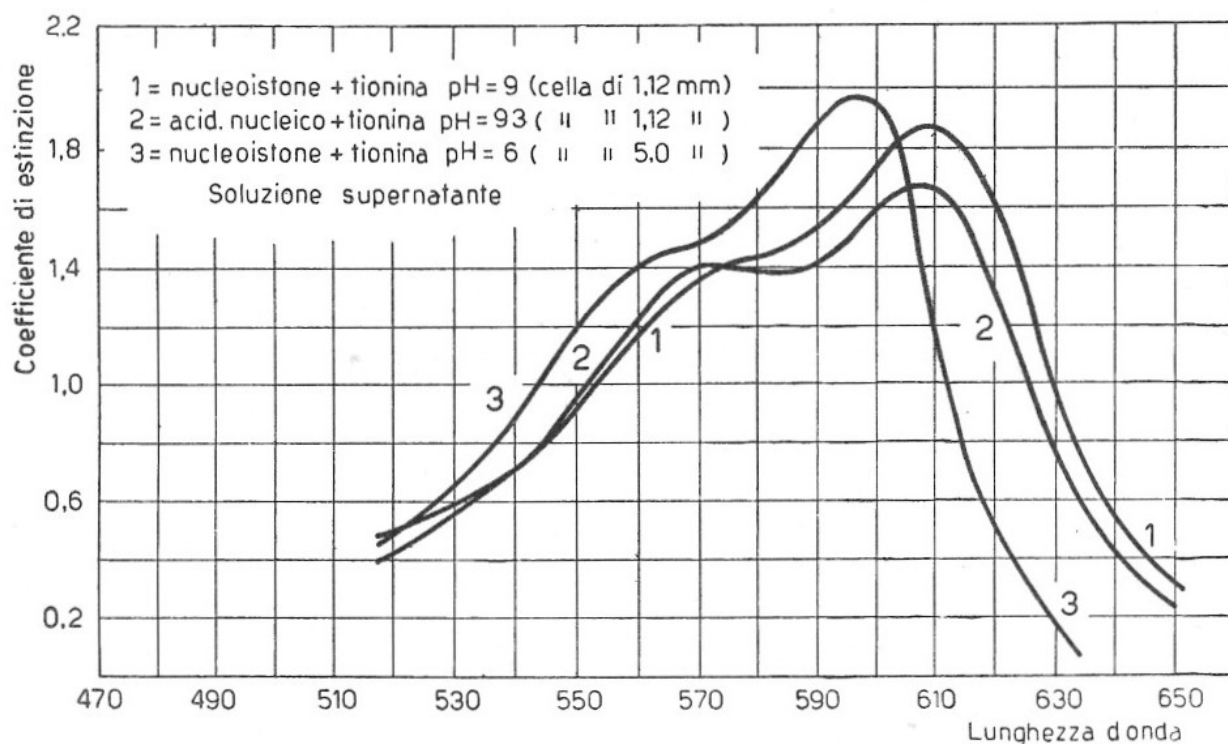


Fig. 9. - Effetto del nucleoside e dell'ac. nucleinico sulla tionina. [da KELLEY e MILLER (³⁸)].

mai questi spostamenti dei massimi, non danno neppure apprezzabili differenze di colorazione tra mucina e proteine nucleari.

Le soluzioni di tionina di concentrazione intermedia (1:800-1:40000), che, come si è detto, presentano due massimi di assorbimento più o meno spostati verso il bleu o il violetto in rapporto alla concentrazione, messe in presenza di mucina, spostano nettamente il massimo della curva verso la zona del violetto, mentre l'aggiunta di β -nucleoside sposta il colore verso il bleu ed il massimo della curva verso la zona del rosso dello spettro.

Variazioni analoghe si notano con tutte le sostanze coloranti che si comportano come la tionina in rapporto alla diluizione.

Nessun effetto sulla posizione dei massimi della curva di assorbimento si nota per variazioni del pH ad opera di HCl o per cambiamento dell'anione (è, infatti, indifferente che si adoperi cloruro o acetato), ecc.

KELLEY e MILLER trovano che, affinché si manifesti lo spostamento dei massimi di assorbimento con la diluizione, è indispensabile la pre-

senza di almeno un atomo di N sotto forma di $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, ecc. nel corpo della molecola e credono possibile che determinati cambiamenti del mezzo della soluzione colorata (diluizione, alcool, mucina, nucleoproteina) possano provocare o no cambiamenti dell'angolo formato dalle valenze del gruppo auxocromo.

Nel 1941 RABINOWITCH e EPSTEIN ⁽⁴¹⁾ riconfermano, in gran parte, i dati già noti. Determinando le curve di estinzione della tionina

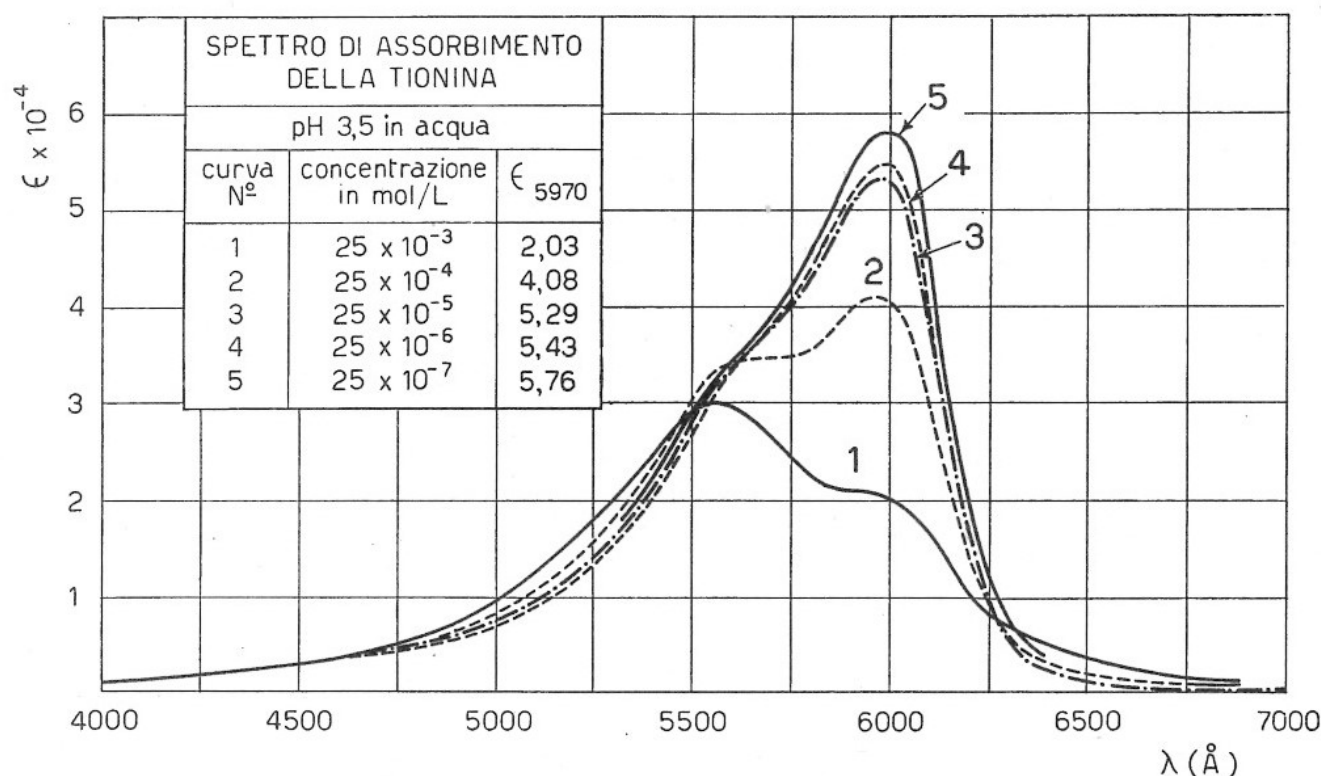


Fig. 10. - Estinzione molare di tionina. [da RABINOWITCH e EPSTEIN ⁽⁴¹⁾].

e del bleu di metilene, a differenti concentrazioni e temperature, in diversi solventi (acqua, etanolo, miscele etanolo-acqua ecc.) trovano che la tionina, già a concentrazione di 10^{-7} mol./litro, dà deviazione dalla legge di Beer, e che le soluzioni concentrate presentano una curva con un massimo a 557 mμ (D-Band), mentre le diluite hanno un massimo a 597 mμ (M-Band) (fig. 10).

Gli AA. pensano che lo spettro delle soluzioni di concentrazioni intermedie debba essere costituito dalla sovrapposizione delle due bande e che la deviazione dalla legge di BEER debba esser dovuta alla formazione di ioni dimeri Tio_2^{2+} , analogamente a quanto si manifesta, ad es., nell'equilibrio:



Essi dimostrano che si tratta effettivamente di una polimerizzazio-

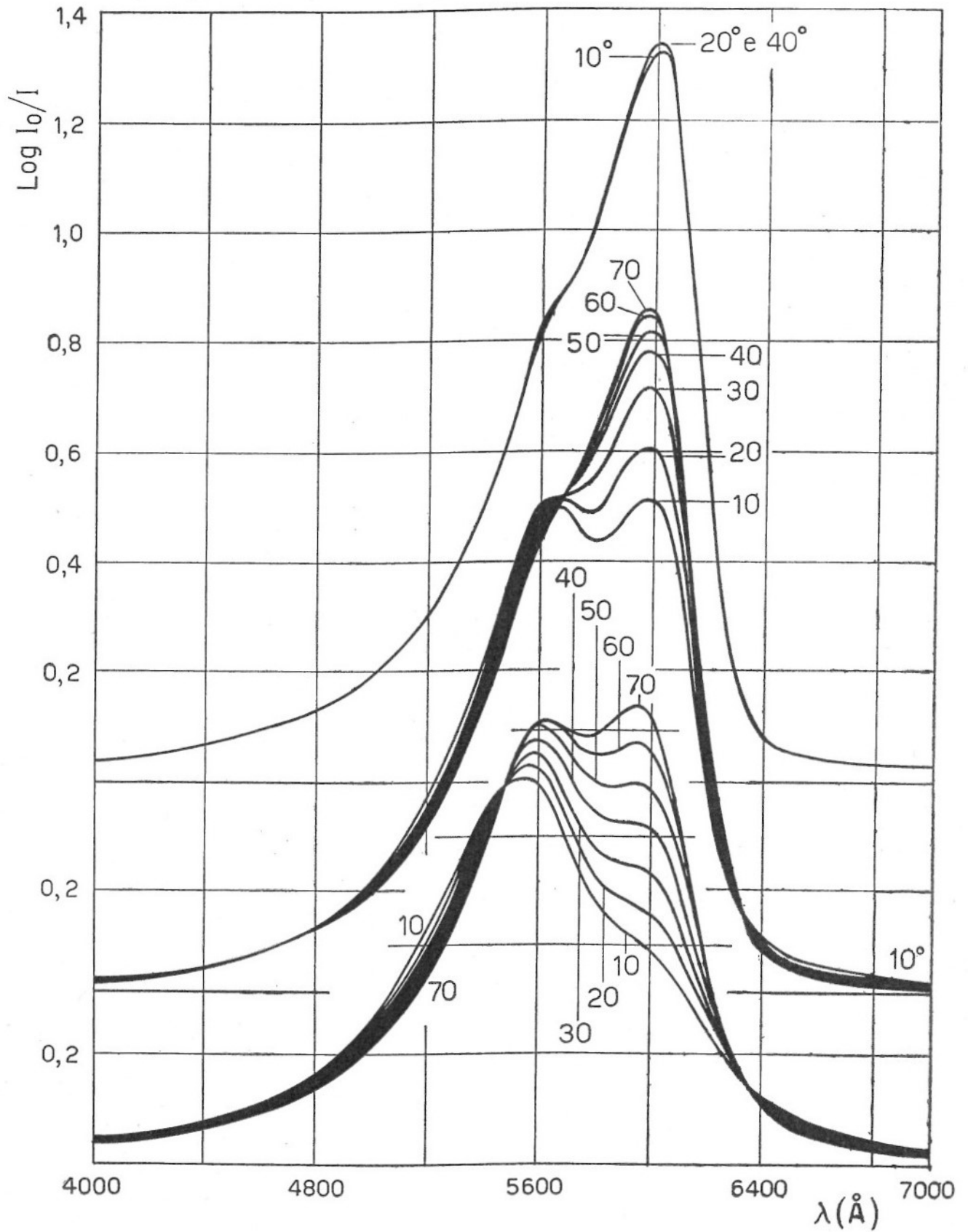


Fig. 11. - Effetti della temperatura sullo spettro di assorbimento della tionina per tre differenti concentrazioni. [da RABINOWITCH e EPSTEIN ⁽⁴¹⁾].

nei di cationi e non di associazione catione-anione, che l'aumento di temperatura ha una influenza sullo spettro di assorbimento simile a quella che apporta la diluizione (fig. 11) e ascrivono la banda M all'ione monomero Tio^+ e la banda D all'ione dimero Tio_2^{2+} .

Analogamente alla tionina si comporterebbe il bleu di metilene (fig. 12).

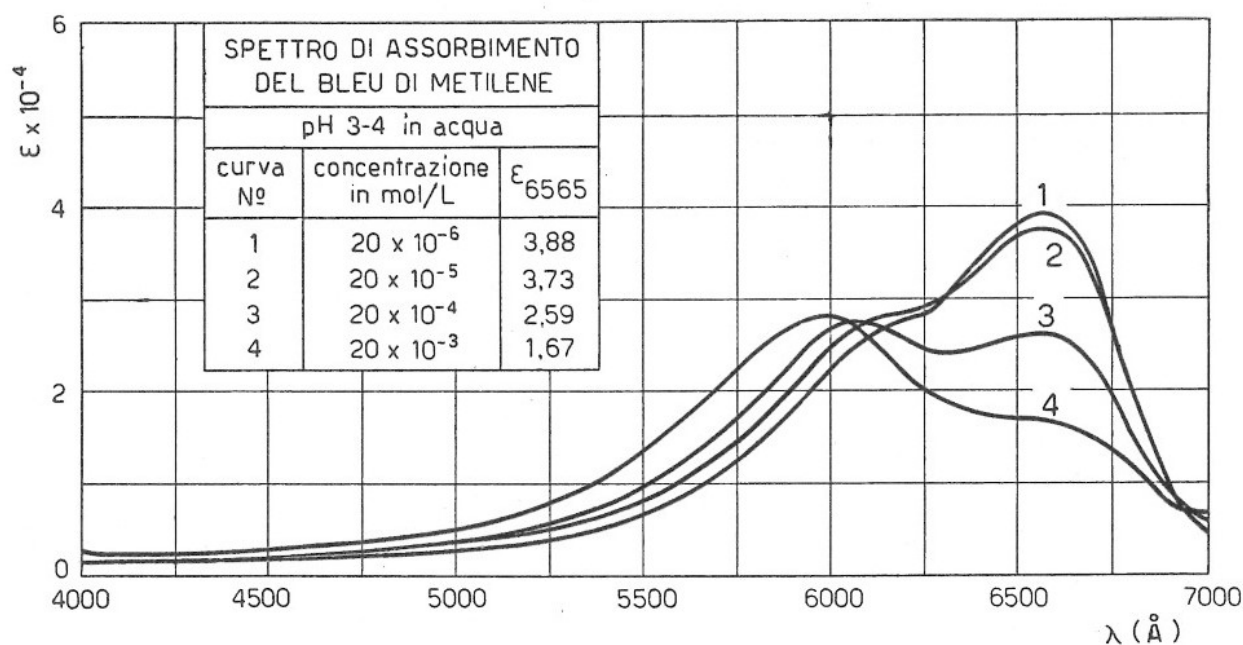


Fig. 12. - Estinzione molare del bleu di metilene. [da RABINOWITCH e EPSTEIN (⁴¹)].

La dimerizzazione, secondo gli AA. non avviene in etanolo puro, porta ad estinzione della fluorescenza del colorante, si manifesta in buon accordo con le altre proprietà della soluzione (potenziale di ossido-riduzione, conduttività, pressione osmotica ecc.) ed è ritenuta una proprietà generale delle sostanze coloranti organiche da interpretarsi sulla base della teoria di London per le forze intermolecolari (⁸³). La dimerizzazione richiede, in ogni caso, attivazione di energia per vincere le forze repulsive che si manifestano tra ioni di uguale segno.

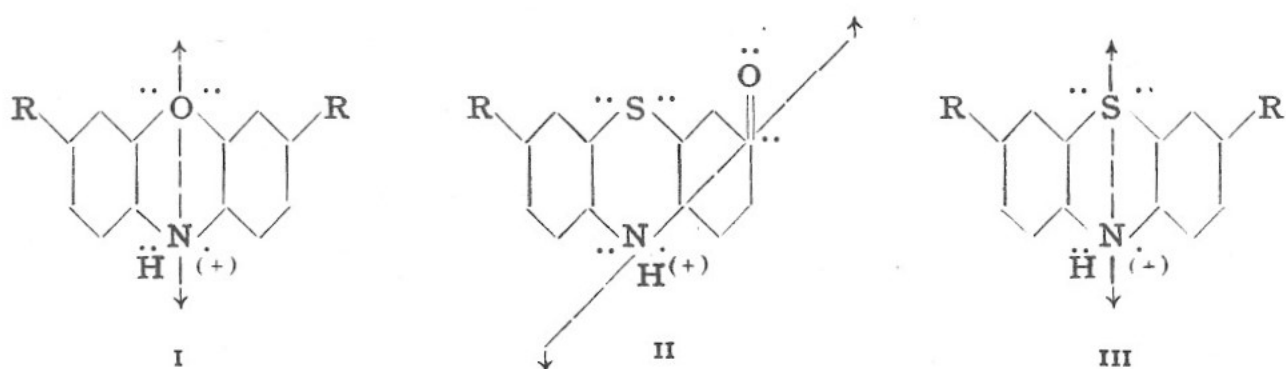
Lo studio degli spettri di assorbimento di tionina e leucotionina in soluzioni moderatamente acide, iniziato da KARUSH e RABINOWITCH nel 1941 (⁸⁴), mise in evidenza il fatto che non è possibile in condizioni normali individuare le bande corrispondenti alla semitionina e che la legge di BEER è soddisfatta solo per soluzioni che contengano la base libera e l'ione trivalente; con l'ione monovalente Tio^+ la legge non può essere seguita (anche per concentrazioni tanto basse quanto 10^{-6} mol./litro) a causa delle note capacità di dimerizzazione di questo stesso ione nelle soluzioni acide diluite.

MICHAELIS (⁴²) pensa che i coloranti metacromatici si trovino nella soluzione diluita e nei solventi non acquosi sotto forma monomera, a cui corrisponde la banda di assorbimento caratteristica (α); in soluzioni concentrate le molecole possono trovarsi sotto forma dimera (banda β) e, spesso, anche polimera (banda γ).

Questo nuovo concetto di formazione di polimeri colorati viene ulteriormente sviluppato in successivi lavori. Così, nel 1948 MICHAELIS e GRANICK (⁹³) si occupano di trovare le relazioni esistenti tra caratteristiche metacromatiche dei coloranti e natura intima del substrato che determina la metacromasia. Esaminando, ad es., lo spettro di una soluzione di tionina in agar ($1,93 \times 10^{-5}$ M in agar 1%) essi rilevano che, in tal caso, la banda di assorbimento, caratteristica del colore in soluzione acquosa alla stessa concentrazione, si presenta fortemente spostata verso le lunghezze d'onda più brevi, cioè la banda α , caratteristica delle forme monomere, è fortemente depressa (con taluni colori può anche scomparire), mentre la banda metacromatica, caratteristica delle associazioni polimeriche, si presenta esaltata nelle dimensioni e fortemente spostata verso il violetto, più della banda β , caratteristica delle aggregazioni dimere. Se al colore si aggiunge, invece, acido nucleico lo spettro di assorbimento rimane all'incirca quello delle soluzioni diluite e la curva di assorbimento molare del colore è indipendente dalla concentrazione del colore stesso, cioè obbedisce alla legge di BEER, in contrasto con quanto avviene per le soluzioni acquose. Gli AA. attribuiscono tale comportamento, che in entrambi i casi si manifesta a pH costante di 4,67, al fatto che l'agar determinerebbe dapprima un'aggregazione del colore e adsorbirebbe poi tali aggregati per formare più importanti complessi molecolari. Con acido nucleico tale polimerizzazione non potrebbe aver luogo e gli AA. presumono che in tal caso si debba soltanto avere la formazione, in rapporto stechiometrico, dei composti a tipo salino tra i radicali dell'acido nucleico e il catione colorato. Tuttavia, il quadro spettrofotometrico di una sostanza colorante non è soltanto stabilito dal substrato perchè è stato visto che la sostituzione dell'atomo di S delle tiazine (tionina) con un atomo di O distrugge in parte nelle ossazine (ossonina) le proprietà di dimerizzazione e polimerizzazione del colore, per cui è discussa dagli AA. la validità della teoria che tende a correlare la proprietà di polimerizzazione dei coloranti con la loro stessa struttura chimica.

Le variazioni del tipo spettrale presentato dai radicali liberi di ossazine, tiazine e selenazine sono in relazione con la costituzione chimica del radicale stesso (⁹⁸) e, in particolare, con un diverso tipo di oscillatore cui ciascun radicale dà luogo e che è il vero fattore determinante dello

spettro, analogamente a quanto è stato studiato per altri colori, ad es. i colori flavinici che pure intervengono nel meccanismo delle ossidazioni enzimatiche. Poichè ogni oscillatore ha sempre un estremo formato dal ponte azotato cui si lega il protone, mentre l'altro estremo è o un atomo di ossigeno (o del nucleo o di una catena laterale) o, se questo non c'è, un atomo di S o di Se, si avrebbero i seguenti tre tipi di oscillatori, di cui il III è quello caratteristico delle tiazine. All'esame spettrofotometrico esso produce uno spettro unico, con complicate bande di assorbimento tutte comprese tra 4200 e 5300 Å.



In contrasto alle teorie di MICHAELIS e coll. sono le interpretazioni di LEVINE ed altri ⁽¹⁰⁹⁾, perchè la presenza di minimi di estinzione nella curva di assorbimento di soluzioni coloranti tiaziniche suggerisce loro la possibilità che molto deboli legami debbano formarsi tra cationi del colore e polianioni cromotropi. Essi sono più propensi ad ammettere l'esistenza di fenomeni di assorbimento del tipo manifestato dalle sostanze colloidali, che si estrinsecherebbero tra cationi colorati e molecole di adsorbente ad alta densità anionica. Se il colore è tale che i suoi livelli di energia possono essere facilmente influenzati da campi elettrici esterni, allora l'adsorbimento apporta differenze nei livelli energetici e modifiche nella posizione delle bande.

KOZUMI e coll. ⁽¹¹⁰⁾ respingono il presupposto di LEVINE perchè dalle esperienze riportate con rodanina G, bleu di metilene, tionina ecc. debbono, piuttosto, dedurre che l'adsorbente, in questo caso polivinilsolfato di potassio, si limiti a fissare la forma monomera, aumentando, così, la concentrazione del dimero nel sistema. Lo spostamento dell'equilibrio monomero-dimero sarebbe legato allo stato elettronico dell'ione colorato monomero, il solo influenzabile in questo fenomeno, che si manifesterebbe, perciò, senza cambiamenti nella forma di aggregazione del colore.

L'aggiunzione di ribonucleasi ad un sistema formato dal colore basico (tionina, bleu di metilene, pironina, ecc.) e acido ribonucleico, determina variazioni nello spettro di assorbimento della tionina che sono

proporzionali alla concentrazione dell'enzima, la cui attività, ottimale a pH 7,5, si annulla a pH 4. SHUGAR (¹¹⁹) ne deduce che la quota d'idrolisi enzimatica dell'acido ribonucleico è indipendente dalla presenza del colore, per cui altri gruppi, diversi da quelli fosfato, devono essere coinvolti nei legami formati tra colore basico e radicale dell'acido nucleico. Valori quantitativi, che regolano gli incrementi dell'intensità metacromatica di colori come la tionina, sono forniti da FURASAWA (¹²⁰).

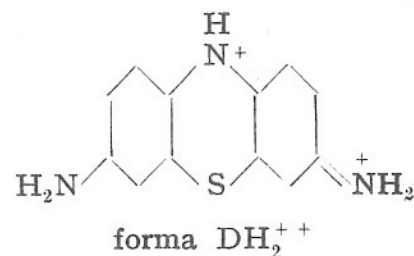
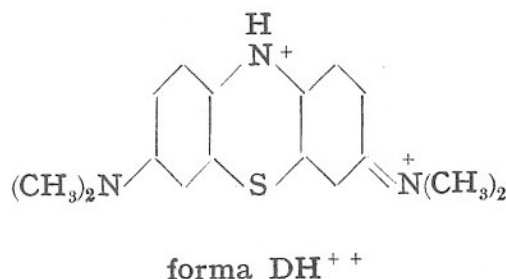
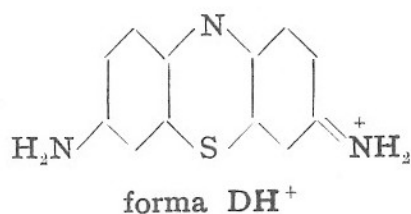
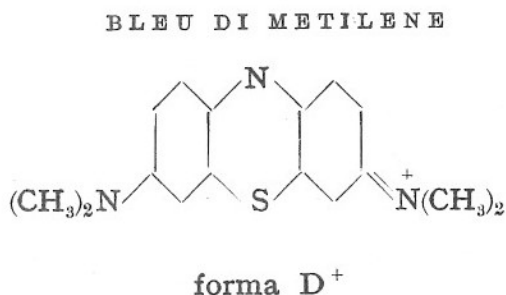
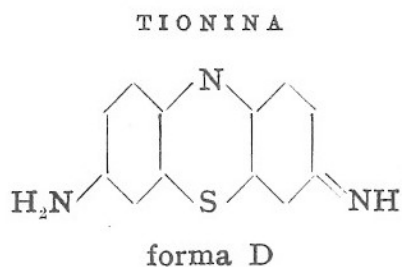
Una nuova recentissima interpretazione delle caratteristiche spettrofotometriche presentate dai colori metacromatici si basa sulle variazioni degli spettri di assorbimento in funzione delle variazioni dei livelli energetici delle molecole.

KUHN (¹⁰⁵) aveva dimostrato che, estendendo a talune sostanze organiche coloranti la teoria del modello metallico di SOMMERFELD, si potevano dedurre formule abbastanza esatte per calcolare tali livelli, relativamente al massimo della principale banda di assorbimento nel visibile. La teoria del modello metallico prevede che a livello di una catena di doppi legami coniugati posseduti da sostanze coloranti polimetiniche, gli elettroni d'insaturazione o π elettroni, si muovano, come nei metalli, lungo la catena medesima. Questi elettroni, due per ciascun doppio legame, sono considerati come un gas elettronico unidimensionale, libero; in condizioni normali essi elettroni sono stabilmente attirati lungo la catena polimetinica, perchè contenuti in un campo di energia potenziale uniforme, la cui lunghezza è approssimativamente quella del sistema coniugato, gli altri due parametri essendo praticamente trascurabili e senza effetto sulle proprietà ottiche. In condizioni normali, quindi, i livelli di energia dei gas elettronici sono stabilissimi e distribuiti per mezzo dei due elettroni secondo il principio di PAULING, mentre i rimanenti livelli sono vuoti. La comparsa della banda principale nello spettro di assorbimento della sostanza colorata è collegata al salto di un elettrone π dal livello di energia massima, occupata allo stato normale, al più vicino e più alto livello vuoto connesso. KUHN trova anche la formula per calcolare, dalla lunghezza d'onda corrispondente al massimo della principale banda di assorbimento, la lunghezza d'onda delle altre eventuali bande.

NIKITINE (¹⁰³), interpretando al lume di questa teoria gli spettri di assorbimento di varie classi di coloranti polimetinici (mentre KUHN si era occupato di riscontrare la validità della sua teoria su cianine simmetriche, porfirine, ecc.), trova che in questo caso le proprietà ottiche sono particolarmente legate ai doppietti liberi dell'atomo di azoto, che non formando legami, entrano a far parte del gas elettronico. Calcolando i vari livelli di energia E_K , egli trova che i livelli quantici degli elettroni

metallici sono, in prima approssimazione, gli stessi in tutte le forme del colorante, ma, col variare dell'acidità del mezzo ambiente e quindi della forma ionizzata, varia il numero di elettroni metallici che occupano due a due questi livelli.

Per es., ammettendo le seguenti forme tautomeriche per la tionina ed il bleu di metilene



si trova che l'ione monovalente F⁺ (corrispondente a DH⁺ per la tionina e D⁺ per il bleu di metilene) implica la presenza di 14 elettroni distribuiti in 7 livelli energetici. In un mezzo più acido, dove i due coloranti passano a formare l'ione bivalente F²⁺, ottenuto per fissazione di un protone H⁺, due elettroni del livello inferiore del gas elettronico sono fissati per localizzare il protone, per cui il gas elettronico verrà ora a constare di 12 elettroni.

In seguito a questo, le transazioni ottiche che corrispondono al passaggio di un elettrone da un livello occupato da 2 elettroni ad un livello libero non sono più le stesse nelle due forme e gli spettri, cui esse danno luogo, variano.

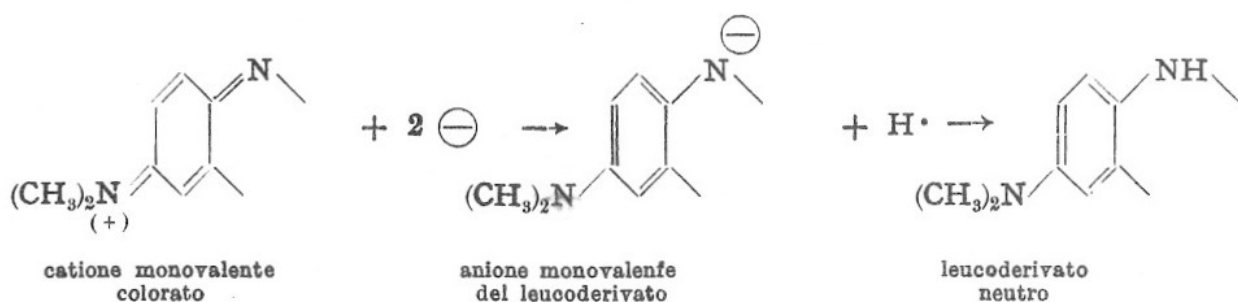
La decolorazione dell'indicatore col variare del pH è attribuita a cessazione di risonanza metallica.

Era stato visto, come abbiamo accennato prima, che la banda di

assorbimento diminuisce in intensità col variare del pH dalla regione acida a quella alcalina. Questo effetto, detto ipocromico, si può accompagnare all'effetto descritto di spostamento della banda verso lunghezze d'onda più brevi (effetto ipsocromico). WOISLAWSKI ⁽¹²³⁾ riscontra questi effetti tanto a forte alcalinità che a forte acidità. Calcolando la posizione delle bande di assorbimento e la loro intensità secondo le formule riportate e discusse, NIKITINE trova buon accordo, in genere, tra esperienza e teoria per le varie forme ionizzate dei coloranti in relazione dell'acidità del mezzo. L'accordo si presenta ottimo, ad es., per il bleu di metilene, ma lo è meno per la tionina, per la quale, invece, pare che l'applicazione pratica del modello metallico si complichino, e richieda, per la sua intellegibilità, l'ammissione della formazione di ponti di H con altre molecole identiche o con il solvente.

La teoria può, perciò, spiegare come talune sostanze coloranti non debbano variare il loro colore col modico variare del pH (entro i limiti, cioè, in cui sussiste una stessa forma), ma non spiega ad es. lo spostamento di talune bande di assorbimento verso il rosso col diminuire dell'acidità della soluzione.

MEYER e TREADWELL ⁽¹²²⁾ determinano il potenziale di ossido-riduzione di taluni polioossiantrachinoni e di sostanze coloranti in funzione dell'esatta e determinata acidità della soluzione, dal campo di acido forte a quello alcalino. Per le azine e sostanze coloranti affini essi riconoscono l'esistenza della forma ossidata sotto forma di catione monovalente, mentre la forma ridotta primaria è un anione monovalente, che, per costruzione di un ione idrossonio, si trasforma direttamente nel leucoderivato neutro, secondo la formula:



L'esattezza di una tale formulazione è sostenuta dai dati sperimentali, perchè sia per la tionina che per il bleu di metilene, i valori d'indice di potenziale trovati non oltrepassano mai il valore di 14 mV, come è caratteristico per le formazioni semichinoniche. Secondo MEYER e TREADWELL, quindi, non esistono forme di riduzione intermedia nelle soluzioni di questi colori, per cui cadono ipotesi e deduzioni da altri AA. così validamente sostenute per il passato.

Studiando la curva della funzione $\epsilon_0 = f(\text{pH})$ essi trovano per la tionina due soli punti di flessione, uno a pH 4,92 che corrisponde alla sistemazione di un ione H nel corrispondente aminogruppo del leucoderivato, ed uno a pH 11,22 che corrisponde alla sistemazione di un ione H nel gruppo aminico della sostanza colorata. Analogo comportamento riscontrano, in particolare, per il bleu di metilene.

Poichè le azine hanno la carica cationica situata nel ponte azotato, i loro spettri di assorbimento nel visibile sono influenzati in modo caratteristico. Basandosi sulla teoria di KUHN, anch'essi confermano che le variazioni di acidità di un campo intermedio di pH non portano nessun percettibile spostamento del massimo di assorbimento che si ha attorno a 6000 Å; in un campo fortemente acido il collocamento di un protone nel ponte di azoto aumenta la polarità della molecola e, quindi, determina uno spostamento del massimo di assorbimento di ca. 700 Å verso le lunghezze d'onda più lunghe, per un allungamento della catena da n a $n+1$ elementi. La formazione di questo nuovo massimo è congiunta con la diminuzione del precedente massimo, come teoricamente si deduce anche dalla teoria di KUHN sui modelli metallici.

E' ovvio che il semplice fatto di attribuire alla molecola la possibilità di formare polimeri in funzione della concentrazione, non può da solo esaurire il problema perchè questo fenomeno si manifesta con larghezza in molti altri composti senza provocare necessariamente variazioni metacromatiche.

In merito allo spostamento dei massimi della curva di assorbimento, che LISON (³⁹) chiama «viraggio metacromatico», non è possibile stabilire rapporti quantitativi, per quanto sia certo che il viraggio è influenzato, oltre che dalla concentrazione dei due corpi presenti, cioè colore e sostanza che determina il viraggio, anche dalla temperatura, dalla presenza di elettroliti o di non elettroliti ecc.

LISON nel 1948 (⁴³) dimostrò che le sostanze capaci di provocare il viraggio metacromatico di soluzioni pure di tionina sono i polisaccaridi macromolecolari che hanno una funzione acida (cioè composti del tipo $\text{R-OSO}_3\text{H}$) e i loro sali (ac. condroitin-solforico, ecc. mucoitinsolforico, agar e parecchi gelosi estratti dalle alghe ecc.), cui seguono, ma con proprietà meno accentuate, i polisaccaridi macromolecolari la cui funzione acida è rappresentata da un carbossile (ac. galatturonico, ac. glucuronico, ac. ialuronico ecc.).

La proprietà metacromatica è fortemente legata al radicale acido e l'idrolisi del radicale $\text{—OSO}_3\text{H}$ sopprime tale proprietà, che, più propriamente, per LISON consiste in un progressivo abbassamento del mas-

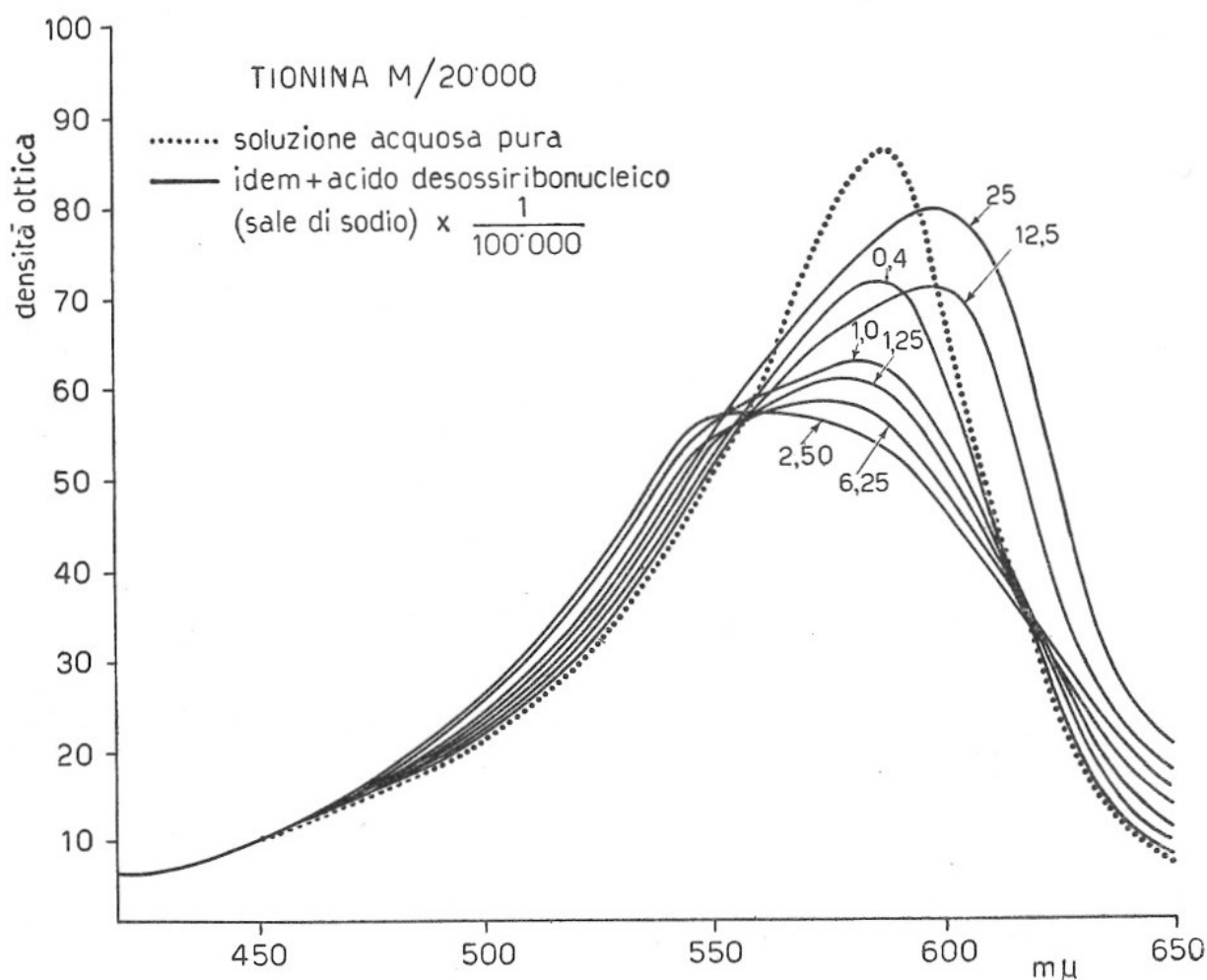


Fig. 13. - Metacromasia degli acidi nucleici. Cambiamento dello spettro della tionina provocato dall'introduzione di quantità crescenti di acido nucleico. Tra 0 e $2,5 \times 10^{-5}$ di acido nucleico si ha metacromasia positiva, ossia abbassamento progressivo dell'apice della curva corrispondente al colore ortocromatico del colorante e comparsa di bande verso le lunghezze d'onda più corte. Per quantità superiori di acido nucleico la metacromasia diviene negativa: scomparsa progressiva delle bande di metacromasia positiva e comparsa di nuove bande nelle lunghezze d'onda più lunghe della banda ortocromatica. [da LISON (⁴³)].

simo della curva e comparsa di bande spostate verso le lunghezze d'onda più corte (figg. 13 e 14).

Comportamento fortemente caratteristico avrebbero gli acidi nucleici (ac. desossiribonucleinico e ac. ribonucleinico) che, aggiunti ad una soluzione di tionina, producono, se in quantità scarse, ma crescenti, un viraggio metacromatico normale a sua volta progressivamente crescente. Aumentando, però, oltre un certo livello la quantità degli acidi si verifica un'inversione, cioè si passa ad una metacromasia negativa, con progressivo rinnalzamento dei massimi e spostamento verso le lunghezze d'onda più lunghe della banda ortocromatica.

MICHAELIS ed altri pensano che sia determinante il carattere di colloidi a forte carica elettro-negativa, sia perchè tutte le sostanze che

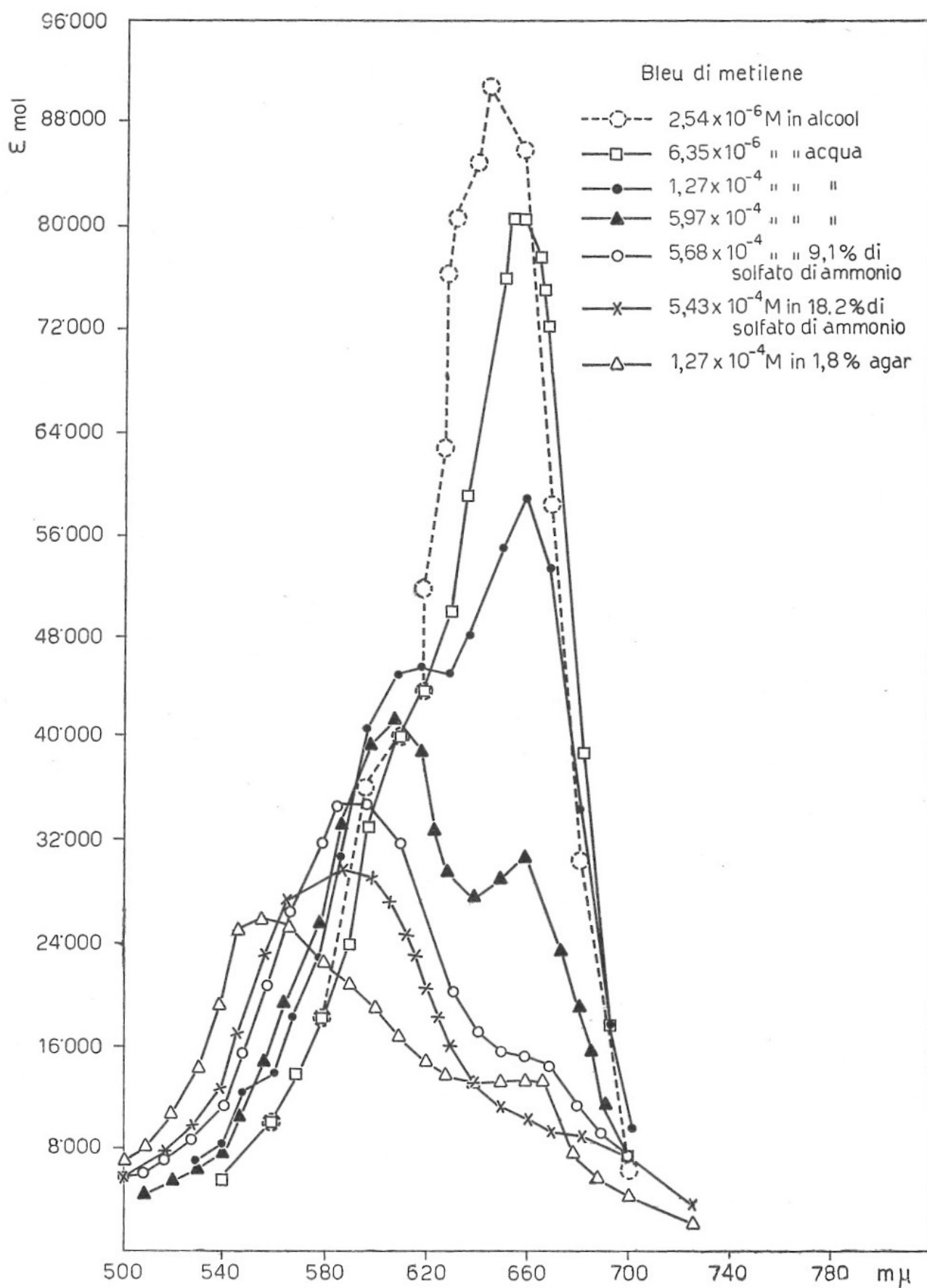


Fig. 14. - Cambiamento dello spettro di assorbimento del bleu di metilene: in alcool la curva presenta uno spettro ortocromatico; le successive curve in acqua dimostrano che, con l'aumentare della concentrazione, lo spettro ortocromatico si abbassa progressivamente e compaiono nuove bande a lunghezza d'onda più corta. L'ultima curva illustra che, per addizione di una sostanza ad effetto metacromatico, gli effetti notati nelle precedenti curve in acqua risultano esaltati [da LISON (⁴³)].

danno viraggio metacromatico hanno un evidente carattere acido, sia perchè la eliminazione del radicale acido o la sua neutralizzazione sopprime la metacromasia. Tuttavia, questa non può essere un'interpretazione esauriente perchè molti colloidi a carica elettronegativa non hanno mai mostrato proprietà metacromatiche.

* * *

Nonostante il risultato di queste ricerche, che avevano anche messo in luce nei coloranti proprietà diverse da quelle caratteristiche dei sistemi ossido-riduttivi, proprietà che riguardano l'integrità funzionale dei più preziosi costituenti cellulari, già nel 1935 una piuttosto numerosa schiera di sanitari, in gran prevalenza appartenenti alla scuola tedesca, iniziò la comunicazione dei primi risultati ottenuti con la « applicazione terapeutica » della tionina.

I presupposti scientifici sui quali si basava la preferenza di tale sostanza come medicamento nei casi di grave intossicazione generale dell'organismo per asfissia, erano in sintesi:

1) il più alto potenziale di ossido-riduzione della tionina.

CLARCK e coll. (²¹) avevano trovato che la tionina ha un potenziale di ossido-riduzione di circa 50 millivolt superiore a quella del bleu di metilene (a pH 7,0 i potenziali trovati erano, rispettivamente, di +61 e +11 millivolt); perciò, secondo GROSCURTH e HAVEMANN (⁴⁵), KEMKES (⁴⁶), VON VELDEN (⁴⁷) ecc. la tionina deve perfezionare, in confronto al bleu di metilene, l'approvvigionamento dell'ossigeno del territorio endocellulare. Tale presupposto, secondo gli AA. trova conferma nel fatto che dei due coloranti solo il bleu di metilene è eliminato attraverso il rene nella forma ossidata, per la sua più facile reversibilità nei vari territori cellulari; la tionina, al contrario, a causa del suo più alto potenziale, si ritrova, nelle urine, tutta allo stato di leucoderivato.

Questa concezione è divenuta, in seguito, la base di un sistema di cura per casi particolarmente gravi e si basa sul presupposto:

a) che l'ossidazione di taluni prodotti del ricambio intermedio da parte della tionina non disturba, nel sano come nell'individuo ammalato, i processi di sintesi che l'organismo deve compiere;

b) che la tionina, come il bleu di metilene, inserendosi indifferentemente in un territorio enzimatico normale o danneggiato, lo fa in ogni caso con esito ottimale e che, se vi sono variazioni, queste non sono comunque causa di danni apprezzabili nell'ambito dello stretto territo-

rio di azione e neppure di manifestazioni collaterali, per un'eventuale influenza esercitata, sia pure a distanza, su altri sistemi.

2) i risultati delle prove biologiche in vitro.

Queste prove si limitano, in vero, a quelle eseguite da GROSCURTH e HAVEMANN, i quali, ripetendo le già note ricerche sull'effetto dei coloranti in un sistema contenente emoglobina (eritrociti), riconfermano che la respirazione, inibita dai prodotti della glicolisi, si ripristina ugualmente bene tanto con la tionina che con il bleu di metilene.

La velocità di respirazione del sistema raggiunge i valori primitivi e li mantiene sino ad esaurimento del glucosio; le due curve hanno lo stesso andamento e gli AA. lo attribuiscono al fatto che il potenziale di ossido-riduzione del glucosio si trova molto al di sotto del potenziale di entrambi le sostanze coloranti, perciò all'eliminazione dell'inibizione respiratoria causata dai prodotti della glicolisi basterebbe già il potenziale del bleu di metilene. Studiando successivamente un sistema privo di emoglobina (trombociti) perchè più vicino col suo metabolismo a quello delle cellule degli altri tessuti, trovano, invece, un consumo di ossigeno più elevato da parte della tionina. La diversità di comportamento dei due coloranti viene fatta risalire alla proprietà del bleu di metilene di trasformare (come unica eccezione) il 21% di emoglobina in metemoglobina, ma questo viene anche ad essere in contrasto con quanto HARROP e BARRON credono di aver definitivamente riscontrato.

GROSCURTH e HAVEMANN sostengono che dal punto di vista terapeutico la Katalisina favorisce l'eliminazione dell'ossido di carbonio dal sangue e ne spiegano il meccanismo ammettendo che in questo tipo di avvelenamento la lesione ad esito catastrofico non è tanto rappresentata dal blocco dei legami ossigenati del « trasportatore » di ossigeno, quanto nella sopravveniente paralisi della respirazione interna. La Katalisina, ravvivando il processo di ossidazione endocellulare senza essere influenzata dall'ossido di carbonio, aumenterebbe nel sangue il deficiente contenuto di CO_2 , con la conseguenza che i centri respiratori, nuovamente stimolati, possono intervenire per accelerare la ventilazione e, di conseguenza, la eliminazione del gas tossico.

Essi non arrivano, però, a dare la dimostrazione scientifica di quanto presuppongono, perchè il coniglio, animale sul quale sperimentano, sopporta bene avvelenamenti che producono sino al 70% di carbossiemoglobina, ma quantitativi di poco più alti producono immediatamente coma e morte negli animali.

Tuttavia, una certa conferma delle loro supposizioni sembrano averla da HERBRAND e JAEGER (⁴⁸).

KIESE ⁽¹⁰⁰⁾ nel 1947 conferma ancora questi dati e trova che talune ossazioni e tiazine, tra le quali tionina e bleu di metilene, accelerano in eritrociti intatti di cane la riduzione della metemoglobina da parte del glucosio e tale accelerazione risulta più spiccata in vivo che in vitro, senza essere influenzata dall'acido ascorbico. La tionina ossiderebbe in vitro l'emoglobina libera a metemoglobina in presenza di ossigeno.

3) i risultati delle prove sperimentali in vivo:

a) su coniglio, cane, gatto e cavie.

Già sin dal 1922 C. HEYMANS prima ⁽⁴⁹⁾ e H. F. HEYMANS, in seguito ⁽⁵⁰⁾, avevano osservato che la tionina, somministrata endovena a cani normali nel rapporto di g 0,05/kg. di peso è, come il bleu di metilene, un forte ipertermizzante. L'elevazione della temperatura (di circa 6° C in 3 ore) è accompagnata da ipersecrezione salivare più marcata di quella prodotta dal bleu di metilene, persistente sino alla morte dell'animale e, comunque, non provocata da esaltazione dell'attività muscolare.

Al contrario del bleu di metilene, la tionina può determinare un rallentamento cardiaco passeggero (seguito da accelerazione ipertemica cui fa seguito la consueta modificazione della respirazione) ed un'azione stimolante diretta del metabolismo cellulare, che assume il significato di una risposta difensiva dell'organismo ad un'azione tossico-simile. Analoga ipertermia con aumento del consumo di ossigeno osserva Van EULER ⁽⁵¹⁾, ad opera specialmente del bleu di metilene e della tionina, sulla zampa isolata e perfusa di cane. Con l'aumento considerevole del metabolismo cellulare l'A. rileva anche una notevole vasodilatazione, mentre altri coloranti (bleu di toluidina, verde Bindschedler e verde malachite) provocano intensa vasocostrizione.

Poichè i fenomeni della termoregolazione sono dipendenti dal sistema neurovegetativo e da quello endocrino, COSTANZO nel 1947 ⁽⁵²⁾ riprende l'importante problema della correlazione tra tionina e reattività termica e trova che il colorante deprime il sistema neurovegetativo dell'ortosimpatico e della relativa sfera endocrina, perchè sopprime la ipertermia iniziale da perfrigerazione, abbassa il livello cui giunge nella cavità normale l'ipertermia, aumenta la reazione ipotermica secondaria e ritarda notevolmente il ripristino della temperatura ai valori iniziali.

Dosi 10-12 volte superiori alla dose terapeutica giornaliera (che è di 5-10 cm³ di Katalisina e.v.) sono da GROSCURTH e HAVEMANN considerate « favorevoli », nel senso che non provocano la morte, per lo meno immediata; essi devono, però, riscontrare più o meno leggeri abbassamenti della pressione sanguigna nel coniglio e nel gatto, depressione di varia

entità della curva respiratoria ecc. In un gatto fu anche notato, con l'abbassarsi della pressione sanguigna, un temporaneo arresto del battito cardiaco e la pressione rimase in seguito sempre al di sotto del livello normale.

INGRAHM e VISSCHER ⁽¹¹²⁾ avevano osservato nel 1935 che, se nel cane s'iniettano e.v. determinate concentrazioni di sostanze colorate basiche o acide, si ha una costante selezione nella eliminazione dei colori, nel senso che nel succo gastrico compaiono solamente i colori il cui gruppo cromogeno fa parte dell'ione elettropositivo (colori basici) e nel succo pancreatico soltanto quelli il cui gruppo cromogeno è compreso nell'ione elettronegativo (colori acidi). WOISLAWSKI ⁽¹¹¹⁾, più recentemente, pensò ad una possibile relazione tra costanti d'ionizzazione dei colori (compresi nel gruppo degli azo-composti, azine, xanteni, ossazine e tiazine) e selettività della secrezione, ma, in pratica, pur trovando buon accordo di valori tra i vari metodi di apprezzamento di tali costanti, non riesce a stabilire una relazione possibile tra secrezione del colore in un sistema biologico e costante d'ionizzazione in soluzioni acquose o alcooliche. Successivamente ⁽¹²³⁾ lo stesso AA. deve riconoscere la grande variabilità di questi valori in relazione al metodo, al mezzo, all'ordine di basicità delle sostanze colorate ecc., contrariamente a quanto altri avevano affermato circa la costanza dell'ordine di basicità di una serie in mezzi differenti.

b) nell'uomo

Nell'uomo sano la dose terapeutica è dichiarata pressochè inefficace sulla pressione (dove possono manifestarsi, però, cadute di ca 5 mm.), sulla frequenza del polso, sull'andamento dell'elettrocardiogramma; tuttavia, si verificano spesso depressioni della respirazione per la durata di ca. 2 minuti e collassi cardiaci passeggeri seguiti da aritmia.

KEMKES insiste nel mettere in rilievo che la « dose compatibile senza qualche danno » è 10-12 volte più alta della dose terapeutica usata e che negli animali la tionina è tollerata in quantitativi che sarebbero senza dubbio mortali se usati per il bleu di metilene.

Gli accertamenti clinici, eseguiti per stabilire una tale « compatibilità » di dosi, si limitano alla misura della pressione, alla registrazione dell'elettrocardiogramma e alla ricerca dell'albumina nelle urine o di sangue nel sedimento; essi sono, però, ritenuti dagli AA. sufficienti per dichiarare che « la Katalisina interviene a perfezionare il ricambio endocellulare senza indurre permanenti alterazioni strutturali dei normali tessuti e peggioramenti di quelli già compromessi per avvelenamento o per asfissia ».

Partendo dalla considerazione che la narcosi eterea apporta acidosi nel sangue (simile a quella provocata dal coma diabetico), con iperlattidemia come indizio del disturbato ricambio ossidativo cellulare, KEMKES ricerca le variazioni indotte dalla somministrazione di Katalisina alla fine della narcosi e trova che questa sostanza riporta la percentuale di acido lattico ad un livello anche inferiore a quello normale iniziale nello spazio di 2-3 ore, invece delle 24 normalmente occorrenti. L'azione della Katalisina si concluderebbe per KEMKES con una rapida normalizzazione dell'ostacolo ossidativo ed il ripristino del livello normale della lattidemia, spostatosi o per difetto di demolizione della molecola dell'acido lattico o per inibizione della sua riconversione a glicogene.

Dalla ricerca di AUBEL e GENEVOIS (⁵³) dobbiamo dedurre che l'acido lattico non è, però, il solo bioelemento quantitativamente influenzato dalla presenza della tionina, perchè questa, in comune, come al solito, col bleu di metilene, esercita in vitro, al di fuori del contatto dell'aria un potere riducente su molte, svariate sostanze, potere che risulta proporzionale alla concentrazione del colorante, alla concentrazione del fosfato eventualmente esistente nel mezzo, alla radice quadrata della concentrazione ossidrilica per pH 6,5-8,5, raddoppiandosi per ogni 10°C. di aumento di temperatura.

Le sostanze che vengono ridotte sono il levulosio, la glicerina, la mannite, la dulcite, la sorbite, il glucosio, il galattosio, l'arabinosio tanto in mezzo fosfatato neutro che alcalino; molto più alto è il potere riducente nei confronti dell'aldeide piruvica, mentre con ac. aspartico, piruvico, asparagina, alanina, tirosina ed acido urico l'optimum di riduzione si ha con pH 7; acido acetico e glicocola non hanno, invece, mostrato alcuna capacità di ridurre il colore a qualunque pH.

Il leucoderivato della tionina, in ogni caso, ridà quantitativamente il colore bleu per semplice riossidazione all'aria.

KLEIN (⁵⁴) determinò nell'uomo le variazioni indotte da iniezioni di Katalisina sul contenuto di ossigeno del sangue arterioso (A) e venoso (V) e trovò che la differenza A-V non dà risultati quantitativi di una qualche importanza per le troppo grandi ed incostanti oscillazioni osservate tanto in individui normali quanto allo stato di forte dispnea.

Limitando, invece, il campo d'investigazione, cioè iniettando Katalisina nell'arteria brachiale e ricercando, poi, il contenuto di ossigeno nello stesso campo regionale vasale KLEIN trovò che, per piccole dosi (3 cm³), si ha un aumento della cessione di ossigeno dai capillari e quindi un probabile aumento della sua utilizzazione nel ricambio cellulare; iniettando, invece, una dose 5 volte più grande si hanno risultati opposti e l'A. presuppone che la Katalisina si comporti, in questo caso, come un

veleno capillare (pituitrina, istamina); pertanto, non si tratterebbe di un effetto specifico del colorante, ma della conseguenza dell'azione tossica esercitata sull'endotelio vasale (restringimento capillare transitorio); la differenza A-V, in questo caso, non servirebbe come indicazione del vero ricambio gassoso.

Nel 1938 lo stesso KLEIN (⁵⁵), dall'ulteriore esame di quattro casi clinici, dedusse che il bloccaggio avviene a livello della parete dei capillari (in corrispondenza dello strato che delimita l'endotelio vasale dal tessuto circostante), limitatamente al solo scambio di ossigeno, mentre l'eliminazione dell'anidride carbonica rimane invariata; con le piccole concentrazioni di tionina l'effetto è esattamente contrario, cioè è favorita la cessione di ossigeno con aumento dell'entità di scambio. In ogni caso, le lesioni prodotte sull'endotelio capillare dalle soluzioni concentrate sono transitorie e la normalità si ristabilisce dopo vari minuti.

Non risulta che questi interessanti studi siano stati ripresi e riesaminati al lume delle più moderne teorie sul meccanismo della permeabilità capillare, specialmente in relazione ad un'azione ripetuta del colorante.

Nel 1938 REUTER e PFALLER (⁵⁶) ritornano sul meccanismo funzionale dei coloranti ribadendo il concetto che il bleu di metilene e la tionina funzionano probabilmente da accettori d'idrogeno in ossidazioni anaerobiche, in casi nei quali il fermento al quale appartiene il compito di attivare l'ossigeno è fortemente inibito (avvelenamento da HCN, CO ecc.), coadiuvando, essi colori, o sostituendo complessi meccanismi a sistema ossido-riduttivo reversibile, come il glutatione e l'acido ascorbico. Tuttavia, accettano come probabile l'ipotesi di HAUSCHILD (⁵⁷), il quale, avendo dimostrato che la tionina rende inefficace l'azione del nitrito di sodio somministrato ad animali in dose mortale, pensa che questo debba influire o direttamente sulla metemoglobina trasformandola nuovamente in emoglobina, o assumere la funzione dell'emoglobina non più adatta al trasporto.

GROSCURTH (⁵⁸) conferma nel 1940 quest'ipotesi perchè osserva in vitro che la Katalisina trasforma nel tempo di due ore tutta la metemoglobina contenuta in campioni di sangue umano in altrettanta emoglobina.

Studiando la curva di respirazione prima e dopo iniezioni di Katalisina, REUTER e PFALLER constatarono che in individui sani o nei sani per quel che riguarda la circolazione sanguigna, l'effetto della Katalisina è praticamente nullo sul consumo di ossigeno; nei cardiaci con forte scompenso non è possibile fare alcuna deduzione perchè non vi sono dati concordanti e se in taluni casi vi è un aumento in molti altri vi è una forte diminuizione della richiesta. Ciò che essi confermano, in ogni caso,

è la costante riduzione dell'iperlattidemia degli scompensati cardiaci ed una riduzione, più o meno pronunziata, anche nei sani; effetti secondari di questa benevola azione sarebbero la scomparsa della « fame di ossigeno » nei cardiaci e del senso di peso al petto negli intossicati per avvelenamento o negli scompensati, oltre al ristabilirsi delle comuni funzioni, dei riflessi patellari, corneali, pupillari, del ritmo respiratorio con scomparsa della cianosi ecc.. Nessuna influenza è riconoscibile, invece, a carico della saturazione arteriosa del sangue.

Ciononpertanto, l'uso della Katalisina viene dai medici particolarmente raccomandato:

a) negli avvelenamenti da gas e negli avvelenamenti con veleni metemoglobinici (NaNO_2 ⁽⁹¹⁾, NaCN ⁽⁹²⁾, essenza di mirbano, sulfonamidi ⁽⁹⁰⁾, ecc.), specialmente nei casi in cui i comuni cardiocinetici non danno risposta favorevole.

b) nei casi di « nutrizione ossidativa gravemente disturbata » sia per insufficienza cronica di circolazione, sia attraverso restringimento della superficie polmonare respirante (asma cardiaco, tubercolosi polmonare bilaterale, insufficienza cronica cardiaca, pneumoniti, enfisemi, edemi polmonari, ecc.).

c) in casi di grave disturbo da narcosi, ecc.

HERBRAND e JAEGER ⁽⁴⁸⁾, invece, constatano l'azione battericida della Katalisina e ne consigliano l'uso nelle cistiti di origine batterica, nelle ulcerazioni torpide e nelle gangrene.

Soltanto DESCHIENS e coll. ⁽⁹⁴⁾, pur riscontrando nella tionina e nel bleu di metilene una potente azione antielmintica, ne sconsigliano l'uso per la forte tossicità.

I risultati di un curioso esperimento comunicarono nel 1939 R. HAZARD e coll. ⁽⁵⁹⁾. Iniettando a giovani cani una soluzione di tionina (o di bleu di metilene o di bleu di toluilene) in ragione di cg 15 in 10 cm³ di soluzione fisiologica per chilogrammo di peso corporeo ed iniettando, ancora, 5 minuti dopo:

a) mg 0,1/kg di peso di cloridrato di adrenalina, o

b) mg 2,5/kg di peso di cloridrato di joimbina

osservarono nel primo caso un notevole impedimento nella manifestazione dell'apnea adrenalina, nel senso che si ebbe solo un rallentamento del ritmo respiratorio, mentre nel secondo caso si ebbe non solo inibizione totale dell'apnea, ma addirittura si manifestò un notevole aumento del-

l'ampiezza dei movimenti respiratori. Successivamente gli stessi AA. ⁽⁸⁷⁾ confermano che tionina, bleu di tolulene, 2-6-diclorofenolindofenolo, iniettati in dosi non sufficienti a provocare la caduta della temperatura corporea del cane, non provocano modifiche sull'azione vasopressoria di adrenalina, successivamente iniettata, ma influenzano soltanto la gravità dello stato apneico, che diminuiscono sensibilmente o addirittura prevengono.

* * *

La costante ricerca delle fonti energetiche nei processi di sintesi biologica, è specialmente legata all'attività della Scuola italiana, che si è distinta con una numerosa serie di lavori, tra i quali ricorderemo quelli degli allievi di RONDONI, COTRONEI e SPIRITO e specialmente quelli di SPIRITO stesso. Questi lavori vertono sostanzialmente a stabilire una connessione tra stimolazione dei processi di ossidazione e risposta dei fenomeni inerenti allo sviluppo, accrescimento e rigenerazione di determinati materiali viventi.

Partendo dalla conclusione cui era arrivato il LIPMAN, e cioè che l'anaerobiosi, pur permettendo in larga quantità la glicolisi, provoca l'arresto dell'accrescimento di una coltura di tessuto, normale o neoplastico, e che, pertanto, tale glicolisi non può ritenersi una reazione specifica dell'accrescimento cellulare a tipo embrionale, BELTRAMI studia nel 1938 ⁽⁶¹⁾ il comportamento di taluni esplantati posti in presenza di tionina a varie concentrazioni. Adoperando frammenti di area cardiaca di pollo al 7° giorno d'incubazione in terreno eparinato con aggiunta di estratto di embrione, egli vide che l'aggiunzione di tionina, in quantitativi tali da avere una concentrazione finale di 1:200000, provoca più o meno spiccato rallentamento e arresto della crescita, comparsa del colore sotto forma di granuli endocitoplasmatici (colorazione evidentemente vitale) e talora persistenza delle pulsazioni nel primo espianto diretto. Per concentrazioni 1:500000 si ha ripartizione non uniforme del colore negli esplantati, pulsazioni più nette e durature nei fibroblasti più ricchi di colore, maggiore sopravvivenza e minore degenerazione adiposa nel caso in cui non si facciano i successivi trapianti.

Quantunque tutte le valutazioni siano state fatte con misure approssimate, pure dal comportamento delle culture (aree degli esplantati, spessore e aspetto delle zone di migrazione ecc.) l'A. è indotto a confermare i risultati delle esperienze di DICKENS ⁽⁵²⁾, cioè la tionina a concentrazioni molto piccole induce un'eccitazione dei fenomeni respiratori ed è probabile l'esistenza di una correlazione tra crescita e fenomeni ossidativi.

Qui risulta evidente una certa analogia di comportamento con la piocianina. Partendo, infatti, dalle conclusioni cui erano pervenuti diversi AA. (HAYES ⁽⁶³⁾, RUNNSTRÖM ecc.), e cioè che la piocianina funziona come deidrasi eccitando la parte non cianosensibile della cellula uovo e di quella neoplastica (la cui parte cianosensibile presiede, più specialmente, alla divisione cellulare), SORESINA ⁽⁶⁴⁾ volle studiare se una moltiplicazione cellulare con differenziazione (cellula uovo) è diversamente sensibile all'azione del colorante di quanto lo sia una moltiplicazione con sdifferenziazione (cultura in vitro o formazione di cellule neoplastiche).

Questo A. studia l'azione della piocianina su esplantati di pollo ed ha risultati negativi con soluzioni fino a 1:80000, favorevoli nel senso della mitosi con soluzioni di 1:100000 ed indifferenti con soluzioni di 1:200000. Tuttavia, il maggiore sviluppo ottenuto con la soluzione favorevole veniva attenuandosi dopo le prime ore e poi finiva col divenire uguale a quello dei controlli.

Poichè le differenze riscontrate nel comportamento dei coloranti in rapporto al substrato sul quale agiscono sono innegabili, l'A. è indotto a concludere che i risultati delle ricerche portano a minimizzare l'importanza prima attribuita alla localizzazione della funzione di tali sostanze e che, in definitiva, basta riconoscere, di fatto, solo un certo parallelismo tra respirazione e crescita, svincolando quest'ultima dai ceppi di un processo più o meno spiccatamente anossibiotico.

PIEMONTE ⁽⁶⁵⁾ prende come punto di partenza per le sue ricerche i risultati delle ricerche di DICKENS e, cioè, tionina e brillantcresylblau sono potenti eccitatori della respirazione dei tessuti normali e neoplastici, perchè migliorano un sistema in questi ultimi preesistente allo stato difettoso. Essendo la formazione maligna legata all'affermarsi di una vita a tipo anaerobico e ad un metabolismo di tipo preminentemente disintegrativo, l'A. pensa che la tionina potrebbe, eccitando la respirazione cellulare, o ritardare oppure, forse, anche impedire la cancerogenesi, o, ancora, favorire i processi proliferativi fornendo energia per quelli di sintesi.

La ricerca si conclude con esito spiccatamente negativo, in quanto l'avviamento alla cancerogenesi degli animali in esperimento assume in generale un carattere indifferente a cui fa solo riscontro una leggerissima precocità nello sviluppo di neoplasmi di taluni topi trattati con tionina.

H. LETTRÉ ⁽¹⁰²⁾, nel 1950 trova che indicatori di ossido-riduzione, come tionina e bleu di metilene, non prolungano la sopravvivenza di topi portatori di tumori ascitici.

DEOTTO ⁽¹⁹⁾ studiando nel 1939 i processi rigenerativi delle idromeduse (*Abelia geniculata* e *Tubaria larinx*) trova che piocianina e tionina

li accelerano per concentrazioni ottimali, in accordo con la teoria ossibiotica della moltiplicazione cellulare.

CHIUNINI (⁶⁶), basandosi su più recenti interpretazioni di SPIRITO in merito alla funzione della catalasi, cerca di conciliare le due teorie predominanti sulla ossi-anossi-biosi e pensa che la glicolisi anaerobica possa essere utilizzata per un normale ritmo di sviluppo a patto che il tessuto e l'individuo posseggano meccanismi adatti ad allontanare l'acido lattico prodotto e che l'impiego dei materiali a funzione energetica sia esaltato in modo da colmare il dislivello tra rendimento energetico dell'ossidazione dei glucidi e quello della scissione anaerobica di essi.

Studiando l'effetto della tionina su cariossidi di grano in germinazione egli trova che concentrazioni 1:500000-1:1000000 manifestano un effetto deprimente già nelle prime 24 ore; per concentrazioni ancora meno importanti e sino a 1:9000000 l'effetto deprimente si manifesta dopo 48 ore. Maggiori diluizioni non hanno alcun effetto.

Trattando con tionina uova di *Bufo vulgaris*, *Bufo viridis* e *Axoloth*, dallo stadio corrispondente alla fecondazione appena avvenuta a quella coincidente col riassorbimento del vitello, CHIUNINI non trova variazioni, rispetto alla crescita dei controlli, per concentrazioni di tionina 1:25000-1:5000000; le misurazioni della quantità di ossigeno assunta sotto queste condizioni dalle uova di *Bufo viridis*, eseguite col microrespirometro di STEFANELLI, danno valori uguali sia nei controlli che nelle prove, qualunque sia la concentrazione di tionina impiegata.

MARINI-BETTÒLO e BORZINI (¹⁰¹) nel 1947 non trovano alcun parallelismo tra potenziale di ossido-riduzione di taluni colori, tra cui tionina e bleu di metilene, e accrescimento di *Alternaria tenuis* e *Fusarian solani*. Questo lavoro si riallaccia ad altre precedenti ricerche intese a stabilire la tossicità della struttura chinonica nei riguardi di *Staph. aureus* e la non stretta corrispondenza tra tossicità e potenziale di ossido-riduzione.

COTELLESA (⁶⁷) adopera uova di *Rana esculenta*, prive d'involucro, dallo stadio di giovane blastula a quello di piastra neurale; ponendole in capsule di PETRI con soluzioni di tionina in acqua Marcia trova che per concentrazioni 1:25000-1:50000 si ha prima arresto dell'accrescimento e poi effetto letale, mentre le concentrazioni 1:100000-1:500000-1:1000000 favorirebbero notevolmente lo sviluppo del germe.

Questi risultati sono in netto contrasto con quelli di CHIUNINI.

La COTELLESA interpreta l'inibizione di tionina come una probabile azione analoga a quella osservata con la piocianina di RUNNSTRÖM, cioè, la tionina potrebbe, eventualmente, esercitare nei confronti dell'uovo di *Rana fusca* un'azione piuttosto negativa sui processi di sviluppo, pur esaltandone i fenomeni di ossidazione in funzione della sua concentrazione,

e, solo per concentrazioni molto basse (1:500000), col moderarsi dei fenomeni ossidativi, si avrebbe il miglioramento dell'evoluzione embriogenetica. Questo a prescindere da un'azione tossica specifica della tionina sul germe.

In un secondo lavoro la COTELLESA (⁵⁸), basandosi proprio sui dati di CHIUNÌ, dimostra che, se si estende contemporaneamente il trattamento con tionina ad embrioni di *Rana esculenta*, *Bufo viridis* e *Bufo vulgaris*, le tre forme di anfibio presentano assai diversa sensibilità all'azione del colorante, il quale agisce, inoltre, diversamente anche in relazione all'acqua in cui è disciolto. Con acqua Marcia trova mortali sia per la *Rana* e. che per il *Bufo* v. le concentrazioni 1:25000-1:100000; per il *Bufo* v. sono letali quelle 1:20.000 e talvolta quelle 1:50000, mentre quelle 1:500000 sono favorevoli all'accrescimento di *Rana esculenta*.

Ripetendo le prove con *Petromyzon fluviatilis*, molto vicino agli Anfibio per il tipo delle uova (telolecitiche), per la segmentazione, gastrulazione ecc., ma non per le caratteristiche peculiari del suo ricambio intermedio (diversa quantità di catalasi, di perossidasi, di ossigeno assunto, di anidride carbonica emessa, diversa resistenza all'anaerobiosi) trova concentrazioni di tionina in acqua Marcia pari a 1:20000-1:2000000 rapidamente mortali, mentre le concentrazioni di 1:4000000-1:5000000 permettono una più lunga sopravvivenza, ma col tempo gli embrioni finiscono lo stesso per andare in disfacimento.

L'interpretazione che la COTELLESA dà ai suoi nuovi risultati è che l'azione letale della tionina deve farsi risalire ad una diversa resistenza dell'organismo nei confronti di un non sufficiente apporto di ossigeno, perchè il *Petromyzon*, che è una delle specie meno resistenti all'azione della tionina, è anche una delle specie meno resistenti all'anaerobiosi.

L'ipotesi di COTELLESA è in buon accordo con una serie di lavori sperimentali dovuti a CASTIGLI PITOTTI (⁶⁸), STEFANELLI (¹³) e SPIRITO (¹⁶) con i quali è dimostrato che all'atto della fecondazione l'uovo di *Bufo* v. conserva costante il suo consumo di ossigeno, mentre quello di *Petromyzon* lo esalta notevolmente e bruscamente. Questo diverso comportamento viene messo in relazione all'assenza di quantità apprezzabili di citocromi nel solo uovo di *Bufo*, il quale si manterrebbe a lungo in anaerobiosi, segmentandosi, per la presenza di una riserva ossidante di natura catalasica, da SPIRITO chiamata anche ossifero perchè avrebbe la proprietà di « trasportare » ossigeno al substrato cellulare.

Le uova di *Petromyzon*, al contrario, mancano di catalasi, ma per la presenza di grandi quantità di citocromi possono celermente mobilitare, quando è necessario (fecondazione), tutto l'ossigeno occorrente ai substrati; in anaerobiosi arrestano immediatamente il processo di em-

briogenesi perchè mancano, o quasi, le riserve ossidanti di cui abbonda il Bufo.

La funzione ossiforica della catalasi è per SPIRITO e coll. provata dal fatto che le specie resistenti all'anaerobiosi (*Bufo vulgaris*, *Discoglossus pictus*, e *Bufo viridis* ⁶⁹) mantengono immutata la produzione di CO₂, al contrario di quelle meno resistenti (rispettivamente in ordine decrescente di resistenza: *Rana agilis*, *Rana esculenta*, *Hyla arborea*, *Axoloth*, *Petromyzon*) che lo riducono notevolmente.

HOPKINS (⁷⁰), che nel 1937 confermò la presenza di maggiori quantità di catalasi in specie che si trovano periodicamente in anaerobiosi, pensa che quest'enzima, agendo sulla molecola dell'acqua ossigenata che si forma nel metabolismo intermedio, liberi ossigeno per fornirlo alle ossidasi, che lo utilizzano dopo averlo attivato; ma per spiegare casi come quello del *Petromyzon* che ha minore resistenza all'anaerobiosi e contenuto catalasico maggiore degli Anfibi resistenti, FRIGGERI e SPIRITO sono propensi a credere che la resistenza all'anaerobiosi debba farsi risalire, più che alla presenza di una riserva ossidante, all'esistenza di meccanismi produttori di energia di tipo anossibiotico, come la fermentazione lattica dei glicidi.

* * *

Lo studio dell'attività delle sostanze colorate sui principali costituenti chimici cellulari ha ripreso incremento in questi ultimi anni, arrivando a risultati veramente notevoli. Le più importanti acquisizioni sono state ottenute nel campo della catalisi enzimatica.

Nel 1940 si era visto, ad opera di MASSART e DUFAIT (⁴⁹), che i coloranti basici, altamente dissociati come basi ammoniche quaternarie (tionina ed affini), esercitano azione inibitoria sull'acetilcoesterinasi. La inibizione è nulla per i colori acidi o a forma pseudobasica, mentre la graduale sostituzione con gruppi alchilici dei radicali attivi fa procedere di pari passo grado di dissociazione ed inibizione enzimatica.

Ancora più recentemente si è trovato che:

1) la tionina, il bleu di metilene, il 2-6 diclorofenolindofenolo (⁷⁴) inibiscono rispettivamente il 50%, il 41% e il 62% del potere cocarbossilasico di un substrato, anche in concentrazione di $37,5 \times 10^{-6}$ mole/litro.

Il meccanismo, probabilmente, dipende dalla reazione tra colore e gruppo -SH della proteina enzimatica.

2) catecolo, idrochinone, chinone ecc., 2-6-diclorofenolindofenolo, tionina, bleu di metilene, piocianina, fenosafranina ecc. (⁷⁶) a concen-

trazioni 0,0004 M sono tutti inibitori di varie reazioni enzimatiche, come la ossidazione dell'acido ossalico da parte di un'ossidasi, l'ossidazione dell'acido linoleico da parte di una lipossidasi e la decomposizione dell'acqua ossigenata da parte della catalasi.

Gli AA. pensano all'esistenza di un meccanismo di reazioni a catena che influenzi la catalisi enzimatica. Molti di questi inibitori sono attivi anche sulla desidrogenasi lattica e succinica.

Altri ricercatori hanno confermato l'azione inibitoria dei coloranti basici sulle desidrogenasi. Ad es. in omogenato di cervello di ratto SHIMAKOSHI (¹²¹) ha trovato che l'etilmetano (in concentrazione 0,16 M), in presenza di tionina, bleu di metilene, bleu di toluidina ecc., manifesta una spiccata azione inibitoria, indipendentemente dal tipo di donatore di elettroni (glucosio, piruvato, glutamato, succinato, ecc.). Con colori acidi, come l'indigotetrasulfonato, si ha, invece, l'azione opposta, cioè un'attiva stimolazione dell'azione enzimatica. L'influenza dell'etilmetano è limitata al solo trasporto di elettroni, cioè non influenza direttamente l'enzima.

OGURA (¹⁰⁴) studia l'azione della tionina sulle desidrogenasi e fornisce alcuni dati termodinamici e cinetici delle reazioni intermedie.

3) tionina, bleu di metilene e 2-6-diclorofenolindofenolo (⁷⁷) inibiscono l'attività indofenolossidasi dei nervi periferici.

4) tionina, bleu di metilene e bleu di toluidina (⁷⁸) inibiscono l'attività colinesterasica con effetto meno importante se i colori sono nella leucoforma.

5) una serie di lavori eseguiti da DIEMAIR e BOEKHOFF (⁸²) sulla relazione tra sostanze coloranti e reazioni fermentative porta, fra l'altro alla conclusione che tutte le sostanze, come l'anilina, la dimetil-p. fenilendiamina, l' α -naftilamina, il m. aminofenolo, l' α e β naftolo, la resorcina ecc., che hanno uno o più radicali aminici liberi nella molecola, e tutte le sostanze coloranti azoiche, come il rosso naftolo il rosso di cocciniglia ecc., che nell'organismo vivente subiscono una scissione riduttiva dando luogo a sostanze contenenti legami aminici, sono inibitori della catalasi. Essi citano, in proposito, il giallo burro o dimetilaminoazobenzolo, che in vivo è scisso in anilina e dimetil p. fenilendiamina, sostanze entrambi fortemente inibenti la catalasi e ciò potrebbe essere, forse, in relazione alla sua indubbia azione cancerigena.

Altre attività di questi colori, che interferiscono seriamente con le normali condizioni di vita del protoplasma, sono state messe in evidenza. Ricordiamo:

1) la tionina, e con essa alcune tiazine, ossazine e fenazine, ha il potere d'inattivare in vitro l'eparina (⁷¹). Tale attività pare che sia particolarmente connessa con la presenza del gruppo aminico primario.

2) l'effetto antieparinico sul plasma di coniglio (⁷²) presenta un livello critico. Il solo colore, aggiunto al plasma per concentrazioni inferiori a quella che determina con eparina il punto critico, non ha sul sangue che scarso o nessun effetto, mentre le concentrazioni superiori hanno un potere anticoagulante che è notevole per il violetto neutro, il bleu di toluidina, l'azzurro A e il rosso neutro, scarso per il verde Janus, la safranina e la tionina.

3) la tionina, col tetrabromo-2-2'-diidrossibenzene (⁷³) ed altre sostanze, ha azione emolitica; la minima concentrazione efficiente per la tionina è di $1:10^4$. E' da notare che una tale azione emolitica della tionina era già stata riscontrata da SIEBENMANN (⁸⁹) nel 1943 su eritrociti di topo.

4) la tionina, il bleu di metilene, il cristallvioletto, il verde di metile, la fluoresceina, il rosso congo e molti altri colori (⁷⁵) hanno un'azione diversamente attiva sulla cornea, dove producono alterazioni di diversa importanza.

5) la tossicità acuta e cronica determinata dai seguenti colori: rosso neutro, azzurro A, violetto neutro, bleu di toluidina, safranina, verde Janus e tionina (⁷⁹) in ratto, topo e coniglio aumenta in ciascun colore secondo l'ordine col quale sono elencati. Per quanto riguarda la serie tiazinica, la presenza di due gruppi aminici primari liberi nel nucleo aromatico aumenta la tossicità da 3 a 7 volte in confronto dei composti che hanno un solo gruppo aminico primario libero. La presenza di un gruppo metilico nella posizione 2 aumenta la tossicità.

Nessuno dei colori, eccetto il rosso neutro, produce cambiamenti svelabili in senso patologico se somministrati 2 volte settimanalmente per 90 giorni.

6) diverse sostanze (⁸⁰), tra i quali i coloranti del gruppo delle tiazine, ossazine e azine (violetto di metile, piocianina, bleu di metilene, tionina, brillanteresilblau) inibiscono l'attività antiparassitaria o batteriostatica della tripaflavina ed in particolare l'effetto della tripaflavina sulla moltiplicazione del batteriofago anti-coli. L'azione dipenderebbe da due fattori: il potere del colorante di sostituirsi alla tripaflavina spostandola dal substrato fino ad ottenere uno stato di equilibrio e il potere fagostatico proprio del colorante. Secondo gli AA. la fissazione al substrato avverrebbe dal lato della molecola che porta il gruppo aminico.

7) poichè l'aggiunta di piccole quantità di ac. ascorbico o di acido nordiidroguaiaretico (⁸¹) a diete altamente carenti di vit. E davano una parziale protezione verso la diatesi essudativa del pulcino, altrimenti prodotta da queste stesse diete, sono stati studiati una serie di composti alimentari contenenti S o sostanze ossido-riducenti. Si è, così, trovato che tutte le sostanze che hanno potenziali di ossido-riduzione compresi tra +0,062 e + 0,011 (rispettivamente: tionina, ac. ascorbico, rosazurina, gallocianina, bleu di metilene) mostrano parziale protezione verso la formazione di essudati.

8) bleu di metilene, tionina, bleu di toluidina hanno azione ossitocica su utero isolato di cavia, ratto, coniglio e gatto (¹¹³), più marcata in assenza di ossigeno. Di notevole importanza l'osservazione che dosi ripetute inducono attenuazione dell'effetto inizialmente osservato e che i derivati tiazinici rinforzano le contrazioni da pituitrina, chinina, acetilcolina, istamina, cloruro di bario e calcio, mentre inibiscono l'effetto della segala cornuta. Altri AA. (¹¹⁶) confermano tale effetto e riscontrano aumento del 100% delle contrazioni, prodotte in vitro da soluzioni di acetilcolina sul muscolo retto addominale di rana, per aggiunta di tionina in soluzione 1:10⁵.

* * *

Il progredire dello studio dell'azione dei coloranti con funzione ossido-riduttiva ha spostato ed ampliato il campo iniziale d'investigazione, che, dalle sole modifiche indotte nel ricambio gassoso cellulare o animale, si è oggi esteso ad investire territori molto più vasti del protoplasma vivente e richiede, per la sua intellegibilità, più approfondite nozioni di quell'affascinante e pur giovane scienza che, con PAULING, si può definire « patologia molecolare ».

In un primo momento, sulla base della teoria di EHRLICH, si era veduto nei risultati sperimentali ottenuti su determinate cellule (corpuscoli rossi o cellule uovo sterili e fecondate), l'effetto di un'azione esercitata esclusivamente su un ristretto complesso di sostanze di natura enzimatica (quello dei pochi fermenti respiratori allora noti), e in maniera tanto circoscritta da dover interpretare in un unico rapporto diretto la rispondenza tra causa ed effetto macroscopicamente osservato.

Quando, però, in un secondo tempo, si è passati a sistemi fisiologicamente più complessi, — tessuti, embrioni, organismi adulti —, il presunto effetto stimolatore dell'accrescimento in relazione all'eccitazione delle ossido-riduzioni non si è constatato, per lo meno in maniera così costante e palese da poterne trarre sicure conclusioni; per ciò, molte deduzioni debbono considerarsi, piuttosto, come il prodotto di un in-

flusso momentaneo e non come quello di un'indagine approfondita e rigorosamente criticata.

Le esperienze di EHRLICH, di THUNBURG ecc., non vennero considerate per quello che effettivamente erano, cioè prove di un particolare metabolismo a carico di scorie che non potevano altrimenti essere eliminate, in vitro, ma si estese il loro principio, ritenendolo provato per qualunque altra condizione, all'intero organismo, dove ogni elemento ha un compito ben preciso e una sua funzione di equilibrio.

Sensibilità fotochimica dei coloranti, influenza della concentrazione ambientale di taluni ioni metallici, blocco di funzioni enzimatiche ed aumento dell'apporto di acqua ossigenata endocellulare, resero, e rendono tuttora, fortemente incerto lo stabilire dove e quale sia l'azione effettiva sul ricambio respiratorio e sulle condizioni di sviluppo di un determinato organismo. Da quanto si è accertato sembra più probabile che le reazioni tra colorante e substrato debbano essere di natura piuttosto complessa, in relazione alle varietà delle rispettive strutture molecolari ed è più logico considerare l'effetto finale come il prodotto ultimo di una serie di reazioni, forse anche a catena, che toccano certamente vari e diversi settori della catalisi enzimatica. Ma non può considerarsi neppure improbabile che l'azione primaria sia unica e localizzata allo stretto territorio nucleare per l'affinità che questi colori hanno verso gli elementi specifici del nucleo.

Lo studio dell'affinità selettiva di ciascun colorante verso i singoli elementi costitutivi di una cellula e delle modificazioni che essi possono, di volta in volta, indurre, non rappresenta soltanto un capitolo di erudizione scientifica che è allettante mettere a punto, ma un argomento di vivo, attuale interesse, che chiede di essere rigorosamente approfondito in vista delle gravi e durature alterazioni che questi composti possono indurre al metabolismo intermedio, specialmente se un'eliminazione lenta o parziale attraverso i principali emuntori dell'organismo può determinare, in relazione alla velocità, alla forma e alle quantità eliminate, uno stato anormale di taluni costituenti nucleari, che lentamente sfocia in una vera condizione patologica.

Per le moderne acquisizioni nel campo della biochimica cellulare un prodotto non può più ritenersi innocuo soltanto perchè non determina una certa casistica nella mortalità dei comuni animali di laboratorio entro un termine prestabilito, ma è necessario accertare che esso non induca, anche a distanza di tempo, e, soprattutto, per un apporto sistematicamente prolungato, squilibri metabolici tali che possano lentamente generare lesioni permanenti dei tessuti.

E' questo il caso che può verificarsi con l'uso delle bevande, delle

paste, dei cibi in conserva colorati artificialmente, per i quali si dovrebbe continuamente prevedere l'aggiornamento delle legislazioni sanitarie.

Lo studio approfondito delle modificazioni del ricambio e delle normali costituzioni cito- ed isto-chimiche indotte da questi coloranti artificiali deve, indubbiamente, portare alla revisione del concetto d'innocuità e non è improbabile che tale studio possa, se non arrivare a chiarire talune fonti delle proliferazioni cellulari atipiche (come si vuole da taluni, in base a quanto è stato accertato, ad es., per il giallo burro), per lo meno contribuire alla migliore conoscenza di quel complesso ed elefantico capitolo della patologia umana che prende il nome di allergia.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) O. WARBURG - Z. Physiol. Chem., 59: 112 (1909); Science 61: 373 (1923).
- (²) P. EHRLICH - Centr. Med. Wissensch., 23: 113 (1885); Deutsch. Med. Wochn., 16: 493 (1890); P. EHRLICH e A. LEPPMANN - Deutsch. Med. Wochn., 12: 49 (1886).
- (³) A. ASCHMARIN - J. Pharm. Chimie, 30: 320 (1924).
- (⁴) G. HARROP e G. BARRON - J. Exp. Med., 48: 207 (1928); J. Exp. Med., 52: 447 (1930); Bioch. Zeitsch., 227: 243 (1930); J. Biol. Chem., 79: 63 (1928); J. Biol. Chem., 81: 443 (1929); J. Biol. Chem., 84: 83 (1929).
- (⁵) A. BOUTARIC e T. JACQUENOT - Bull. Acad. Med., 108, 1034 (1932).
- (⁶) MAYERHOF - Arch. ges. Physiol., 169: 87 (1917); Arch. ges. Physiol., 170: 367 (1918).
- (⁷) O. WARBURG - Ber., 38: 1001 (1925); J. Biol. Chem., 79: 63 (1928); F. KUBOWITZ e E. HAAS, Biochem. Ztschr., 227: 243 (1930); Biochem. Ztschr., 233: 247 (1932); O. WARBURG e E. NEGELEIN, Biochem. Ztschr., 202: 202 (1928).
- (⁸) O. WARBURG, F. KUBOWITZ e W. CHRISTIAN, Biochem. Ztschr., 221: 494 (1930);
- (⁹) D. KEILIN - Erg. Enzymforschung, 2: 239 (1933).
- (¹⁰) H. WIELAND - On the mechanism of oxidation. Yale Un. Press (1932).
- (¹¹) G. BARRON - J. Biol. Chem., 81: 443 (1929); J. Biol. Chem., 84: 83 (1929).
- (¹²) E. BALDWIN - Biochimica dinamica, Einaudi (1934); J. B. SUMNER e G. F. SOMERS - Chemistry and methods of enzymes - Acad. Press. (1947).
- (¹³) A. STEFANELLI - Riv. Biol., 23: 33 (1937); Arch. Sci. Biol., 24: 411 (1938).
- (¹⁴) J. K. PARNAS e Z. KRASINSKA - Bioch. Ztschr., 116: 111 (1921).
- (¹⁵) J. BRACHET - Arch. Biol., 46: 1 (1933).
- (¹⁶) A. SPIRITO - Arch. Sci. Biol., 20: 442 (1934); Arch. Sci. Biol., 23: 185 e 517 (1937); Riv. Biol., 19: 437 (1935); Ricerche di morfologia, (1938); Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 14: 318 (1939); Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 9: 901 (1934); Rend. Acc. Naz. Lincei, 23: 907 (1936); Arch. Biol., 23: 485 e 517 (1937); La ricerca scientifica, 1: 3 (1938).
- (¹⁷) J. RUNNSTRÖM - Protoplasma, 10: 106 (1930); Protoplasma, 15: 532 (1932); Protoplasma, 20: 1 (1933); Biol. Bull., 68: 327 (1933).
- (¹⁸) E. A. H. FRIEDHEIM - J. exp. med., 54: 207 (1931).
- (¹⁹) R. DEOTTO - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 14: 327 (1939).
- (²⁰) A. BERTHO e W. GRASSMANN - Laboratory methods of biochemistry, Mc. Millan, London (1933).
- (²¹) W. M. CLARK, B. COHEN e D. GIBBS - Public Health Reports, 40: 1131 (1925).
- (²²) F. KEHRMANN e W. SCHAPOSCHNIKOFF - Ber., 30: 1563 (1897).
- (²³) F. KEHRMANN - Ann., 322: 1 (1902).
- (²⁴) G. ODDO - Trattato di chimica organica, Sandron, Palermo (1930).

- (25) P. KARRER - Trattato di chimica organica - Sansoni, Firenze (1942).
- (26) A. BERNTHSEN - Ann. der Chemie, 230: 137 (1885); Ber., 17: 619 e 2854 (1884).
- (27) Beilstein's Handbuch der organischen Chemie 27 pag. 390, 391 e 392 IV Aufl.
- (28) F. KEHRMANN, E. HAVAS e E. GRANDMOUGIN - Ber., 47: 1884 (1914).
- (29) J. WEISS - Nature, 136: II, 795 (1935).
- (30) H. WIELAND, V. J. B. SUMNER e G. F. SOMERS - Chemistry and methods of enzymes. Acad. Press. N.Y. (1953).
- (31) L. MICHAELIS, M. P. SCHUBERT e P. GRANICK - J. Amer. Chem. Soc., 62: 204 (1940).
- (32) E. RABINOWITCH - J. Chem. Physics, 8: 551 (1940).
- (33) LAWRENCE, J. HEIDT - J. of Chem. Educ., 26: 525 (1949).
- (34) J. ROGER PORTER - Bacterial Chemistry and Physiology (1950).
- (35) A. E. STEARN e E. W. STEARN - J. Bact., 9: 491 (1924).
- (36) J. F. HUDDLESON - Mich. Agric. exp. Sta. Tech. Bull., 100: 1 (1926); Biol. Ab. V, 1785 (1931).
- (37) L. C. VERNÁ, F. J. HERRERO e F. AIQUEL - Chem. Ab., 44: 5958 (1950); Arch. farm. y biochim. Tucuman, 4: 327 (1950).
- (38) E. G. KELLEY e E. MILLER - J. Biol. Chem., 110: 113, 119 e 141 (1935).
- (39) L. LISON - Histochemie et cytochimie animales - Gauthin, Villars (1953).
- (40) W. C. HOLMES - Ind. Eng. Chem., 16: 35 (1924); Stain tech., 1: 116 (1926).
- (41) E. RABINOWITCH e L. EPSTEIN - Am. Chem. Soc., 63: 69 (1941).
- (42) L. MICHAELIS - Biol. Bull., 87: 155 (1944); Cold Spring. Harb., 12: 131 (1947).
- (43) L. LISON - v. 39.
- (44) L. LISON - v. 39.
- (45) G. GROSCOURTH e R. HAVEMANN - Deutsch. Med. Woch., 61: 1629 (1935).
- (46) H. KEMKES - Deutsch. Med. Woch., 61: 1975 (1935).
- (47) R. von VELDEN - Deutsch. Med. Woch., 61: 1634 (1935).
- (48) D. W. HERBRAND e K. H. JAEGER - Deutsch. Med. Woch., 66: 736 (1940).
- (49) C. HEYMANS - C. R. Soc. Biol., 86: 742 (1922).
- (50) J. HEYMANS e F. HEYMANS - C. R. Soc. Biol., 100: 1058 (1929).
- (51) U. S. von EULER - Arch. int. de Pharmacol. et Thérapie, 43: 67 (1932).
- (52) F. COSTANZO - Patol. sperim., 35: 81 (1947).
- (53) E. AUBEL e P. GENEVOIS - C. R. Ac. Sci. 183: 94 (1926).
- (54) O. KLEIN - D. Med. Wochnschr., 62: 1633 (1936).
- (55) O. KLEIN - Klin. Wochnschr., 17: 505 (1938).
- (56) H. REUTER e B. PFALLER - D. Med. Wochnschr., 64: 438 (1938).
- (57) F. HAUSCHILD - Klin. Wochnschr., 18: 1580 (1939); Arch. exp. Path., 182: 118 (1936); Arch. exp. Path., 184: 458 (1937).
- (58) G. GROSCOURTH - Med. Welt, 14: 629 (1940).
- (59) R. HAZARD, J. CHEYMOL e A. QUINQUAUD - C. R. Soc. Biol., 131: 612 (1939).
- (60) E. L. MASSART e R. DUFAYT - Biol. Ab., 21: 24154 (1947).
- (61) W. BELTRAMI - Tumori, 12: 205 (1938).
- (62) J. DICKENS - Biochem. J., 30: 1064 (1936).
- (63) R. HAYES - Biol. Bull., 74: 267 (1938).
- (64) C. SORESINA - Tumori, 12: 306 (1938).
- (65) M. PIEMONTE - Tumori, 12: 211 (1938).
- (66) F. CHIUINI - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 16: 529 (1941).
- (67) M. L. COTELLESA - Rend. Acc. Naz. Lincei, 1: 1352 (1946).
Rend. Acc. Naz. Lincei, 3: 620 (1947).
- (68) M. CASTIGLI-PITOTTI - Rend. Acc. Naz. Lincei, 3: 623 (1947).
4: 330 (1948).
Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., 24: 117 (1948).
- (69) A. FRIGGERI - Riv. di Biologia, 30: 253 (1940); Riv. di Biologia, 26: 434 (1938).
- (70) H. HOPKINS - Réunion internationale de Physique, Chimie, Biologie - Congrès du Palais de la découverte - Paris, Octobre 1937, VII Biol.
- (71) J. HALEY e F. STOLARSKY - J. Amer. Pharm. Ass., 39: 76 (1950).
- (72) J. HALEY e F. STOLARSKY - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 73: 103 (1950).
- (73) T. OKAMI - Folia Pharmacol. Japon., 43: 116 (1948) e Chem. Ab., 45: 4827 (1951).
- (74) R. KUHN e H. BEINERT - Chem. Ber., 80: 101 (1947).
- (75) F. HUGHES - Bull. Johns Hopkins Ospital 82: 338 (1948).
Chem. Ab., 43: 311 (1949).
- (76) W. FRANKE e D. SIEWERDT KIBAT - Z. Physiol. Chem., 281: 162 (1944).

- (77) M. MITOLO, C. BORGIA e M. SALERNO - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 22: 1066 (1946).
(78) P. KLEIN - Biochem. Z., 317: 210 (1944).
(79) TH. J. HALEY e F. STOLARSKY - Stanford Med. Bull., 9: 96 (1951); Chem. Ab., 45: 7700 (1951).
(80) W. MUTSAARS - Ann. Inst. Pasteur, 80: 343 (1951).
(81) E. DAM, J. KRUSE e coll. - Acta Physiol. Scand., 22: 299 (1951).
(82) W. DIEMAIR e K. BOEKHOFF - Z. f. anal. Chemie, 139: 267 (1953).
(83) LONDON - C. A., 23: 1715.
(84) F. KARUSH e E. RABINOWITCH - J. Opt. Soc. Am., 31: 77 (1941).
(85) L. MICHAELIS e P. GRANICK - J. Am. Chem. Soc., 63: 1636 (1941).
(86) K. WEBER - Radiologica, 1: 223 (1937); Chem. Zentr., 2: 825 (1939).
(87) A. QUINQUAUD, R. HAZARD e J. CHEYMOL - C. R. Soc. Biol., 133: 33 (1941).
(88) W. BARRY WOOD e R. AUSTRIAN - J. exptl. Med., 75: 369 (1942).
(89) C. SIEBENMANN - Can. Publ. Health. J., 34: 47 (1943).
(90) H. HÜLLSTRUNG - Hyppokrates, 13: 643 (1942); Chem. Zentr., II: 2610 (1942).
(91) P. M. DMITRIEVA - Farmakol. i Toksikol., 6: 33 (1943).
(92) N. V. PERESLEGIN - Farmakol. i Toksikol., 6: 10 (1943).
(93) L. MICHAELIS e S. GRANICK - J. Am. Chem. Soc., 67: 1212 (1945).
(94) R. DESCHIENS e L. LAMY - C. R. Soc. Biol., 139: 447 (1945).
(95) M. RAC - C. A., 40: 4896 (1946).
(96) A. STEIGMANN - J. Soc. Chem. Ind., 65: 233 (1946).
(97) G. I. MARTIN - Am. J. Pharm., 119: 432 (1947).
(98) S. GRANICK e L. MICHAELIS - J. Am. Chem. Soc., 69: 2983 (1947).
(99) K. MURANO - Japan J. Microbiol. Pathol., 36: 1010 (1942).
(100) M. KIESE - Arch. exptl. Path. Pharmacol., 204: 288 (1947).
(101) G. B. MARINI-BETTÒLO e G. BORZINI - Ist. Bot. univ. lab. critt. Pavia. Atti, 3: 261 (1947).
(102) H. LETTRÉ - Z. Krebsforschung, 37: 1 (1950).
(103) S. NIKITINE - J. Chim. phys., 49: 173 (1952); Gazz. Chim. ital., 82: 476 (1952).
(104) Y. OGURA - Biochem. J. (Japan), 39: 31 (1952).
(105) H. KUHN - Elv. chim. Acta, 31: 1441 (1948); Z. Elektrochem., 53: 163 (1949).
(106) E. RABINOWITCH - J. Am. Chem. Soc., 64: 335 (1942).
(107) G. J. BRALEY, M. G. EVANS e N. URI - Nature, 166: 959 (1950).
(108) G. J. BRALEY e N. URI - J. Chem. Phys., 20: 237 (1952).
(109) A. LEVINE ed M. SCHUBERT - J. Am. Chem. Soc., 74: 91 (1952).
(110) M. KOIZUMI e N. MATAGA - J. Am. Chem. Soc., 75: 483 (1953).
(111) S. WOISLAWSKI - Proc. Soc. exp. Biol. med., 83: 130 (1953).
(112) R. C. INGRAHM e M. VISSCHER - J. Gen. Physiol., 18: 693 (1935).
(113) J. M. TORRES-ACERO FERNÁNDEZ - Arch. inst. farmacol. exptl., 3: 77 (1951); Congr. luso-expañ. farm., 3: 56 (1952).
(114) F. AIQUEL e M. E. HERRERO - Arch. farmac. y bioquim. Tucuman, 4: 149 (1948).
(115) H. S. CAMERUM e M. E. MEYER - Am. J. vet. Research, 15: 472 (1954); C. A. 48: 10839 (1954).
(116) G. DASTUGUE e M. M. ROCHE - Trav. Soc. pharm. Montpellier, 11: 15 (1951).
(117) G. OSTER e N. WOTHERSPOOR - J. Chem. Phys., 22: 157 (1954).
(118) G. PESTMER - Z. Elektrochem., 58: 121 (1954).
(119) D. SHUGAR - Bull. Acad. pol. sci. Classe II, 1: 39 (1953).
(120) E. FURUSAWA e A. SHIBATANI - J. Biochem (Japan), 15: 622 (1953).
(121) Y. SHIMAKOSHI - J. Physiol. Soc. Japan, 15: 622 (1953).
(122) H. W. MEYER e W. D. TREADWELL - Helv. Chim. Acta, 35: 1444 (1952); 35: 1460 (1952).
(123) S. WOISLAWSKI - J. Am. Chem. Soc., 75: 5201 (1953).