

7. F. BOVET-NITTI. — Degradazione di alcune sostanze curarizzanti per azione di colinesterasi.

Riassunto. — L'A., servendosi principalmente del metodo manometrico del Warburg esamina la distruzione enzimatica da pseudo e true colinesterasi di 8 esteri alifatici e di 11 esteri aromatici della colina e del trietiletanolammonio. Da questo studio appare chiaro che la principale eliminazione di queste sostanze nell'organismo avviene per via enzimatica, il che è dimostrato dal rapporto che può stabilirsi fra la rapidità dell'idrolisi di questi prodotti e la durata della loro azione curarizzante. Dopo aver analizzato le relazioni principali che possono stabilirsi fra la struttura di questi derivati e l'azione esercitata su di essi dalla pseudo e dalla true-colinesterasi, l'A. riconosce fra i prodotti esaminati alcuni dotati di potere eserinico e, come tali, inibitori delle due colinesterasi in modo specifico. Questo potere eserinico è anche confermato dagli effetti di questi derivati in vivo sulla secrezione salivare del cane e in vitro sull'intestino isolato del coniglio.

Résumé. — En se servant presque exclusivement de la méthode manométrique de Warburg, l'A. a étudié la destruction enzymatique par la pseudo et par la true-cholinesterase de 8 esters aliphatiques et de 11 esters aromatiques de la choline et du triéthylethanolammonium. D'après cette étude, il apparaît évident que le mécanisme d'élimination de ces substances est surtout enzymatique, ce qui peut être démontré par le rapport entre la vitesse d'hydrolyse de ces substances et la durée de leur action curarisante. Après avoir analysé les rapports qui peuvent être établis entre la structure de ces corps et l'action qu'exercent sur eux les deux cholinesterases l'A. reconnaît, chez certains de ces dérivés, des propriétés eseriniques. Ces propriétés se traduisent par un pouvoir inhibiteur spécifique des deux cholinesterases et par l'action qu'ils exercent in vivo dans la salivation chez le chien et in vitro sur l'intestin isolé de lapin.

Summary. — The enzymatic inactivation of 8 aliphatic esters, 11 aromatic esters, choline and triethylethanolammonium, by pseudo and true cholinesterases, has been studied using almost exclusively the Warburg manometric technique. From this study it appears evident that the mechanism for the elimination of these substances is mainly enzymatic. This fact can be demonstrated by the relationship between the rate of hydrolysis of these substances and the duration of their curare-like action. Having analysed the relationship existing between the structure of these substances and the effect on them of the two cholinesterases, eserine-like properties were recognized in some of these derivatives. These properties were evidenced from the specific inhibitory effect of the two cholinesterases,

and by the in vivo effect on the salivary activity of the dog, and in vitro effect on isolated rabbit intestine.

Zusammenfassung. — Die A. untersucht, fast ausschliesslich unter Benützung der Manometermethode Warburgs, die enzymatische Zerstörung von 8 aliphatischen und 11 aromatischen Estern des Cholins und des Triäthanolammoniums durch die Pseudo- und die True-Cholinesterase. Aus dieser Studie geht deutlich hervor, dass die hauptsächlichliche Elimination dieser Substanzen im Organismus enzymatischen Vorgängen zuzuschreiben ist, was durch den Zusammenhang zwischen der Hydrolysegeschwindigkeit und der Dauer der curarisierenden Wirkung dieser Substanzen augenfällig wird. Nach einer Analyse der hauptsächlichlichen Beziehungen zwischen der Struktur der Produkte und ihrer Beeinflussung durch die Pseudo- und True-Cholinesterase wurde in einigen Fällen Eserin-Wirkung erkannt, die Hemmung der beiden Cholinesterasen in selektiver Weise hervorruft. Diese Eserin-Wirkung kann auch in vivo an der Beeinflussung der Speichel-Sekretion des Hundes und in vitro am isolierten Kaninchendarm dokumentiert werden.

La sintesi di alcuni esteri benzenici e alifatici ha messo nelle nostre mani prodotti di cui, oltre a quello delle loro proprietà farmacologiche, si è dimostrato pieno di interesse lo studio enzimologico.

Ci siamo infatti trovati dinanzi a due serie di derivati che si possono riallacciare a due esponenti tipici degli studi enzimologici. La serie aromatica da noi studiata, che comprende numerosi esteri dagli acidi bi e tricarbossilici del benzolo con la colina e con l'idrato di trietiletanolammonio ⁽¹⁾ si ricollega alla benzoilcolina, ampiamente studiata nei riguardi della colinesterasi, in seguito alle prime osservazioni di Stedman ⁽²⁾. I derivati alifatici invece si ricongiungono con l'acetilcolina stessa di cui per esempio il bisiodometilato del succinato di β -dimetilamminoetile(succinilcolina, 370 I. S.) non è che la molecola raddoppiata.

La degradazione nell'organismo di tali prodotti, che è certamente in rapporto con la durata della loro azione curarizzante, poneva il problema della loro scissione enzimatica. Per analogia, sono dunque gli enzimi conosciuti per la loro azione idrolizzante sulla benzoilcolina e l'acetilcolina, quelli di cui abbiamo studiato l'azione sui nuovi derivati a nostra disposizione ⁽³⁾.

(1) R. FUSCO, G. PALAZZO, S. CHIAVARELLI e D. BOVET, Gazz. Chim. Ital. 78, 511 (1948).

(2) L. H. EASSON e E. STEEDMAN, Biochem J. 31, 1723-29 (1937).

(3) Per l'insieme dei derivati sintetizzati, riportarsi alle tabelle d'insieme date in questi Rendiconti.

Come è noto, in questi ultimi 22 anni, e cioè dall'osservazione ora mai classica di Loewi e Navratil ⁽⁴⁾ il problema della colinesterasi ha preso un grande sviluppo. La letteratura su questo soggetto è estremamente vasta e importante e non è qui il luogo di passarla in rassegna ⁽⁵⁾. Basterà ricordare per la chiarezza del nostro esposto che oggi, dopo molte discussioni anche di nomenclatura non ancora completamente sopite, si ammettono due colinesterasi e cioè:

a) la *pseudo-colinesterasi* che si trova in abbondanza nel siero equino e umano e che idrolizza l'acetilcolina ma soprattutto la benzoilcolina.

b) la *true-colinesterasi* o colinesterasi specifica, abbondante nel cervello di alcuni mammiferi, nell'organo elettrico della torpedine, nelle emazie di bue e che idrolizza soltanto gli steri alifatici della colina e della beta metilcolina. Attualmente si attribuisce a questo fermento la funzione essenziale di distruzione nella contrazione muscolare dell'acetilcolina sprigionata al livello delle sinapsi.

Tutte e due sono inibite dall'eserina.

Si classificano poi fra le « aliesterasi » le altre esterasi a carattere meno specifico.

Dato che ciò è entrato nell'uso, noi daremo nel corso del nostro lavoro a questi fermenti il nome di « pseudo » e di « true » colinesterasi.

E' da questi elementi che noi siamo partiti per seguire in vitro e parzialmente in vivo la sorte dei nuovi derivati di cui ci proponevamo lo studio. I risultati a cui siamo giunti sono in parte complessi e di un'interpretazione non facile. Tuttavia si delineano alcune conclusioni di un interesse generale e di cui le principali sono:

1) che vi è un rapporto sicuro fra la rapidità con cui vengono idrolizzati questi derivati e la durata della loro azione curarizzante in vivo. Questo ci porta a pensare che tali sostanze vengono nell'organismo principalmente distrutte dalla colinesterasi.

2) che la conferma di questo fatto viene data dai risultati paradossali ottenuti volendo proteggere in vivo gli animali dalla curarizzazione con eserina, così come diremo in seguito con più dettagli. Per alcuni derivati delle due serie osserviamo allora un capovolgimento dell'antagonismo classico eserina-curaro che si traduce con un vero sinergismo e una mortalità maggiore degli animali.

3) che alcuni di questi esteri possono essere essi stessi eserinici.

4) che tali ipotesi ha trovato abbondante conferma nel caso del bisiodoetilato di 1,2 di (carbossi- β -dietilamminoetil) benzolo (306 I. S.)

(4) O. LOEWI e E. NAVRATIL, Arch. ges. Physiol, 214, 678-685 e 689-696 (1926).

(5) Due riviste d'insieme danno una visione completa del problema: R. AMMON, Ergebn. Enzymforsch. 4 102-110 (1935); J. LEVY, J. Physiologie 39, 413-458 (1947).

per l'inibizione della pseudo-colinesterasi ed in quello del bisiodoetilato di 1,4 di (carbossi- β -dietilamminoetil) benzolo (302 I. S.) per la true-colinesterasi.

5) che l'azione inibitrice esercitata da questi due esteri è assolutamente specifica e che per la prima volta ci troviamo dinanzi ad un inibitore specifico della true-colinesterasi.

PARTE SPERIMENTALE

TECNICA

Salvo per le prove in vivo, abbiamo adoperato in questo lavoro il metodo manometrico del Warburg, mettendoci in condizioni sperimentali molto simili a quelle adottate da Ammon ⁽⁶⁾ per lo studio della colinesterasi del siero. Abbiamo impiegato una soluzione salina saturata in bicarbonato e detta Ringer 20, così composta: NaCl 100 cm³ a 0,9%, Cl. K. 2 cm³ a 1,2% CaCl 2 cm³ a 1,76%, NaHCO₃ 20 cm³ a 1,26%. Il siero di cui ci siamo serviti è, salvo quando lo indichiamo espressamente, siero di origine equina. Come fonte di « true » colinesterasi abbiamo preso le emazie di bue (*) lavate tre volte e centrifugate con soluzione fisiologica, e diluite poi di metà o di un quarto. Abbiamo in genere operato alla T. di 37°.

I. - ESTERI ALIFATICI DELLA COLINA E DEL TRIETILETANOLAMMONIO

L'idrolisi enzimatica degli esteri degli acidi dicarbossilici a formula generale



non ha fatto finora oggetto di studio. Glick ⁽⁷⁾ soltanto nel 1941 ha riportato i risultati da lui ottenuti sul derivato succinico e maleico con la pseudo colinesterasi, constatando in primo luogo la lentezza del fenomeno in genere e poi il fatto che il derivato maleico veniva idrolizzato più rapidamente che non il derivato succinico. Ci è parso dunque interessante di riprendere lo studio dell'idrolisi enzimatica degli esteri alifatici a nostra disposizione ⁽⁸⁾ e ciò non soltanto per chiarire in parte il meccanismo dell'azione curarica da essi esercitata ma anche da un punto di vista più generale, l'effetto della true e della pseudo-colinesterasi essendo finora assai poco studiato su questo tipo di prodotti. Senza riportare qui i ri-

(6) P. AMMON, Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934).

(*) Tengo a ringraziare qui il Dott. A. d'Amore, della Sezione Veterinaria del Laboratorio di Microbiologia di quest'Istituto, che ha fornito con inesauribile premura i sieri e le emazie necessari al compimento di questo lavoro.

(7) D. GLICK J. Biol. Chem. 137, 357-362 (1941).

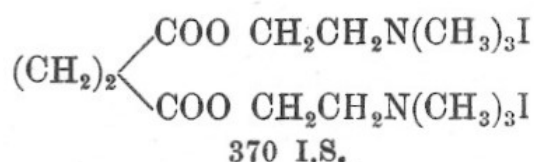
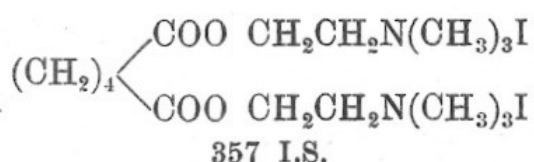
(8) Questi Rendiconti.

sultati ottenuti con tutti i derivati studiati ci limiteremo a esaminarne con più cura due che sono gli esponenti delle due serie farmacologicamente più interessanti, i succinati e gli adipati. Prima di esporre il dettaglio delle nostre esperienze, dobbiamo notare alcuni fatti di carattere più generale e che si riferiscono ai rapporti fra la costituzione chimica di questi esteri e la loro capacità di idrolisi enzimatica. Questi fatti sono i seguenti:

a) Contrariamente a ciò che vedremo nel caso degli esteri aromatici, la natura del gruppo alchilico unito all'azoto non riveste una grande importanza: i derivati con gruppo etilico o metilico si idrolizzano con la stessa rapidità così come quando il gruppo è misto, come nel caso per esempio del bisiodoetilato dell'adipato di dimetilamminoetile (358 I. S.) e del bisiodometilato del succinato di dietilamminoetile (369 I. S.)

b) La rapidità con cui questi derivati vengono idrolizzati è in rapporto inverso del numero di carboni che separano i due esteri: il bisiodometilato del sebacato di β -dimetilamminoetile (408 I. S.) si idrolizza molto più rapidamente che non il bisiodometilato del malonato di β -dimetilamminoetile (326 I. S.). Se si dà all'idrolisi della acetilcolina il valore 100, l'idrolisi dei prodotti enumerati sarà rispettivamente del 125%, del 30% e del 6% (fig. 1).

1) *Azione della pseudo colinesterasi sul bisiodometilato del succinato di β -dimetilamminoetile (succinilcolina) (370 I. S.) e sul bisiodometilato dell'adipato di β -dimetilamminoetile (357 I. S.).*



A parte il lavoro di Glick non abbiamo trovato nella letteratura menzione dell'idrolisi di questo tipo di prodotti da pseudocolinesterasi. Glick aveva segnalato la lentezza del fenomeno nel caso del succinato e questo noi abbiamo confermato per la succinilcolina (370 I. S.) il raddoppiamento del numero dei carboni, cioè il passaggio all'adipato, rende l'idrolisi molto più agevole, il che può spiegarsi con il fatto che una catena più lunga è certamente più instabile. Per precisare le idee e sempre restando nelle condizioni sperimentali di temperatura e di concentrazione abitualmente usate dando all'idrolisi dell'acetilcolina il valore 100, il succinato verrà scisso nelle proporzioni del 5% e l'adipato del 50,5%.

2) *Azione della true colinesterasi* — L'idrolisi da true colinesterasi di questi due derivati è assai più lenta che non quella da pseudo-colinesterasi, ma essa avviene e il suo carattere enzimatico può essere messo in evidenza aumentando in forti proporzioni la concentrazione del substrato, ciò che si traduce con un'idrolisi più importante.

Abbiamo riunito i risultati inerenti ai due prodotti in una sola figura (fig. 2).

3) *Azione dell'eserina « in vitro » sull'idrolisi del 370 I. S. e il 357 I. S. da pseudo-colinesterasi.* — E' una nozione ormai classica e che data anch'essa dai lavori di Loewi e Navratil (4) che l'eserina si oppone all'idrolisi enzimatica dell'acetilcolina. Numerosissimi sono stati poi gli studi provocati in questo campo e, non potendo citarli qui, rimandiamo il lettore alle riviste generali (5).

L'idrolisi della succinilcolina è così lenta per se stessa che non era facile di seguirne l'inibizione da eserina. Nel caso dell'adipilcolina invece ciò era possibile e, difatti, l'aggiunta di una diluizione di eserina a 1/100.000 ha inibito completamente il fenomeno così come avviene nel caso dell'acetilcolina stessa (fig. 3).

4) *Azione dell'eserina « in vivo » nella curarizzazione del coniglio dal bis-iodoetilato del succinato di β-dimetilamminometile (362 I. S.) (9).* — Che l'eserina rappresenti nei mammiferi l'antagonista più efficace della curarizzazione è un fatto noto da quasi cinquant'anni, dopo lo studio che ne hanno fatto Pal (10) e Rothberger (11). Recentemente Koppányi e Vivino (12) hanno esaminato con molta cura la protezione conferita dalla prostigmina e dall'eserina nell'intossicazione del coniglio da d-tubocurarina. Chase, Schmid e Battacharya (13) poi Everett (14) hanno confer-

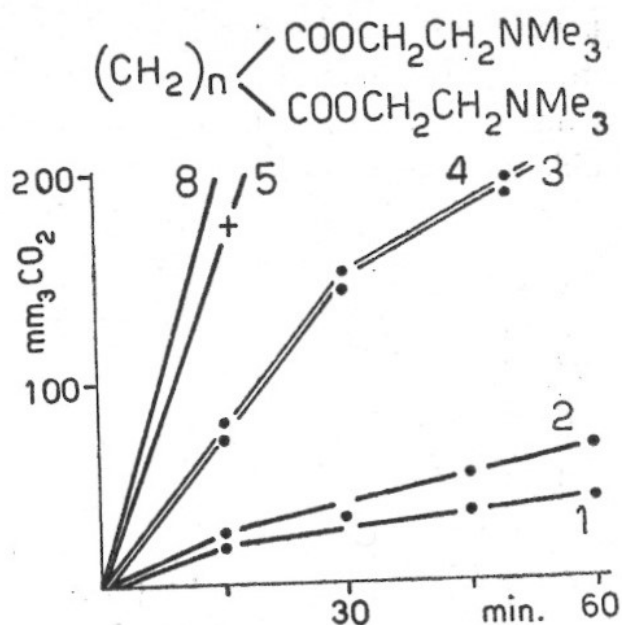
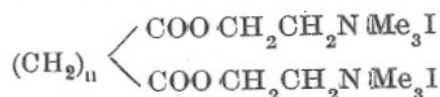


FIG. 1. - Idrolisi di alcuni esteri alifatici a formula generale



Secondo il numero dei gruppi CH_2 l'idrolisi è più o meno rapida raggiungendo un massimo per il sebacato e un minimo per il malonato. Warburg. T 37°. Liquido di Ringer. Concentrazione al 5/1000, siero equino 12,5%.

n=1: bisiodometilato del malonato di β-dimetilamminometile 326 I. S.

n=2: bisiodometilato del succinato di β-dimetilamminometile 370 I. S.

n=3: bisiodometilato del glutammato di β-dimetilamminometile 406 I. S.

n=4: bisiodometilato dell'adipato di β-dimetilamminometile 357 I. S.

n=5: bisiodometilato del pimelato di β-dimetilamminometile 404 I. S.

n=8: bisiodometilato del sebacato di β-dimetilamminometile 408 I. S.

(9) Abbiamo scelto questo derivato a gruppo alchilico misto come quello a azione curarica più elettiva.

(10) J. PAL, Cbl. F. Physiol, 14, 255 (1900).

(11) C. J. ROTHBERGER, Arch. ges. Physiol. 87, 117 (1901).

(12) T. KOPPANYI e A. C. VIVINO, Science 100, 474 (1944).

(13) H. F. CHASE, J. SCHMIDT e B. K. BHATTACHARYA, J. of Pharmacol. 91, 236 (1947).

(14) G. M. EVERETT, Journ. of Pharmacol. and Exp. Th. 92, 3 236 (1948).

mato quest. fatti e verificato l'antagonismo di questi due tipi di sostauze, dimostrando che si può ottenere una protezione del coniglio curarizzato somministrandogli preventivamente piccole dosi di eserina. Noi stessi abbiamo ampiamente verificato quest'antagonismo nel caso del triioduro

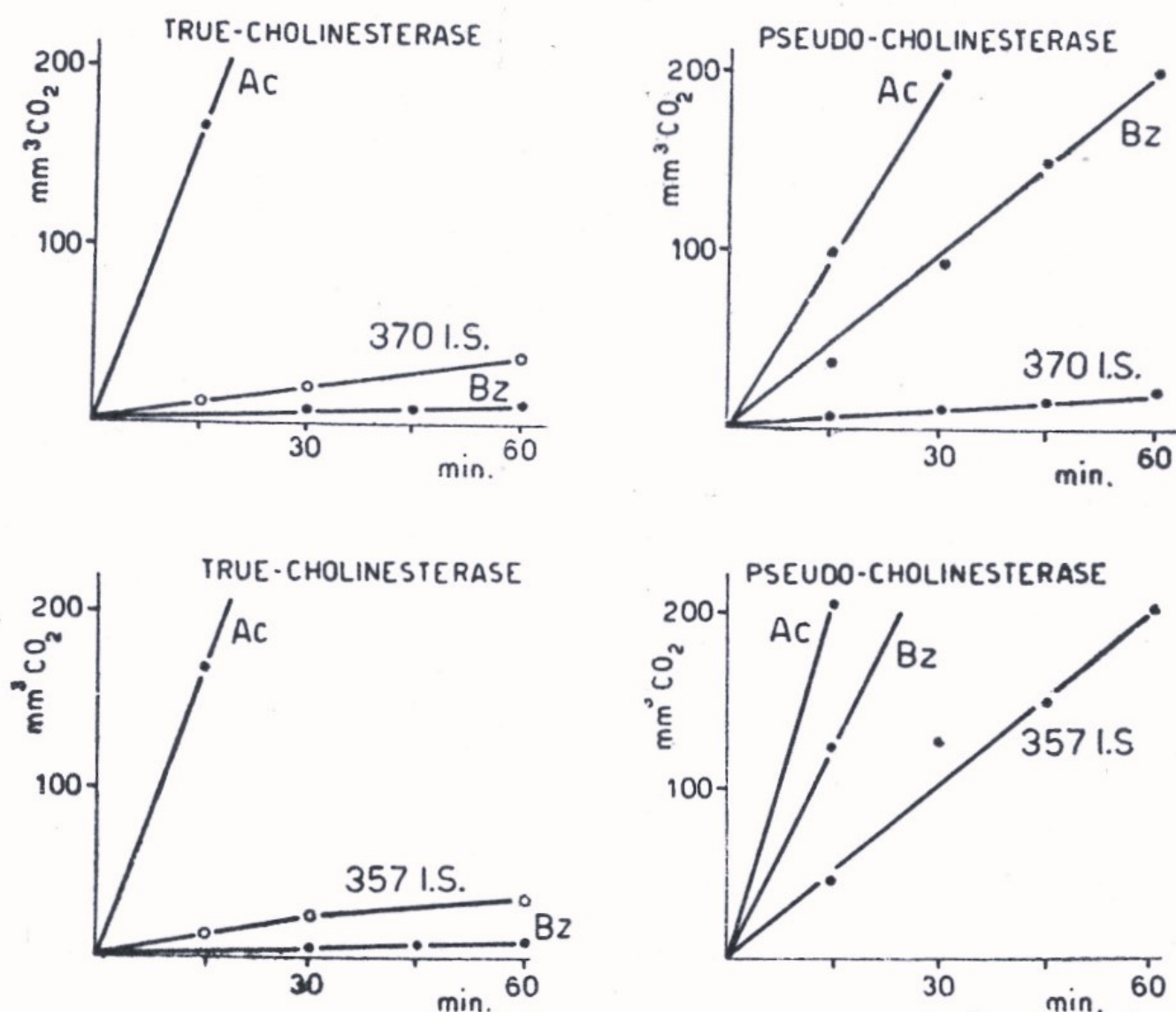


FIG. 2. - Effetti comparati della pseudo colinesterasi e della true colinesterasi sul 370 I. S. e il 357 I. S. Si noterà che l'adipilcolina (357 I. S.) è scissa più rapidamente che non la succinilcolina (370 I. S.); la true colinesterasi è del tutto priva d'azione sulla benzilcolina, mentre i due fermenti scindono con eguale rapidità l'acetilcolina.

Warburg T. 37°. Liquido di Ringer 20. Concentrazione dei prodotti 5/1000, siero equino 12,5%, emazie di bue 12,5%.

di tri-(β -triethylammonioetossi)-1,2,3-benzolo (2559 F.) e del bisiodoetilato dell'1,4-bis-(β -dietilamminoetil)-benzolo (347 I. S.).

I risultati che abbiamo invece ottenuto curarizzando il coniglio con il 362 I. S. ci sono apparsi da principio come assolutamente paradossali. Non soltanto in questo caso l'eserina non ha conferito al coniglio la minima protezione di fronte all'intossicazione curarica, ma ci siamo invece trovati dinanzi ad un vero sinergismo che ha provocato la morte degli animali a dosi di 362 I. S. normalmente atossiche se date senza eserina.

La spiegazione di questo fatto può trovarsi soltanto ammettendo che l'eliminazione di questi esteri alifatici avviene in gran parte nell'organismo per opera della pseudo e della true colinesterasi e che, l'eserina inibendo questi enzimi, il prodotto non viene ad eliminarsi normalmente, e la sua tossicità aumenta per il fatto che esso resta più a lungo nel circolo.

La protezione che l'eserina conferisce al coniglio nel caso di una curarizzazione sia da d-tubocurarina, sia da 2559 F. sia da 357 I. S. avviene secondo un meccanismo diverso, oggi generalmente ammesso. Si ammette difatti che l'acetilcolina interviene nella trasmissione dell'influsso sia servendo di stimolo al livello della cellula muscolare, sia allora perchè legata al metabolismo che accompagna la produzione dei potenziali elettrici del nervo. L'eserina ritardando la distruzione enzimatica faciliterebbe il passaggio dell'influsso e si opporrebbe così all'intossicazione curarica. D'altronde questi prodotti non essendo degli esteri, non possono venire idrolizzati nell'organismo come lo sono i derivati da noi studiati qui.

Abbiamo riunito i risultati sul coniglio in una sola figura, riportandovi sia le prove classiche con d-tubocurarina, sia i risultati da noi ottenuti con il 2559 F. e il 347 I. S. che quelli con il 362 I. S. e un estere aromatico (302 I. S.) di cui parleremo lungamente nella seconda parte di questo articolo (fig. 4).

II. - ESTERI AROMATICI DELLA COLINA E DEL TRIETILETANOLAMMONIO

1) *Idrolisi da pseudo-colinesterasi.* — L'azione della pseudo-colinesterasi non è stata a nostra conoscenza studiata su questo tipo di prodotti al di fuori della benzoilcolina che è stata allora considerata come uno degli esteri della colina e non come un punto di partenza per nuovi derivati dello stesso tipo. Mendel e i suoi collaboratori studiando accuratamente le condizioni in cui viene scissa la benzoilcolina ⁽¹⁵⁾ hanno dimostrato che essa rappresenta il substrato ideale per lo studio delle

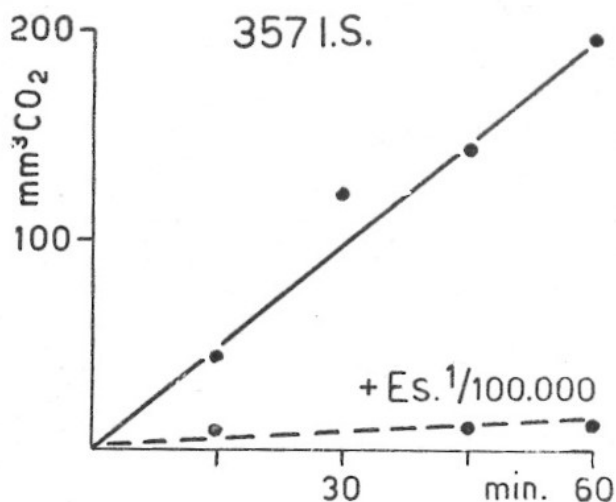
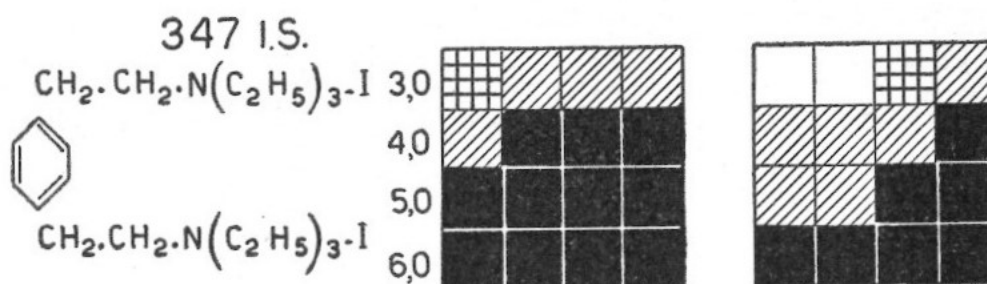
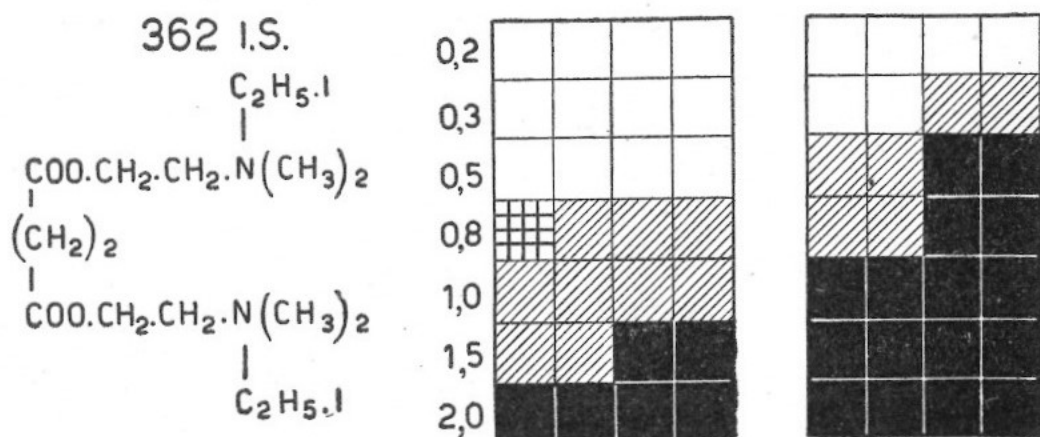
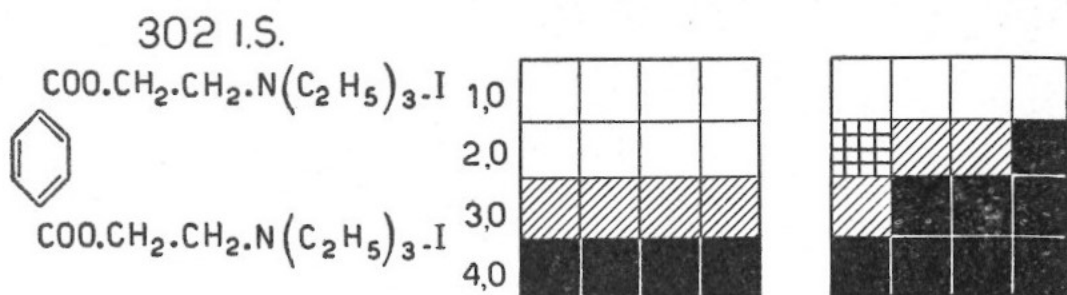
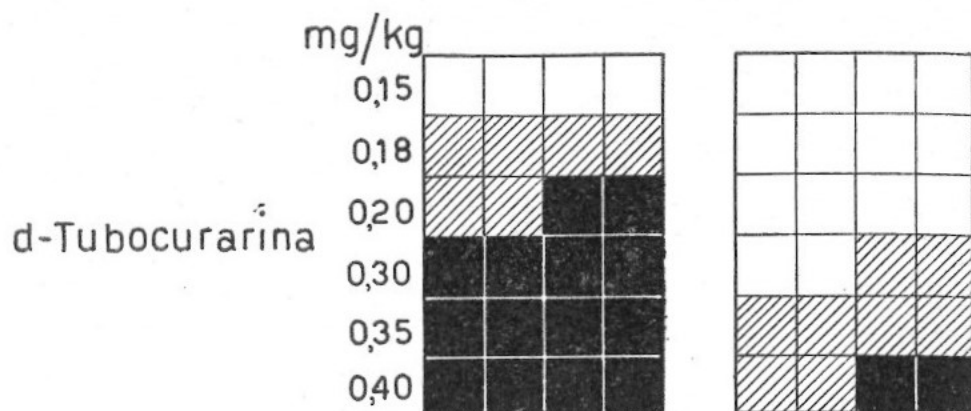


FIG. 3. - Azione inibitrice di una piccola diluzione di eserina sull'idrolisi dell'adipilcolina (357 I. S.) da pseudo colinesterasi. Warburg T. 37°. Concentrazione del prodotto al 5/1000. Liquido di Ringer 20. Eserina al 1/100.000.

Linea continua: idrolisi del 357 I. S. da pseudo colinesterasi.

Linea tratteggiata: idrolisi del 357 I. S. da psueodcolinesterasi con aggiunta di una diluzione di eserina a 1/100.000.

⁽¹⁵⁾ B. MENDEL, B. MUNDELL e H. RUDNEY, Biochem. J. 37, 473-76 (1943).



normali

con eserina [†]

[†] Eserina, 0,1 mg/kg, 10 minuti prima

□ NESSUN DISTURBO

▣ ATASSIA

▨ HEAD-DROP

■ MORTE

FIG. 4. - Si troveranno riassunti qui i risultati sul coniglio nell'antagonismo eserina-azione curarizzante.

Ogni quadratino rappresenta un coniglio. Ogni dose di prodotto viene iniettata su lotti di 4 conigli. I numeri a sinistra degli schemi rappresentano la dose di prodotto iniettata mg/kg. Le iniezioni vengono praticate endovena nella vena marginale dell'orecchio. Prima di somministrare il prodotto curarizzante il coniglio viene protetto con una dose di eserina di 0mg. I/kg endovena, 10 minuti prima del prodotto da saggiare.

Come si può vedere chiaramente riassunto qui, quando i prodotti curarizzanti sono degli esteri (302 I. S., 362 I. S.) si assiste a un vero sinergismo degli effetti che si traduce con una mortalità assai più grande dei conigli, mentre nel caso della Tubocurarina, del 2559 F. e del 347 I. S. in cui è assente la funzione estere, l'eserina esercita la sua azione protettiva e antagonista del curaro.

302 I. S. = Bisiodometilato di 1,4bis-(carbossi- β -dietilamminoetil)benzolo

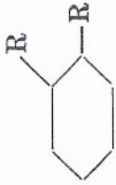
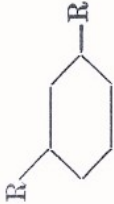
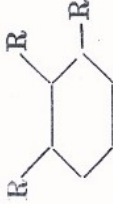
362 I. S. = Bisiodometilato del malonato di β -dimetilamminoetile

347. I. S. = diiodoetilato di 1,4bis-(β -dietilamminoetil)benzolo

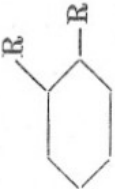
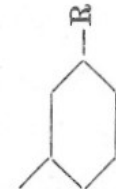
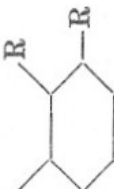
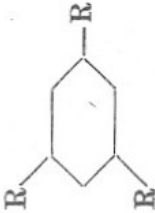
T. E. P. = triiodoetilato di tri 1,2,3-(β -dietilamminoetossi)benzolo (2559 F, Flaxedil o Sinaurina).

TABELLA I.

RAPPORTO FRA L'IDROLISI ENZIMATICA E LE PROPRIETÀ CURARIZZANTI
DI ALCUNI ESTERI AROMATICI DI TRIALCHILETANOLAMMONIO

Velocità dell'idrolisi da pseudocolinesterasi ⁽¹⁾ %	Coniglio ⁽²⁾			Rana ⁽⁶⁾ Dose curarizzante mg/kg
	HDD ⁽³⁾ mg/kg	D.T. ⁽⁴⁾ mg/kg	Durata ⁽⁵⁾ minuti	
a) $R = COO\ CH_2CH_2N(CH_3)_3I$				
 Iodometilato di carbossi-β-dimetilamminoetil benzolo (benzoilcolina)	50	150	40'	200
 Bisiodometilato di 1,2-bis-(carbossi-β-dimetil- amminoetil) benzolo	25	45	1 h	50
 Bisiodometilato di 1,3-bis-(carbossi-β-dimetil- amminoetil) benzolo	40	50	30'	contrae
 Bisiodometilato di 1,4-bis-(carbossi-β-dimetil- amminoetil) benzolo	7	10	15'	100
 Triiodometilato di 1,2,3-tri-(carbossi-β-dime- tilamminoetil)benzolo	13	16	1 h 30'	50

⁽¹⁾ Siero equino; Benzoilcolina=100; ⁽²⁾ Endovena; ⁽³⁾ Dose Head Drop; ⁽⁴⁾ Dose tossica DL₅₀; ⁽⁵⁾ Durata della curarizzazione nell'animale in respirazione controllata, dopo l'iniezione di 10 dosi tossiche; ⁽⁶⁾ Iniezioni nei sacchi linfatici.

Velocità dell'i- drolisi da pseu- do-collineste- rasi (1) %	Coniglio (2)			Rana (6) Dose curarizzante mg/kg
	HDD (3) mg/kg	D.T. (4) mg/kg	Durata (5) minuti	
b) $R = COO \text{ } CH_2CH_2N(C_2H_5)_3I$				
Iodoetilato di carbossi- β -dietilamminoetil ben- zolo (benzoato di trietiletanolammonio) .				
40	60	100	40'	75
Bisiodoetilato di 1,2-bis-(carbossi- β -dietilam- monioetil) benzolo				
5	7	8	1 h 15	10
Bisiodoetilato di 1,3-bis-(carbossi- β -dietilam- monioetil) benzolo				
33	18	25	10'	25
Bisiodoetilato di 1,4-bis-(carbossi- β -dietilam- monioetil) benzolo				
15	3	4	10'	25
Triiodoetilato di 1,2,3-tri-(carbossi)- β -dietil- ammonioetil)benzolo				
22	2	3	—	25
Triiodoetilato di 1,3,1-tri-(carbossi)- β -dietil- ammonioetil)benzolo				
35	2	3	20'	25

due colinesterasi, poichè è idrolizzata dalla pseudo-colinesterasi e non affatto dalla true-colinesterasi.

L'esame di questa tabella suggerisce alcune considerazioni d'ordine generale che sono le seguenti:

a) il numero delle catene di sostituzione, da 1 a 3, non appare come un elemento importante per la scissione dell'estere;

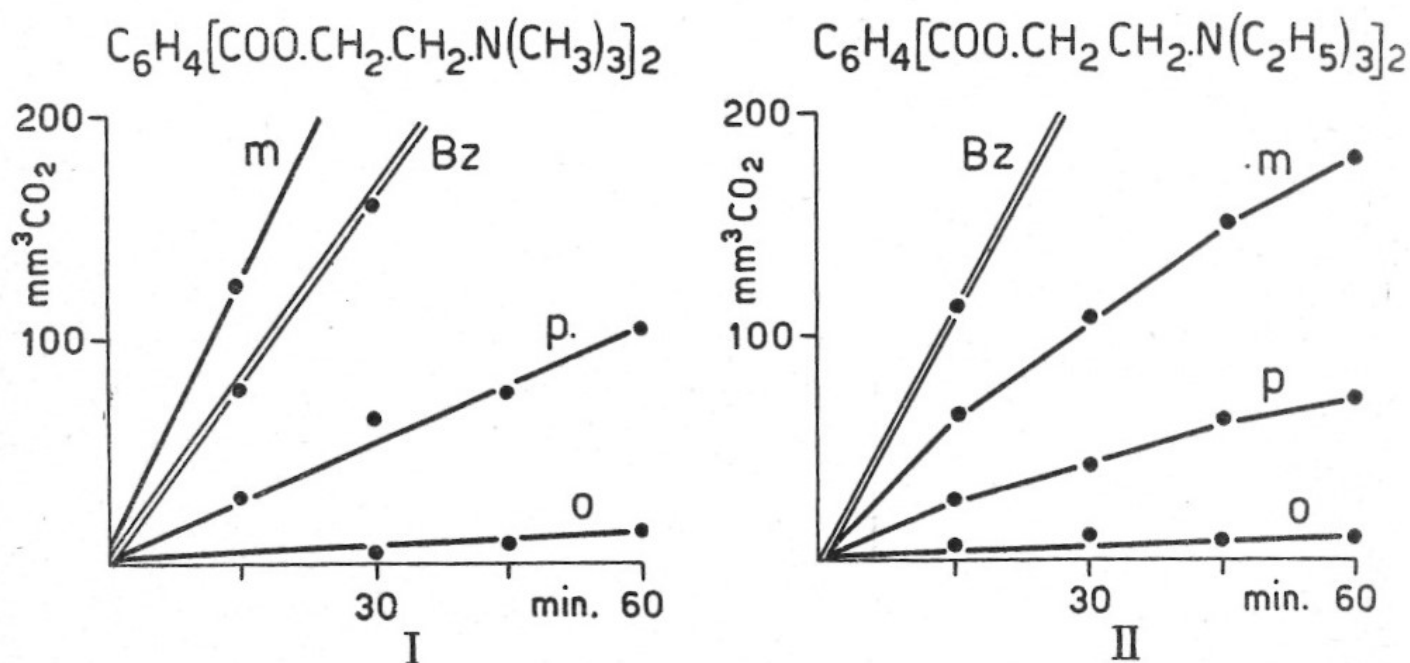


FIG. 5. - Nei derivati aromatici bisostituiti la posizione della catene riveste un'enorme importanza, la posizione orto rivelandosi la più stabile e la posizione meta la più labile. Warburg T. 37° Ringer 20. Concentrazione dei prodotti a 5/1000. Siero equino 12,5%

A sinistra:

Bz = Benzoilcolina

m = bisiodometilato di 1,3-bis-(carbossi-β-dimetilamminoetil)benzolo

p = bisiodometilato di 1,4-bis-(carbossi-β-dimetilamminoetil)benzolo

o = bisiodometilato di 1,2-bis-(carbossi-β-dimetilamminoetil)benzolo

A destra:

Bz = benzoilcolina

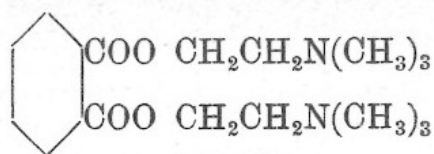
m = bisiodometilato di 1,3-bis-(carbossi-β-dietilamminoetil)benzolo

p = bisiodometilato di 1,4-bis-(carbossi-β-dietilamminoetil)benzolo

o = bisiodometilato di 1,2-bis-(carbossi-β-dietilamminoetil)benzolo.

b) la natura del gruppo alchilico riveste, nel caso degli esteri aromatici, una non lieve importanza. Tutti i derivati a gruppi metilici si idrolizzano più rapidamente che non quelli comportanti un gruppo etilico;

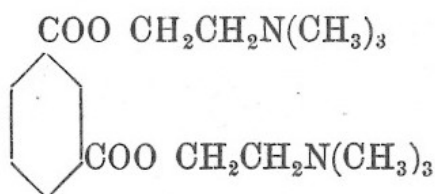
c) nel caso dei derivati a due catene, la posizione di quest'ultime ha invece un'importanza preponderante, la posizione meta rivelandosi la più labile e l'orto la più stabile, il che si traduce con un'idrolisi da pseudo colinesterasi assai diversa per ognuno degli isomeri (fig. 5).



330 I.S.

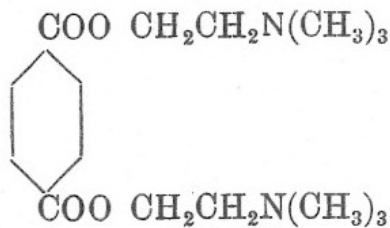
Idrolisi % (Benzoilcolina = 100)

12 %



324 I.S.

160 %



320 I.S.

25 %

Ciò è ugualmente vero sia per i derivati a gruppi etilici che per quelli a gruppi metilici.

d) Le caratteristiche farmacologiche principali che riportiamo nella tabella dimostrano in linea di massima che i derivati a effetto « in vivo » più durevole sono anche quelli che vengono idrolizzati più lentamente « in vitro » dalla pseudo-colinesterasi.

Caso del bisiodoetilato di 1,4-di-(carbossi-β-dietilamminoetil)-benzolo (302 I. S.). — Così come lo abbiamo fatto per gli esteri alifatici esamineremo più dettagliatamente un derivato della serie, e in particolare quello che essendo l'estere più curarizzante, è anche il derivato di cui l'eliminazione nell'organismo presenta il maggiore interesse.

Abbiamo constatato subito che l'idrolisi da pseudo-colinesterasi è lenta e quelle da true-colinesterasi quasi inesistente.

1) *Azione dell'eserina « in vivo » nella curarizzazione del coniglio da 302 I. S.* — Come abbiamo già accennato parlando dell'associazione eserina-362 I. S., abbiamo ritrovato gli stessi risultati paradossali volendo proteggere i conigli nella curarizzazione da 302 I. S. con eserina, e cioè un vero e proprio sinergismo che si traduce con la mortalità dei conigli a dosi di 302 I. S. di per se stesse atossiche. Per il dettaglio dell'esperienza rimandiamo alla fig. 4. La spiegazione di questo fatto è evidentemente la stessa che per il 362 I. S.: l'eserina, bloccando la colinesterasi, impedisce in parte l'eliminazione del prodotto avendo come risultato la morte più rapida dell'animale, a dosi di per se stesse non mortali.

2) *Azione dell'eserina « in vitro » sull'idrolisi del 302 I. S. da pseudo colinesterasi.* — Contrariamente a quello che abbiamo osservato nel caso degli esteri alifatici, l'eserina non esercita che una debole azione inibitrice sull'idrolisi del 302 I. S. in vitro se si opera nelle condizioni da noi impiegate abitualmente (fig. 6).

Si può interpretare questo fatto in due modi. Gunter ⁽¹⁶⁾ estraendo dal rene di bue un fermento capace di idrolizzare la benzoilcolina aveva già notato che l'azione inibitrice dell'eserina non si esercitava alla concentrazione abitualmente necessaria per bloccare la pseudo-colinesterasi. Gunter aveva, confermando così le osservazioni di Nachmansohn e Ro-

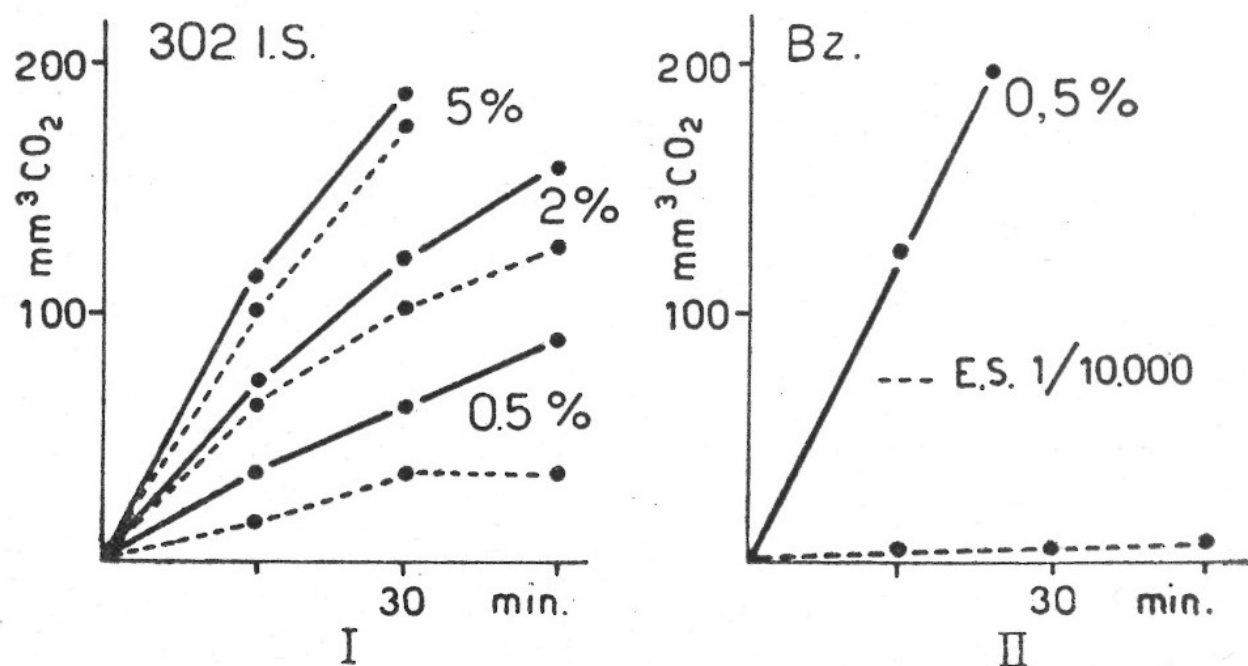


FIG. 6. - Mentre l'eserina blocca completamente l'idrolisi della benzoilcolina (Bz) da pseudocolinesterasi, essa si rivela quasi senz'azione su quella del 302 I. S. (Bisiodo etilato di 1,4-bis-(carbossi dietilammonioetil)benzolo. Warburg. I 37°. Ringer 20. Concentrazione del 302 I. S. a 0,5%, 2%, 5%. Siero equino 12,5%.

A sinistra:

Linea continua: 302 I. S. puro.

Linea tratteggiata: 302 I. S. più eserina a 1/10.000.

A destra:

Linea continua: Benzoilcolina pura.

Linea tratteggiata: Benzoilcolina più eserina a 1/10.000.

thenberg ⁽¹⁷⁾ per il rene di cavia e quelle di Sawyer ⁽¹⁸⁾ per il fegato di coniglio e di cavia, emesso l'ipotesi dell'esistenza di un'altra colinesterasi, la benzoilcolinesterasi.

Noi pensiamo invece che questo fenomeno può essere interpretato altrimenti e spiegarsi ammettendo un'affinità particolare del 302 I. S. per la pseudo-colinesterasi, affinità che sposterebbe l'equilibrio di competizione che si osserva normalmente nell'antagonismo acetilcolina-eserina.

E difatti questa maniera di vedere può trovare una conferma nel fatto che l'inibizione da eserina può esercitarsi sull'idrolisi del 302 I. S. sia che si aumenti la concentrazione in eserina, sia che si diminuisca la con-

⁽¹⁶⁾ J. M. GUNTER, Nature 157, 369 (1946).

⁽¹⁷⁾ D. NACHMANSON e M. A. ROTHENBERG, Science, 100, 454-455 (1944).

⁽¹⁸⁾ C. H. SAWYER, Science 101, 385 (1945).

centrazione del substrato e cioè, in un modo o in un altro, che si renda approssimativamente eguale il numero delle molecole dei due prodotti nella soluzione

E' in quest'ordine d'idee ed in seguito anche al comportamento così diverso dimostrato da questi esteri per la loro idrolisi da pseudo-colinesterasi.

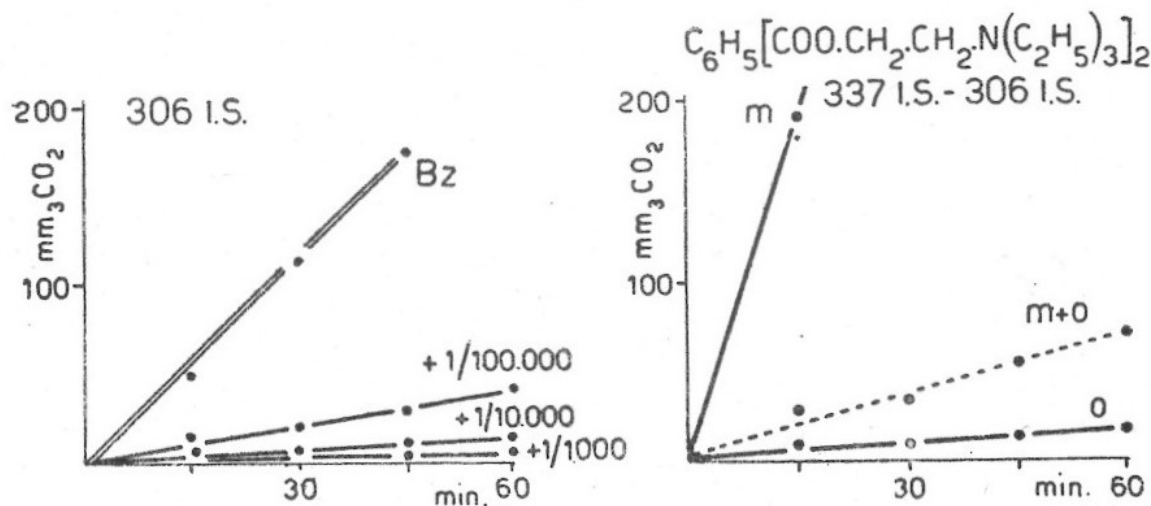


FIGURA 7.

A sinistra:

Il 306 I. S. (Bisiodoetilato di 1,2-bis-(carbossi-β-dietilammonioetil)benzolo) esercita una vera azione inibitrice sull'idrolisi della benzoilcolina da pseudocolinesterasi.

Warburg. I. 37° Ringer 20. Benzoilcolina a 5/1000. Siero equino a 12,5%.

Bz = benzoilcolina a 5/1000

+1/1000 = benzoilcolina 5/1000 + 306 I. S. 1/1000

+1/10000 = benzoilcolina 5/1000 + 306 I. S. 1/10.000

+1/100000 = benzoilcolina 5/1000 + 306 I. S. 1/100.000

A destra:

Il potere inibitore del 306 I. S. (bisiodoetilato di 1,2-bis-(carbossidietilammonioetil)benzolo) si esercita anche sull'isomero in posizione meta, che è il più facilmente idrolizzabile.

Warburg I. 37° Ringer 20. Prodotti alla concentrazione di 5/1000. Siero equino 12,5%.

o = bisiodoetilato di 1,2-bis-carbossi-β-dietilammonioetil)benzolo) (306 I. S.).

m = bisiodoetilato di 1,3-bis-(carbossi-β-dietilammonioetil) benzolo) (337 I. S.).

rasi che ci siamo chiesti se alcuni fra essi non avessero una loro azione anticolinesterasica del tipo competitivo, così come è quella che viene esercitata dall' eserina.

III. - AZIONE ANTICOLINESTERASICA DI ALCUNI ESTERI AROMATICI

L'idrolisi così diversa dei derivati bisostituiti secondo la posizione occupata dalle catene, così come l'abbiamo riassunta nella fig. 5, ci ha fatto pensare che quelli a lenta idrolisi potevano esercitare un'azione inibitrice su quelli a idrolisi rapida. Abbiamo dunque esaminato la loro azione in questo senso:

a) sull'idrolisi da pseudo colinesterasi;

b) sull'idrolisi da true colinesterasi.

1) *Azione inibitrice del bisiodoetilato di 1,2-di-(carbossi- β -dietilammonioetil) benzolo (306 I. S.) sull'idrolisi da pseudo-colinesterasi.* — Come abbiamo visto prima, il derivato bisostituito in posizione orto (306 I. S.)

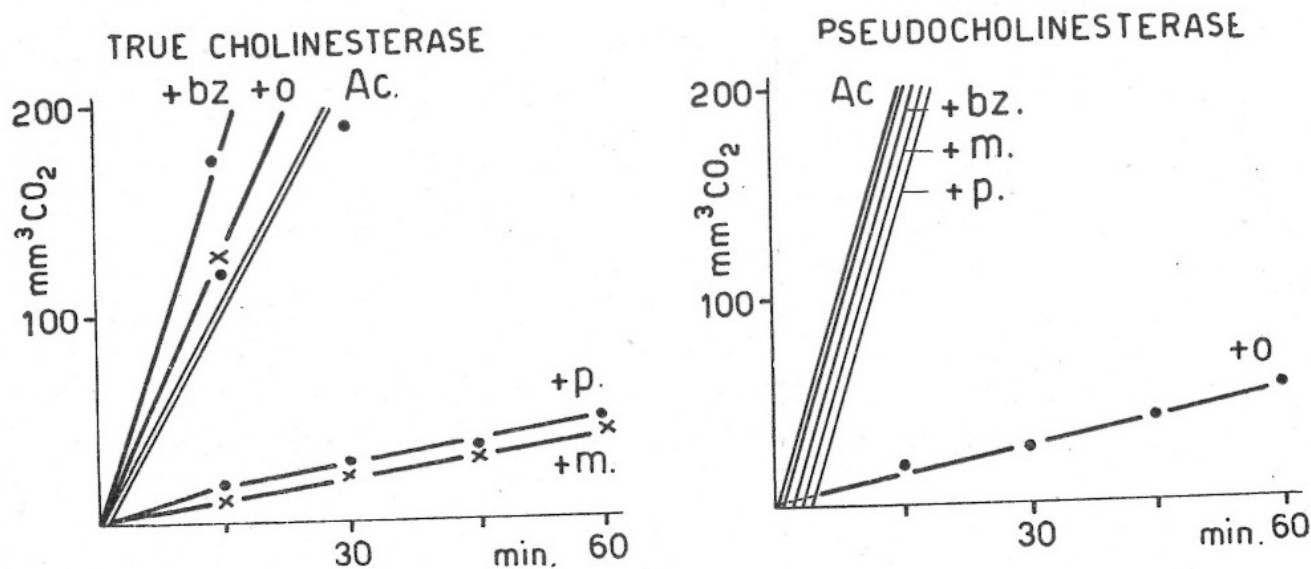


FIG. 8. - Riassumiamo in questa figura il potere inibitore dei derivati bisostituiti in posizione para e meta sulla true-colinesterasi, e di quello in posizione orto sulla pseudo-colinesterasi. Per l'azione della true-colinesterasi, il substrato è l'acetilcolina (Ac) a 5/1000 a cui viene aggiunto una diluizione, alla stessa concentrazione, di benzoilcolina (Bz) o di uno dei tre derivati bisostituiti isomeri fra loro per studiarne l'effetto inibitore.

Warburg T. 37°. Ringer 20. Emazie d iude 12,5%. Nel caso della pseudocolinesterasi, il substrato è anche l'acetilcolina e la fonte dell'enzima siero equino a 12,5%.

Ac=acetilcolina

Bz=benzoilcolina

o =bisiodoetilato di 1,2-bis-(carbossi- β -dietilammonioetil)benzolo (330 I. S.)

m=Bisiodoetilato di 1,3-bis-(carbossi- β -dietilammonioetil)benzolo (324 I. S.)

p =bisiodoetilato di 1,4-bis-(carbossi- β -dietilammonioetil) benzolo (320 I. S.).

viene idrolizzato 13 volte meno rapidamente che non l'isomero in posizione meta. Aggiungendolo anche in piccole diluizioni a una soluzione di benzoilcolina a 5/1000 noi assistiamo infatti ad un'inibizione quasi completa alle diluizioni di 1/1000 e 1/10.000 e ancora estremamente importante a quella di 1/100.000 (fig. 7).

Si può anche mescolare il derivato che si idrolizza più rapidamente (337 I. S.) in parti eguali al derivato di cui l'idrolisi è più lenta (306 I. S.) e assistere così ad un'inibizione assai forte.

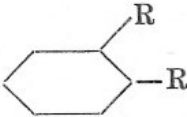
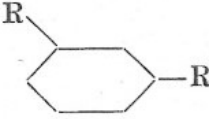
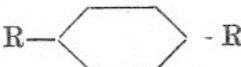
2) *Azione inibitrice del 302 I. S. sull'idrolisi da true-colinesterasi.* — È molto interessante di chiedersi qual'è il comportamento di questi esteri di fronte alla true colinesterasi, poichè noi sappiamo che quest'enzime non scinde la benzoilcolina, e poco o nulla i derivati bisostituiti.

Ora noi vediamo che l'inibizione esercitata da alcuni di questi esteri segue un ordine completamente diverso e che, nel caso della true-colinesterasi, è il derivato para che fa prova del più grande potere inibitore.

Bisogna notare che il potere inibitore dei derivati bisostituiti segue un ordine inverso sia che si tratti di pseudo che di true colinesterasi e che l'inibizione esercitata nel primo caso dal derivato orto e nel secondo caso dal derivato para, è assolutamente specifica (fig. 8).

TABELLA II.

CONFRONTO TRA GLI EFFETTI ANTICOLINESTERASICI DI 3 ESTERI DI ACIDI DICARBOSSILICI AROMATICI ISOMERI E L'AZIONE ESERINICA ESERCITATA SULLE GLANDOLE SALIVARI E L'INTESTINO ISOLATO DEL CONIGLIO

		Inibizione della true-colinesterasi	Inibizione della pseudo-colinesterasi	Secrezione salivare (cane) (1)	Contrazione dell'intestino (coniglio) (1)
R = COO CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₃ I					
	306 I.S.	0	++	0	0
	337 I.S.	++	0	+	+
	302 I.S.	++	0	+++	+++

(1) D. BOVET, F. BOVET NITTI, S. GUARINO e V. G. LONGO, Questi Rendiconti.

3) *Rapporto fra l'inibizione della true colinesterasi e l'azione eserina di alcuni esteri aromatici.* — Il fatto di poter disporre di un inibitore specifico per ognuno di questi due enzimi che potevano finora essere soltanto caratterizzati dalla natura del substrato loro offerto riveste una importanza generale particolarmente perchè permetterà di analizzare con più cura il meccanismo dell'azione dell'eserina che, come si sa, paralizza simultaneamente le due colinesterasi.

Inoltre questo fatto fa comprendere e permette di riordinare alcuni altri fenomeni in vivo ed in vitro che apparivano finora poco chiari.

I tre derivati della benzoilcolina non differiscono soltanto, infatti, per la loro azione anticolinesterasica. Se si segue la loro azione sull'intestino isolato di coniglio oppure gli effetti esercitati da essi sulle secrezioni, si constaterà che provocano reazioni colinergiche assai diverse.

Il derivato para fa contrarre violentemente l'intestino isolato di coniglio e provoca nel cane un'abbondante salivazione. Questi fenomeni sono

molto meno accentuati con il derivato meta e non si osservano del tutto con il derivato orto.

L'esame di queste reazioni poteva già far pensare ad un'azione eserinic manifestata da alcuni dei derivati sperimentati. Se si confronta poi l'azione di questi derivati in vivo e in vitro si constaterà che

a) il derivato para, il quale non ha effetto inibitore sulla pseudo colinesterasi e che blocca invece la true-colinesterasi, si dimostra come fortemente eserinic nell'animale;

b) il derivato orto il quale esercita una forte azione inibitrice sulla pseudo-colinesterasi e non impedisce l'azione della true colinesterasi si rivela senza alcun effetto di tipo eserinic nell'animale.

Ciò porterebbe una prova supplementare all'ipotesi già emessa da Gilman ⁽¹⁹⁾, Mendel ⁽²⁰⁾ ed altri secondo la quale l'intossicazione di tipo eserinic è dovuta realmente all'inibizione nel circolo della true-colinesterasi, la pseudo-colinesterasi non avendo che una funzione del tutto secondaria.

CONCLUSIONI

Lo studio, dal punto di vista della loro distruzione enzimatica, di 8 esteri alifatici e di 11 esteri aromatici della colina e del trietiletnolammonio, ci ha condotto ad alcune conclusioni di interesse generale ed ha chiarito in parte il loro meccanismo d'azione.

Abbiamo constatato che se gli esteri alifatici sono scissi sia dalle pseudo che dalla true-colinesterasi, gli esteri aromatici lo sono soltanto dalla pseudo-colinesterasi.

La distanza fra le due funzioni esteri negli alifatici, la posizione delle catene nei derivati aromatici bi-sostituiti, così come la natura del gruppo alchilico, hanno un'influenza per il processo enzimatico.

Un rapporto può essere stabilito fra la rapidità dell'idrolisi in vitro e l'azione curarizzante in vivo dal punto di vista della durata. Infatti i derivati che vengono idrolizzati più lentamente sono quelli che, per dosi meno elevate, hanno in vivo l'azione curarizzante più durevole.

Per l'azione curarizzante di questi prodotti l'eserina non soltanto non si rivela antagonista, ma aumenta invece la rapidità della morte del coniglio a cui è stato preventivamente somministrato una dose di eserina che normalmente protegge quest'animale dall'intossicazione da d-tubocurarina e da 2559 F. Questo può esser spiegato dal fatto che l'eserina è nota per inibire questi stessi enzimi che si sono rivelati capaci di idrolizzare gli esteri da noi descritti.

(19) G. B. KOELLE e A. GILMAN, J. Pharmacol. 87, 421 (1946).

(20) B. MENDEL e R. HAWKINS J. Neurophysiol., 6, 436 (1943).

In vitro l'eserina ha un'azione inibitrice sull'idrolisi degli esteri alifatici ma è priva di azione su quella degli esteri aromatici da pseudo-colinesterasi. Questo fatto apparentemente paradossale ci ha fatto pensare a un'affinità particolare di questi derivati per l'enzime e che alcuni potevano esercitare essi stessi proprietà anticolinesterasiche. Abbiamo verificato questa ipotesi e disconosciuto fra questi derivati un inibitore della pseudo-colinesterasi (il 306 I. S.) e un inibitore della true colinesterasi (il 302 I. S.). Questi inibitori appaiono come assolutamente specifici e permettono di separare l'azione dei due fermenti.

Ciò si ricollega ad alcuni fatti che avevamo già osservato in seguito all'esperimentazione in vivo ed in vitro di alcuni derivati: l'inibitore della true-colinesterasi (302 I. S.) ha azione nettamente eserinica, stimola nel cane la secrezione salivare e fa contrarre in vitro fortemente l'intestino isolato del coniglio. Il 306 I. S. invece, inibitore della pseudo-colinesterasi, non fa prova di alcuna azione eserinica nell'animale, confermando così l'ipotesi di Gilman e di Mendel secondo cui la pseudo-colinesterasi non avrebbe che una funzione puramente secondaria e non interverrebbe affatto nell'intossicazione di tipo eserinico che, secondo questi AA. sarebbe soprattutto dovuta all'inibizione nel circolo della true-colinesterasi.
