

13. Salvatore GUARINO e Daniele BOVET. — Relazioni quantitative nell'antagonismo tra l'acetilcolina ed un curaro di sintesi (2559 F.). (*)

Riassunto. — Il 2559 F. [triiodoetilato di tri-(β -dietilamminoetossi)-1,2,3-benzene] curaro di sintesi, si è dimostrato molto adatto per l'analisi quantitativa dell'antagonismo acetilcolina/curaro, sul muscolo retto addominale di rana su cui si può utilizzare una vasta gamma di dosi. La possibilità di inserire il 2559 F. in uno schema teorico in cui questo antagonista viene trattato come una molecola di falsa acetilcolina, con la proprietà di reagire con gli stessi ricettori, ma non di provocare la contrazione, s'accorda con l'ipotesi di una competizione delle due sostanze per gli stessi ricettori. La concordanza dei risultati sperimentali col nuovo schema teorico ha reso possibile approfondire alcuni aspetti della teoria generale degli antagonismi.

Résumé. — Le triiodoethylate de tri-(β -diethylaminoethoxy-1,2,3-benzene (2559 F.), s'est montré un produit adequat à l'analyse quantitative de l'antagonisme acétylcholine/curare, sur le muscle droit abdominal de grenouille, en raison de la large gamme des doses qui peuvent être utilisée. La possibilité d'introduire le 2559 F. dans un schema théorique dans lequel cet antagoniste est considéré comme une « fausse acétylcholine », dont la molécule présente la propriété d'entrer en réaction avec les mêmes recepteurs, sans provoquer cependant la contraction de l'organe, s'accorde avec l'hypothèse d'une compétition qui s'exercerait entre les deux substances, au niveau des mêmes recepteurs. La concordance des resultats experimentaux avec l'interpretation théorique proposée a permis aux auteurs d'approfondir quelques nouveaux aspects de la théorie générale des antagonismes.

Summary. — 2559 F. [tri-iodoethylate of tri(β -diethylaminoethoxy)-1,2,3-benzene], a synthetic curare, has been shown to be very suitable for the quantitative estimation of the acetylcholine/curare antagonism on the rectus abdominis muscle of the frog on account of the wide range of dosage that may be employed.

The possibility of inserting 2559 F. in a theoretical scheme in which this antagonist is considered as a molecule of « false acetylcholine » with the property of reacting with the same receptors without provoking the contractions, agrees with the hypothesis that there is a competition of the two substances for the same receptors.

(*) Comunicazione preliminare al V. Congresso della Società Italiana di Farmacologia, Padova, ottobre 1948.

The agreement of the experimental results with this theoretical scheme permits the study of some new aspects of the general theory of antagonism.

Zusammenfassung. — Das Trijodäthylat des Tri(diäthylamino-äthoxy)-1,2,3-benzol (2559 F.) erwies sich als ein sehr geeignetes Versuchsprodukt zur quantitativen Analyse des Antagonismus zwischen Curare und Acetylcholin, der am musculus rectus abdominis untersucht wurde, weil auf ihn ein grosses Dosierungsintervall anwendbar ist. Die Möglichkeit, das Produkt 2559 F. in ein theoretisches System einzuführen, in welchem dieser Antagonist als abgefälschtes Acetylcholin betrachtet wird, dessen Molekül die Eigenschaft besitzt, mit den gleichen Empfängern zu reagiren, ohne indessen die Kontraktion des Organs hervorzurufen, tritt in Einklang mit der Hypothese einer Kompetition der beiden Substanzen für die gleichen Empfänger. Die Uebereinstimmung der experimentellen Resultate mit den theoretischen Erwägungen erlaubte den Verfassern, einige neue Ansichten zur allgemeinen Theorie der Antagonismen zu vertiefen.

Mentre numerosi lavori dopo Clark ⁽¹⁾ sono stati dedicati alla relazione tra legge di azione di massa e i rapporti quantitativi che legano la quantità della sostanza attiva all'effetto farmacodinamico prodotto, il problema più complesso che pone l'interazione di due sostanze antagoniste non è stato che recentemente affrontato e non ha ricevuto che interpretazioni parziali.

I primi lavori sembrano essere quelli di Clark ⁽²⁾ sull'antagonismo acetilcolina-atropina, di Gaddum ⁽³⁾, Mendez ⁽⁴⁾, e Nanda ⁽⁵⁾ sull'antagonismo adrenalina-ergotossina, e recentemente Wells, Morris, Bull e Dragstedt ⁽⁶⁾ hanno egualmente analizzato l'aspetto quantitativo dell'antagonismo che oppone l'antistaminico all'istamina.

L'interesse a poter realizzare un preciso dosaggio degli effetti, nel campo degli spasmolitici, ha spinto d'altra parte i farmacologi a ricercare una rappresentazione numerica del valore dell'antagonismo (Miller, Becker, e Tainter, ⁽⁷⁾). Le esperienze sono state effettuate sugli organi

(1) A. J. CLARK, General Pharmacology in Heffter's Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Ergänzungswerk IV, Berlin, Springer, 1937.

(2) A. J. CLARK, J. of Physiol., 61, 547 (1926).

(3) J. H. GADDUM, J. of Physiol., 61, 141 (1926).

(4) R. MENDEZ, J. Pharmacol., 32, 451 (1928).

(5) T. C. NANDA, J. Pharmacol., 42, 9 (1931).

(6) J. A. WELLS, H. C. MORRIS, H. B. BULL e C. A. DRAGSTEDT, J. Pharmacol. 85, 122 (1945).

(7) L. C. MILLER, T. J. BECKER e M. L. TAINTER, J. Pharmacol., 92, 260 (1948).

e particolarmente sull'intestino isolato. Clark e Raventòs ⁽⁸⁾, e più recentemente Schild ⁽⁹⁾, hanno proposto di valutare il potere antagonista, per mezzo della concentrazione dell'antagonista che accresce di una porzione costante la concentrazione di un prodotto attivo necessaria per provocare un effetto arbitrariamente scelto. Il logaritmo negativo di questa concentrazione molare è stato designato sotto l'espressione di pA_x .

In realtà, l'ordine generale degli antagonismi biologici presenta ancora numerosi punti oscuri e i risultati ai quali esso ha condotto sono frequentemente discutibili.

Dal punto di vista teorico appare particolarmente che i risultati ai quali si è pervenuti non hanno chiarito il meccanismo del fenomeno dell'antagonismo farmacologico, che tuttavia presenta un reale interesse.

A questo riguardo, noi abbiamo pensato che lo studio quantitativo dell'antagonismo tra l'acetilcolina ed il curaro potesse essere utile per l'interpretazione del fattore colinergico nella trasmissione neuromuscolare.

Così abbiamo ritenuto utile studiare l'azione sull'acetilcolina del 2559 F. (triiodoetilato di tri(β -dietilamminoetossi) 1,2,3-benzene), curaro di sintesi ⁽¹⁰⁾. A questo composto si è giunti semplificando e modificando progressivamente la molecola della tubocurarina, e verificando che per la sua intensa azione curarica non è necessaria la presenza di tutti i gruppi che fanno parte della molecola.

Nello studio degli antagonismi biologici si trovano spesso risultati che variano da un autore all'altro, che sono dovuti ad imperfezioni ed ineguaglianze di tecniche [v. Clark, ⁽¹¹⁾]. Noi ci siamo avvalsi per il nostro studio della preparazione del muscolo retto addominale di rana (*Rana temporaria*) che è abbastanza sensibile all'acetilcolina, e nell'interpretazione delle curve di contrattura dei criteri esposti in altro studio ⁽¹²⁾, che permettono una più rigorosa valutazione dal punto di vista quantitativo; abbiamo inoltre tentato di applicare un nuovo schema di valutazione dell'antagonismo, il che ci è stato reso possibile dall'evidenza di un antagonismo elettivo tra il curaro di sintesi e l'acetilcolina.

I risultati ci hanno dimostrato che questa scelta poteva considerarsi felice, in primo luogo per la resistenza particolare di questo muscolo (la gamma di dosi che abbiamo utilizzato è molto vasta; essa si estende da 1 a 100 per l'acetilcolina e per il 2559 F.) e d'altra parte perchè l'azione del curaro di sintesi si è rivelata relativamente labile il che ci

⁽⁸⁾ A. J. CLARK e J. RAVENTÒS, *Quart. J. exp. Physiol.*, 26, 375 (1937).

⁽⁹⁾ H. O. SCHILD, *Brit. J. Pharmacol.*, 2, 189 (1947).

⁽¹⁰⁾ D. BOVET, F. DEPIERRE e Y. DE LESTRANGE, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 225, 74 (1947). D. BOVET e F. BOVET NITTI, *questi Rendiconti*.

⁽¹¹⁾ A. J. CLARK, *op. cit.*

⁽¹²⁾ S. GUARINO, *questi Rendiconti*.

ha permesso di ottenere nei nostri risultati apparenti anomalie che spieghino in realtà in modo nuovo l'ipotesi di una competizione reciproca al livello dei ricettori.

Il fenomeno esaminato ha tre variabili: la concentrazione della sostanza attiva, la concentrazione della sostanza inibitrice e l'intensità della risposta biologica prodotta.

Mentre la maggioranza degli autori hanno analizzato il fenomeno dell'antagonismo solo sotto qualche aspetto, noi abbiamo esaminato successivamente tre punti di vista ricercando:

1) Il rapporto tra l'intensità della risposta e la dose di sostanza attiva (acetilcolina), rimanendo costante la concentrazione dell'antagonista (2559 F.) (*).

2) Il rapporto tra l'intensità della risposta e la dose dell'antagonista, rimanendo costante la concentrazione della sostanza attiva.

3) Le quantità di sostanza attiva e di antagonista capaci di provocare una risposta farmacologica (elevazione del tono del muscolo) della stessa intensità.

TECNICA

Il muscolo retto addominale veniva sospeso ad una leva isotonica ed immerso in una soluzione di Ringer (**). Il bagno era di 100 cm³. Le contratture venivano eseguite ogni 30 minuti. Dopo una o più contratture con la sola acetilcolina (***), venivano eseguite le contratture in presenza del TEP che era aggiunto 5 min. prima al bagno.

L'altezza era misurata solo al punto in cui la curva di contrattura diventava assintotica.

PRIMA RELAZIONE: ACETILCOLINA VARIABILE; TEP COSTANTE

Finora veniva generalmente ammesso che in un antagonismo potesse esistere un equilibrio tra le due sostanze competitive anche se l'azione di una costante quantità della sostanza antagonista su differenti quantità della sostanza attiva fosse sempre costante, cioè non cambiasse valore a secondo del rapporto tra le concentrazioni di sostanza attiva e di antagonista. Anzi è proprio su queste basi che Gaddum (1937) ⁽¹³⁾, a

(*) Il prodotto 2559 F. che è egualmente stato chiamato sotto il nome 3697 R. P., Sincurarina e Flaxedil, viene qui per comodità chiamato sotto il nome di TEP di cui le iniziali ricordano che è un derivato con tre catene con etili del pirogallolo.

(**) 0/100 g NaCl	g. 6,5
KCl	0,2
CaCl ₂	0,18
Na ₂ HPO ₄	0,5

(***) Acetilcolina bromuro.

⁽¹³⁾ J. H. GADDUM, J. Physiol., 89, 7 P (1937)

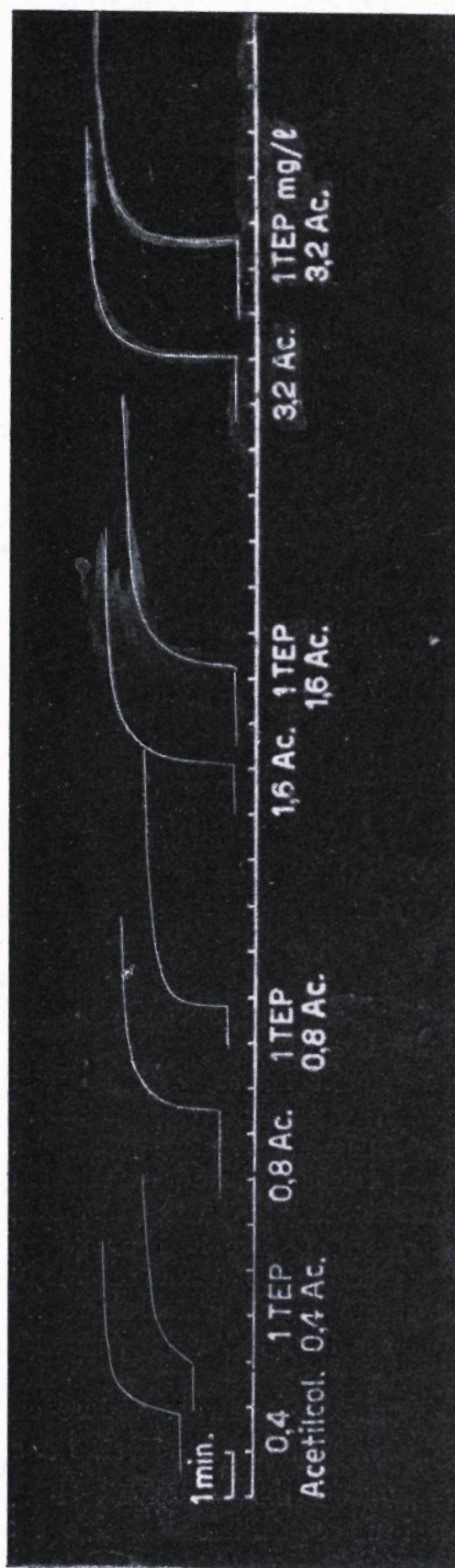


FIGURA 1-a

I^a RELAZIONE: *acetilcolina variabile*, TEP (2559 F.) *costante*. Preparazione del muscolo retto addominale di Rana. La prima, la terza, la quinta e la settima curva sono state ottenute aggiungendo al Ringer quantità variabili e crescenti di acetilcolina. La seconda, la quarta, la sesta, la ottava sono state ottenute con la stessa quantità di acetilcolina della contrazione immediatamente precedente, ma cinque minuti prima della contrazione si è aggiunto ogni volta una quantità eguale del curaro (1 mg/l). Si osserva che quanto più aumenta la concentrazione dell'acetilcolina, il curaro ha un effetto sempre più piccolo. L'intervallo tra una contrazione e la successiva è stato ogni volta di trenta minuti.

proposito dell'antagonismo acetilcolina-atropina, formulò la sua equazione, che voleva interpretare l'antagonismo sulla base della legge di azione di massa tra questi tre fattori: l'antagonista, la sostanza attiva, e il ricettore.

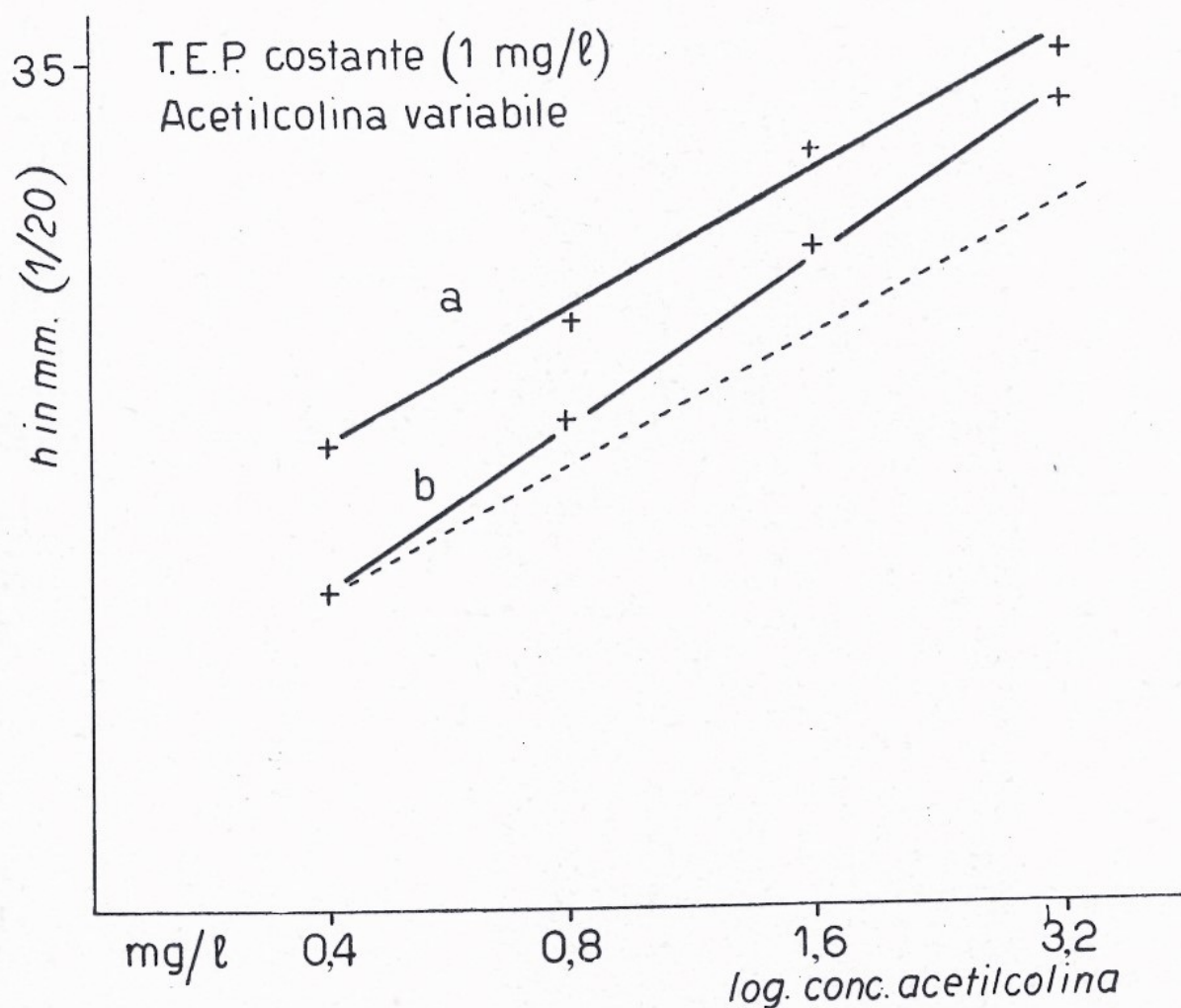


FIGURA 1-b)

Rappresentazione grafica dei valori ottenuti nell'esperienza precedente. Sull'asse delle ordinate è rappresentata l'altezza di ogni contrazione in mm. Sull'asse delle ascisse sono rappresentati i logaritmi della concentrazione in acetilcolina. La linea a) congiunge i valori delle altezze ottenute con le quantità crescenti di acetilcolina; la linea b) congiunge i valori delle altezze ottenute con le quantità crescenti di acetilcolina più la quantità costante di curaro. Le due linee sono convergenti, il che dimostra graficamente come l'influenza del curaro diminuisca con l'aumento della concentrazione in acetilcolina. Se il curaro avesse avuto sempre lo stesso effetto, il risultato delle esperienze avrebbe dato la linea tratteggiata, parallela alla linea a)

Nelle nostre esperienze abbiamo potuto invece vedere che l'azione di una costante quantità del TEP assume un valore diverso a seconda della più o meno forte concentrazione di acetilcolina (Fig. 1).

Se quindi poteva ammettersi un equilibrio tra due sostanze anche se quantità costanti dell'antagonista avevano sempre lo stesso effetto su diverse quantità della sostanza attiva, ci sembra che a maggior ra-

gione deve ammettersi un equilibrio di competizione tra due sostanze quando, come nel nostro caso, quantità costanti dell'antagonista hanno valore diverso a seconda del loro rapporto di concentrazione con la sostanza attiva. La differenza tra i dati precedenti e quelli risultanti dalle nostre esperienze si può spiegare tenendo presente la vasta gamma di concentrazioni della sostanza attiva che si è potuta sperimentare in questa preparazione del muscolo retto addominale di rana, e che probabilmente tra il curaro di sintesi e l'acetilcolina esiste un equilibrio più completo di quelli che finora avevano attirato l'attenzione dei ricercatori, in modo che questo equilibrio può essere messo in evidenza con maggior facilità.

SECONDA RELAZIONE: ACETILCOLINA COSTANTE; TEP VARIABILE

Se il valore effettivo di diverse quantità di TEP dipende dalla concentrazione di acetilcolina, e se quindi l'acetilcolina sposta l'equilibrio di reazione del TEP, bisogna dedurre che con costanti concentrazioni di acetilcolina, le curve che rappresentano il rapporto azione/concentrazione di TEP presentano una inclinazione differente a seconda della quantità arbitrariamente scelta di acetilcolina. Le seguenti esperienze dimostrano che le curve con 3 mg/l di acetilcolina e con 1 mg/l di acetilcolina hanno una pendenza differente, e precisamente quando la quantità della sostanza attiva (acetilcolina) è più debole, l'angolo di inclinazione è più forte, come se la stessa quantità di curaro fosse più attiva (fig. 2).

Inoltre vi è da fare un'altra osservazione. Le due linee a e b della figura (2) non sono rette, ma sono concave verso il basso. Invece quando viene messa in relazione la concentrazione di diverse quantità di acetilcolina (in logaritmi), e il loro effetto, si ha come risultato una retta, come risulta dalla letteratura ⁽¹⁴⁾, e anche dalle nostre esperienze (linea a della fig. (1)).

Se si suppone che il curaro si fissi agli stessi ricettori dell'acetilcolina, si dovrebbe dedurre che anche per il TEP dovrebbe valere la stessa relazione lineare tra concentrazione (in logaritmi) ed effetto (diminuzione della contrattura da acetilcolina); la curva che invece si ha dall'esperienza sta ad indicare anche qui che il *valore effettivo del TEP dipende dal rapporto* $[TEP]/[acetilcolina]$, cioè, come quantità eguali di acetilcolina hanno valore differente secondo la quantità di TEP presente, così quantità eguali di curaro hanno valore differente secondo la quantità di acetilcolina presente; e precisamente, quanto più è debole la concentrazione del curaro, tanto più l'acetilcolina influisce sul suo equilibrio, e ne diminuisce così, in realtà, l'azione.

(14) A. J. CLARK, op. cit, pag. 69.

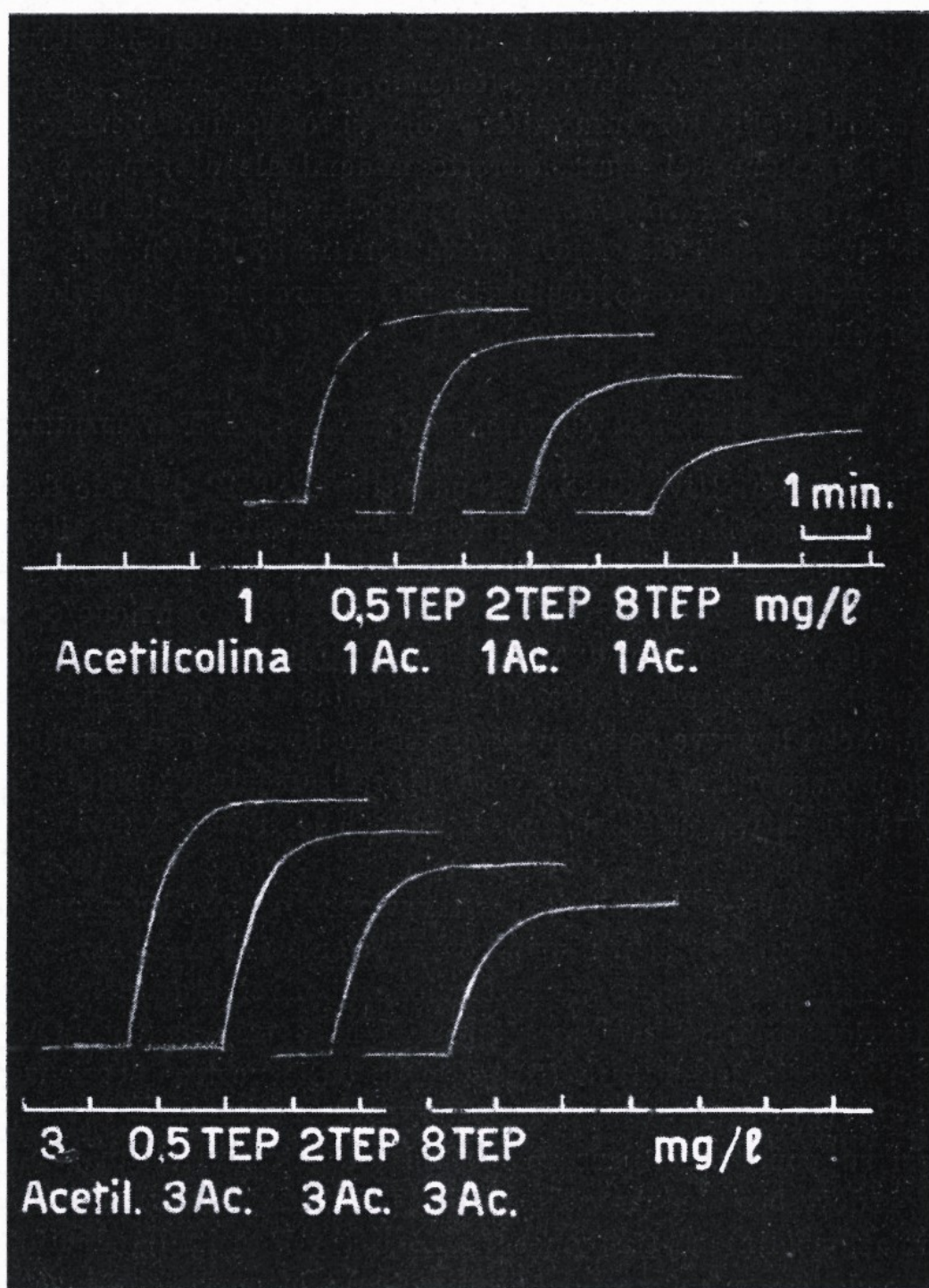


FIGURA 2-a)

II^a RELAZIONE: *acetilcolina costante, TEP (2559 F.) variabile.* Preparazione del muscolo retto addominale di Rana. Quantità variabili e crescenti del curaro (0,5; 2; 8 mg/l) sono state aggiunte cinque minuti prima della contrazione ottenuta con 1 mg/l di acetilcolina (in alto) e con 3 mg/l di acetilcolina (in basso). L'effetto del curaro è più spiccato con l'aumento della sua concentrazione.

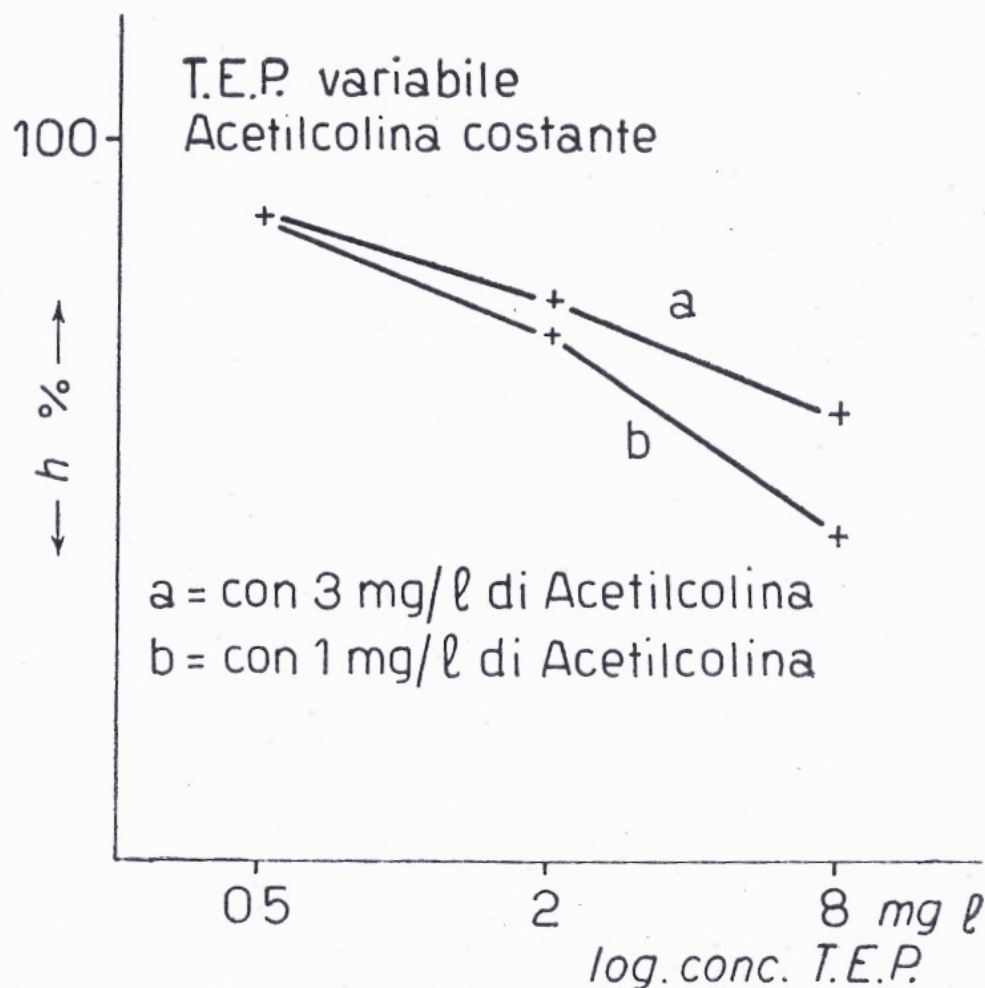


FIGURA 2-b)

Diagramma costruito sui valori dati dall'esperienza precedente. Sull'asse delle ordinate, sono rappresentati i valori ottenuti nelle varie contrazioni, riferiti all'altezza di contrazione ottenuta con la sola acetilcolina senza curaro; sull'asse delle ascisse sono rappresentati i logaritmi delle diverse concentrazioni del curaro. La linea a) congiunge i valori delle contrazioni ottenute con 1 mg/l di acetilcolina; la linea b) congiunge i valori delle contrazioni ottenute con 3 mg/l di acetilcolina. Le due curve sono concave verso il basso, il che dimostra come il curaro abbia maggiore efficacia con l'aumento della concentrazione. L'angolo di inclinazione della curva b) è più forte dell'angolo di inclinazione della curva a), come se la stessa quantità di curaro fosse più attiva quanto più è debole la concentrazione dell'acetilcolina.

TERZA RELAZIONE: ALTEZZA DI CONTRATTURA COSTANTE;
ACETILCOLINA E TEP VARIABILI

Ammettiamo ora l'ipotesi contraria di quella fin qui seguita, cioè che le molecole di acetilcolina e di TEP non interferiscono l'una con l'al-

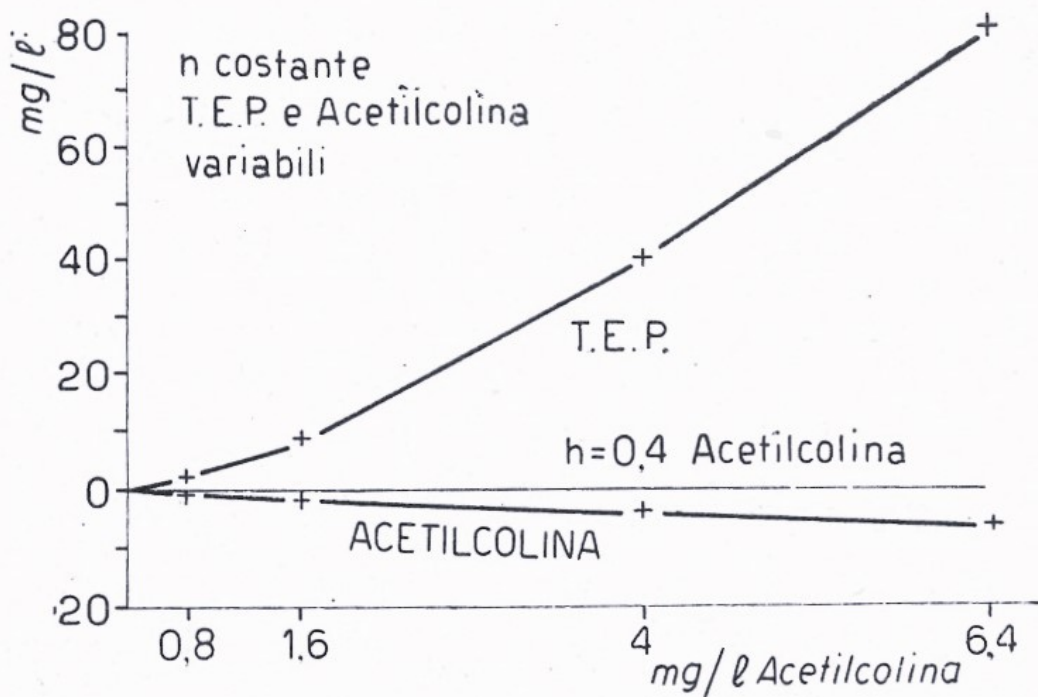


FIGURA 3.

III^a RELAZIONE: altezza di contrattura costante, acetilcolina variabile e TEP (2559 F.) variabile. Nell'esperienza si sono voluti osservare con quali differenti valori di acetilcolina e del curaro si raggiungesse sempre la stessa altezza di contrazione ottenuta con una quantità più piccola di acetilcolina. Sull'asse delle ascisse sono rappresentati i valori delle varie concentrazioni di acetilcolina. Sull'asse delle ordinate la linea *h* indica l'altezza di contrazione ottenuta con 0,4 mg/l di acetilcolina. Al di sopra della linea *h* sono rappresentate le concentrazioni del curaro; al di sotto le concentrazioni di acetilcolina. Si ha così, per ogni valore dell'acetilcolina impiegata, (da leggere sull'asse delle ascisse), le differenti concentrazioni di acetilcolina e di TEP necessarie per ottenere costantemente l'altezza di contrazione corrispondente a 0,4 mg/l di acetilcolina. Per rendere evidente la figura, si sono dovute rappresentare le stesse quantità di acetilcolina su due scale differenti sull'ascissa e sull'ordinata. Si osserva che le quantità del curaro aumentano molto più rapidamente che le quantità dell'acetilcolina.

tra, ma agiscono su ricettori differenti con equilibri differenti; se fosse così, per ottenere sempre la stessa contrattura del muscolo con quantità variabili di acetilcolina e di curaro, basterebbe impiegare valori multipli dell'una e dell'altro.

L'esperienza invece dimostra che proprio in questo caso si hanno gli scarti più forti tra le concentrazioni delle due sostanze: mentre si fanno aumentare le quantità di acetilcolina, le quantità di curaro necessarie per mantenere costante l'altezza di contrattura aumentano in misura molto maggiore; così, per ottenere l'effetto che hanno 0,8 mg/l di acetil-

colina e 1,9 mg/l di TEP, occorrono, con 6,4 mg/l di acetilcolina, ben 80 mg/l di TEP; cioè l'acetilcolina aumenta in proporzione da 1 a 8, mentre il curaro da 1 a 42.

Nel seguente diagramma si distingue come variano relativamente le quantità rispettive di acetilcolina, perchè rimanga costante l'effetto corrispondente a 0,4 mg/l di acetilcolina (fig. 3).

Il risultato di queste esperienze dimostra ancora, e con efficacia, che il valore effettivo di diverse quantità di TEP dipende dalla concentrazione di acetilcolina, e che l'acetilcolina sposta l'equilibrio del TEP.

Avendo avuto la concordanza di risultati in tutte le esperienze eseguite, siamo andati alla ricerca più che di una qualsiasi rappresentazione numerica, che ci avrebbe poco chiarito sul significato, piuttosto di una interpretazione del fenomeno del differente comportamento delle due sostanze, la sostanza attiva e l'antagonista.

Ci siamo quindi soffermati su alcuni criteri di misura dell'attività antagonista, che coinvolgono concezioni teoriche, cui i nostri risultati ottenuti da una particolare preparazione e su di un particolare antagonismo, non risulterebbero conformi.

SE È COSTANTE LA QUANTITÀ DI TEP NECESSARIA A RIDURRE A $\frac{x}{n}$
L'EFFETTO DI UNA QUANTITÀ X DI ACETILCOLINA, PER DIVERSE
CONCENTRAZIONI DI ACETILCOLINA

A Clark e Raventòs (1937 ⁽¹⁵⁾) risale la proposta di usare come misura dell'attività di un antagonista la concentrazione che riesce a neutralizzare gli effetti di un aumento, ad es. di 10 volte della concentrazione della sostanza attiva.

Basandosi su questo concetto, Schild ⁽¹⁶⁾ ha recentemente proposto una interessante notazione per lo studio degli antagonismi biologici. Col termine di pA_x (in cui x è scelto arbitrariamente) viene indicato il logaritmo negativo di base 10 della concentrazione molare dell'antagonista, che altera nella proporzione scelta (x), la concentrazione della sostanza attiva necessaria a produrre un determinato effetto. Il pA_x sarebbe statisticamente costante.

Perchè questo sia, la concentrazione assoluta della sostanza attiva non deve entrare nella definizione del pA_x , cioè il valore di pA_x deve essere eguale a qualsiasi concentrazione della sostanza attiva. Nel nostro caso, però, poichè le rette che rappresentano l'azione di diverse quantità di acetilcolina in presenza e in assenza di curaro non sono parallele, e tendono ad incontrarsi verso l'alto, con quantità maggiori della varia-

(15) A. J. CLARK e J. RAVENTÒS, Quart. J. exp. Physiol., 26, 375 (1937).

(16) H. O. SCHILD, Brit. J. Pharmacol., 2, 189 (1947).

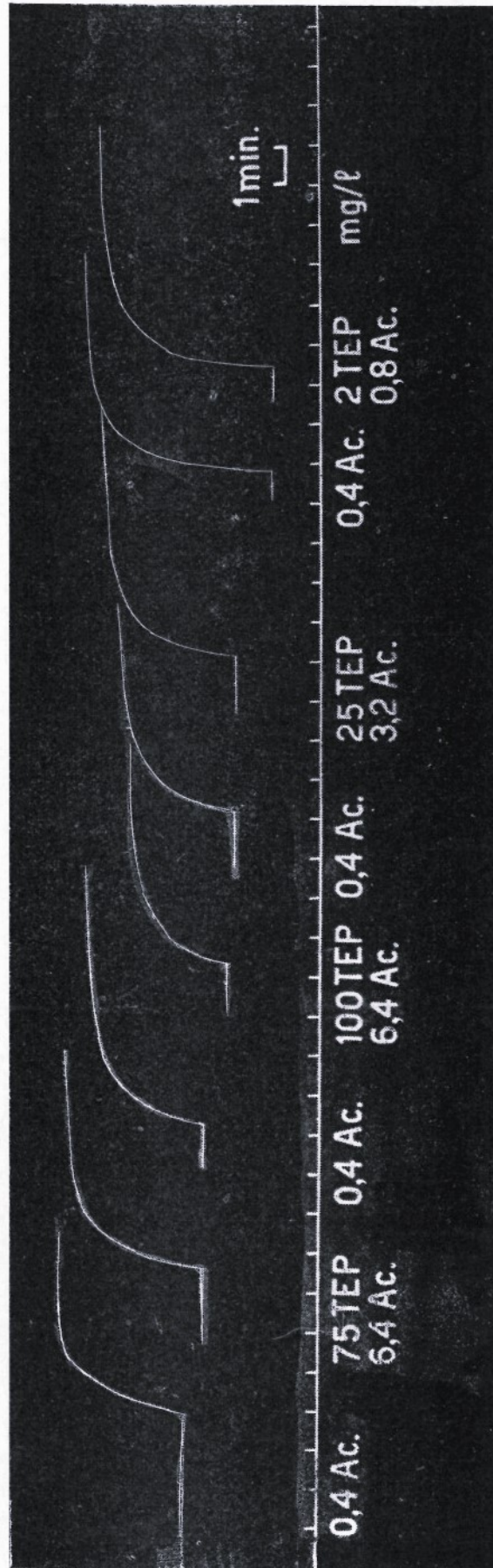


FIGURA 4.

Esempio di una serie di determinazioni in relazione al diagramma precedente. L'intervallo tra due è stato sempre di 30 min., ed il 2559 F. veniva aggiunto solo 5 minuti prima al Ringer. Un tempo di contatto più lungo avrebbe potuto mascherare i fenomeni di equilibrio messi in evidenza.

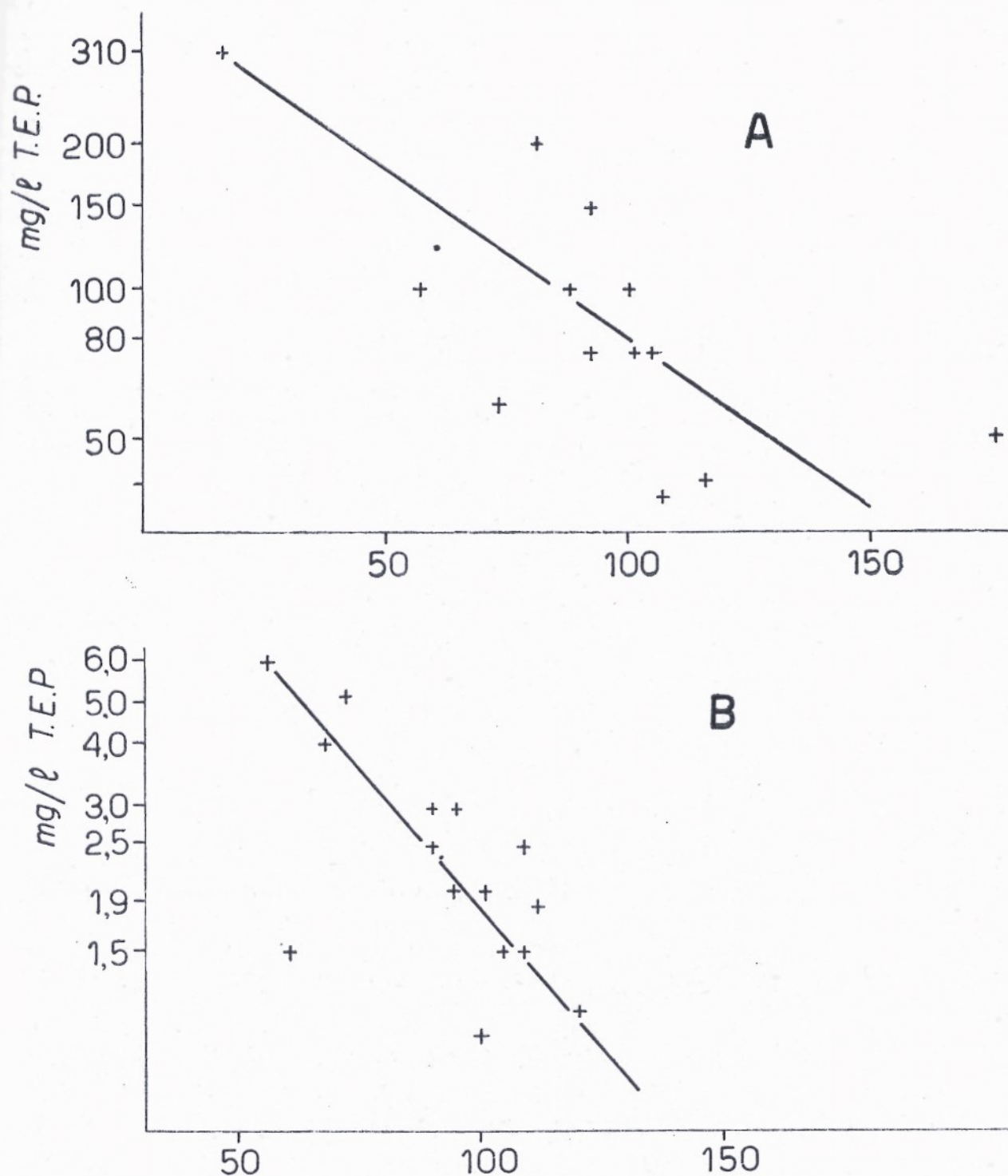


FIGURA 5.

III^a RELAZIONE: Altezza di contrattura costante, acetilcolina e curaro variabili. Determinazione dei valori di TEP (2559 F.) necessari per diminuire all'effetto di 0,4 mg/l di acetilcolina, 6,4 mg/l di acetilcolina A), e 0,8 mg/l di acetilcolina B). L'altezza di contrattura ottenuta con 0,4 mg/l di acetilcolina viene eguagliata a 100. La linea retta che rappresenta con maggiore probabilità i vari punti fornisce il valore cercato, che è quello dell'ordinata che corrisponde all'ascissa = 100

bile acetilcolina, sembra che il pA_x non dovrebbe essere costante. Così, abbiamo cercato di determinare il pA_2 a varie concentrazioni di acetilcolina.

TABELLA I.

Conc. molare di acetilcolina br.		Conc. molare del TEP necessario per renderle equivalenti a $\left(\frac{x}{2}\right)$	
	— log. conc.		— log. conc. (= pA_2)
$3,5 \times 10^{-6}$	5,45	$2,1 \times 10^{-6}$	5,67
$1,77 \times 10^{-5}$	4,75	$4,4 \times 10^{-6}$	5,35
$8,8 \times 10^{-5}$	4,05	$7,2 \times 10^{-6}$	5,14

Quindi i valori di pA_2 sono differenti secondo la concentrazione in acetilcolina, in accordo con l'ipotesi che secondo la quantità di acetilcolina varia la quantità di TEP fissata ai ricettori.

Bisogna quindi anche prevedere che i valori di pA_2 e pA_{10} , secondo la notazione di Schild, sono differenti di un valore superiore a 0,7 (=log 5). Infatti per una concentrazione di acetilcolina di $10^{-5,75}$, si ha $pA_2=5,67$, e $pA_{10}=4,34$.

CONSIDERAZIONI SUL CONCETTO DI pA_x

Come risulta dai dati precedenti, i presupposti del concetto di pA_x cioè che questo valore è indipendente dalla concentrazione della sostanza attiva, si dimostrano non validi per quanto riguarda l'antagonismo tra acetilcolina e TEP, in cui gioca una grande influenza la concentrazione relativa delle due sostanze.

Ma veramente anche secondo i risultati numerici citati da Schild, i valori di pA_2 e pA_{10} , nella quasi generalità degli antagonismi da lui considerati, non sono corrispondenti.

Per la sola coppia acetilcolina-atropina vi è una stretta proporzionalità tra le concentrazioni della droga e quella dell'antagonista, cioè a un aumento di cinque volte dell'una (da pA_2 a pA_{10}), corrisponde un aumento di cinque volte dell'altra. In tutti gli altri casi veniva richiesto un aumento di 10 volte, o anche più grande, dell'antagonista per equilibrare l'aumento di 5 volte della concentrazione della sostanza attiva. Ad es. per la coppia acetilcolina-petidina, occorre un aumento di 13 volte della concentrazione della petidina. Schild ammette che una proporzionalità lineare tra droga e antagonista a piccole concentrazioni dell'antagonista è di chiara evidenza contro l'esistenza di una semplice relazione di azione di massa, e che la differenza tra pA_2 e pA_{10} fornisce una prova quantitativa per l'ipotesi che gli antagonisti competano

con la sostanza attiva per gli stessi ricettori secondo una semplice relazione di azione di massa.

Così la differenza tra i valori di pA_2 e pA_{10} (quando pA_{10} è più di 5 volte pA_2) è giustamente interpretata come prova dell'influenza reciproca delle due sostanze antagoniste sull'equilibrio di ciascuna.

Ma, ammesso questo principio, ci sembra difficile potersi poi sostenere già in linea teorica che il pA_x è indipendente dalla concentrazione della sostanza attiva. Esso risulta essere indipendente solo nei casi in cui vi è una stretta proporzionalità tra aumento della concentrazione dalla sostanza attiva e aumento della concentrazione della sostanza antagonista, cioè nei casi in cui viene ammesso che nell'antagonismo non interviene precisamente la competizione.

Si deve ammettere che il criterio di pA_x può essere accettato soltanto quando si fissi la quantità della sostanza attiva ad una quantità arbitraria che può variare secondo la natura della preparazione e della sostanza attiva e che potrebbe stabilirsi come un sottomultiplo di una soluzione molare della sostanza attiva.

Come risulta quindi dai dati di Schild sulle coppie antagoniste da lui studiate, anche quando vi è una differenza sensibile nei valori di pA_2 e pA_{10} cioè nelle differenti concentrazioni della sostanza attiva e dell'antagonista necessarie ad avere lo stesso effetto, le curve concentrazione-azione della sostanza attiva in presenza o in assenza dell'antagonista sembrano rappresentate da rette parallele. Ciò mette in evidenza che l'antagonismo competitivo è in questo caso difficilmente evidenziabile, in generale. Crediamo questo un dato di fatto importante per una teoria dell'antagonismo.

INTERPRETAZIONE DELL'ANTAGONISMO

Per una interpretazione complessiva dei dati avuti dalle esperienze nelle varie relazioni prese in considerazione tra i tre fattori, sostanza attiva (acetilcolina), sostanza antagonista (curaro), e risposta farmacologica, crediamo che si debba tener presente:

1) che non è possibile una relazione del tipo: $[\text{acetilcolina}]^x$ equivale $[\text{TEP}]$, perchè mentre le quantità di TEP aumentano molto più che quelle di acetilcolina per mantenere costante l'effetto, quando invece si considerino le quantità di TEP necessarie per diminuire alla metà l'effetto di diverse concentrazioni di acetilcolina (differenti valori di pA_2), si trova che in questo caso è l'acetilcolina che aumenta più rapidamente, il che quindi giustificherebbe la relazione inversa: $[\text{TEP}]^x$ equivale $[\text{acetilcolina}]$.

2) che nello studio degli antagonismi si è generalmente trovato (Schild) ⁽¹⁶⁾ che quando esiste un equilibrio tra le due sostanze è sempre l'antagonista che aumenta molto più rapidamente della sostanza attiva per mantenere costante l'effetto (vedi la differenza tra pA_2 e pA_{10} nell'antagonismo dell'acetilcolina con benadryl (*) e dolantin (petidina) (**), e dell'istamina con atropina, benadryl, dolantin e neoantergan (***) il che dimostra che il fenomeno si manifesta costantemente anche in antagonismi di natura chimica completamente diversi).

Essendo inoltre questo caso, delle differenti concentrazioni delle due sostanze per ottenere lo stesso effetto, quello in cui vi è un maggiore scarto di valori tra le due sostanze antagoniste, e l'andamento delle curve delle concentrazioni delle due sostanze è notevolmente diverso, abbiamo pensato che questa differenza poteva essere presa come base per arrivare ad una interpretazione che permettesse poi di giustificare anche le altre relazioni dell'antagonismo.

Il seguente schema logico crediamo che ci permetta di chiarirci sulla questione.

Essendo uno schema teorico, coè valido nei casi limite, possiamo considerare idealmente il TEP come una molecola di pseudo-acetilcolina, capace di reagire con i ricettori con lo stesso equilibrio dell'acetilcolina, ma non capace di provocare la contrattura del muscolo.

Aggiungendo al Ringer una certa quantità $[x]$ di acetilcolina, il muscolo si contrae con una certa altezza. Se, dopo aver lavato, aggiungiamo una quantità doppia $[2x]$, il muscolo si contrarrà con una ampiezza maggiore. Ma, se oltre alla quantità $[2x]$ della vera acetilcolina, noi aggiungiamo al Ringer un egual numero di molecole $[2x]$ della falsa acetilcolina, i ricettori potranno egualmente reagire con le due quantità eguali della vera acetilcolina e della falsa; e quindi, per un noto teorema di probabilità, la probabilità di reagire, cioè la quantità che effettivamente reagisce dell'acetilcolina vera, sarà la metà della quantità di acetilcolina vera in soluzione, e si ha una altezza di contrattura eguale alla prima, perchè $2x$ (la quantità doppia di ac.) $\times \frac{1}{2}$ (la probabilità che è metà) = x , cioè alla attività precedente.

Cioè in generale, se si vuol raggiungere costantemente l'effetto di una quantità $[x]$ di acetilcolina, usando una quantità maggiore, ad es. $[n x]$, bisogna diminuire la probabilità di reagire di questa quantità mettendo in soluzione un numero di molecole della pseudoacetilcolina tale che la quantità di acetilcolina vera sia $\frac{1}{n}$ del numero totale di mo-

(*) etere dimetilamminoetilico del benzidrola.

(**) estere etilico dell'acido N-metil-4-fenilpiperidin-4-carbonico.

(***) N-p-metossibenzil-N-dimetilamminoetil- α -amminopiridina.

lecole; in tal caso infatti la quantità di sostanza attiva è sempre costante ed eguale a x :

$$[nx] \times \frac{1}{n} = [x]$$

Vediamo nel seguente specchietto come dovrebbero aumentare le quantità di pseudo-acetilcolina rispetto a quelle attive, per ottenere sempre lo stesso effetto x :

Acetilcolina attiva (x)	Acetilcolina inattiva (y) _{$x=y$}
x	0
$2x$	$2y$
$4x$	$12y$
$8x$	$56y$
$16x$	$240y$
$32x$	$992y$

In generale ogni termine di y è uguale a $n(n-1)x_{x=y}$ e il rapporto tra le quantità di y corrispondenti a ridurre all'attività di x due termini successivi n_1x e n_2x è:

$$\frac{n_1(n_1-1)}{n_2(n_2-1)}$$

Questo schema ha per presupposto che $y=x$ cioè che le due molecole di acetilcolina e di TEP si equivalgono quanto all'affinità per i ricettori; poichè ciò non è così, i valori di y vanno naturalmente moltiplicati per $\frac{x}{y}$ (che si deduce bene dalla quantità di TEP che rende equivalente alla metà l'azione di una certa concentrazione di acetilcolina. In questo caso infatti il numero di molecole di acetilcolina deve equivalere al numero di molecole di TEP, e dal loro rapporto si può giudicare la rispettiva affinità di questi composti per i ricettori muscolari).

I valori ottenuti dall'antagonismo tra TEP e acetilcolina confermano generalmente la validità di questo schema (Fig. 6). Le differenze dei risultati con quelli previsti teoricamente possono essere spiegate tenendo presente il fatto che dopo una contrattura in presenza di una notevole quantità di curaro, le prime contratture successive senza il curaro risentono ancora una depressione, che è progressivamente minore (Fig. 7).

E' chiaro che se esiste una depressione nelle successive contratture in cui vi è solo acetilcolina, una parte delle molecole del curaro deve sfuggire all'equilibrio con l'acetilcolina, che presuppone un equilibrio mobile; probabilmente perchè si fissa più tenacemente ai ricettori. Anche eseguendo delle contratture con la sola acetilcolina in forti quantità, sembra

che una parte di essa si fissi più stabilmente al muscolo, perchè, anche dopo il lavaggio, il muscolo non torna alla linea di riposo. Quindi se ciò succede per l'acetilcolina, si può ammettere che avvenga anche col curaro. E' notevole che questa fissazione del curaro è più accentuata e persistente con la tubocurarina che ha una molecola più grossa e pesante,

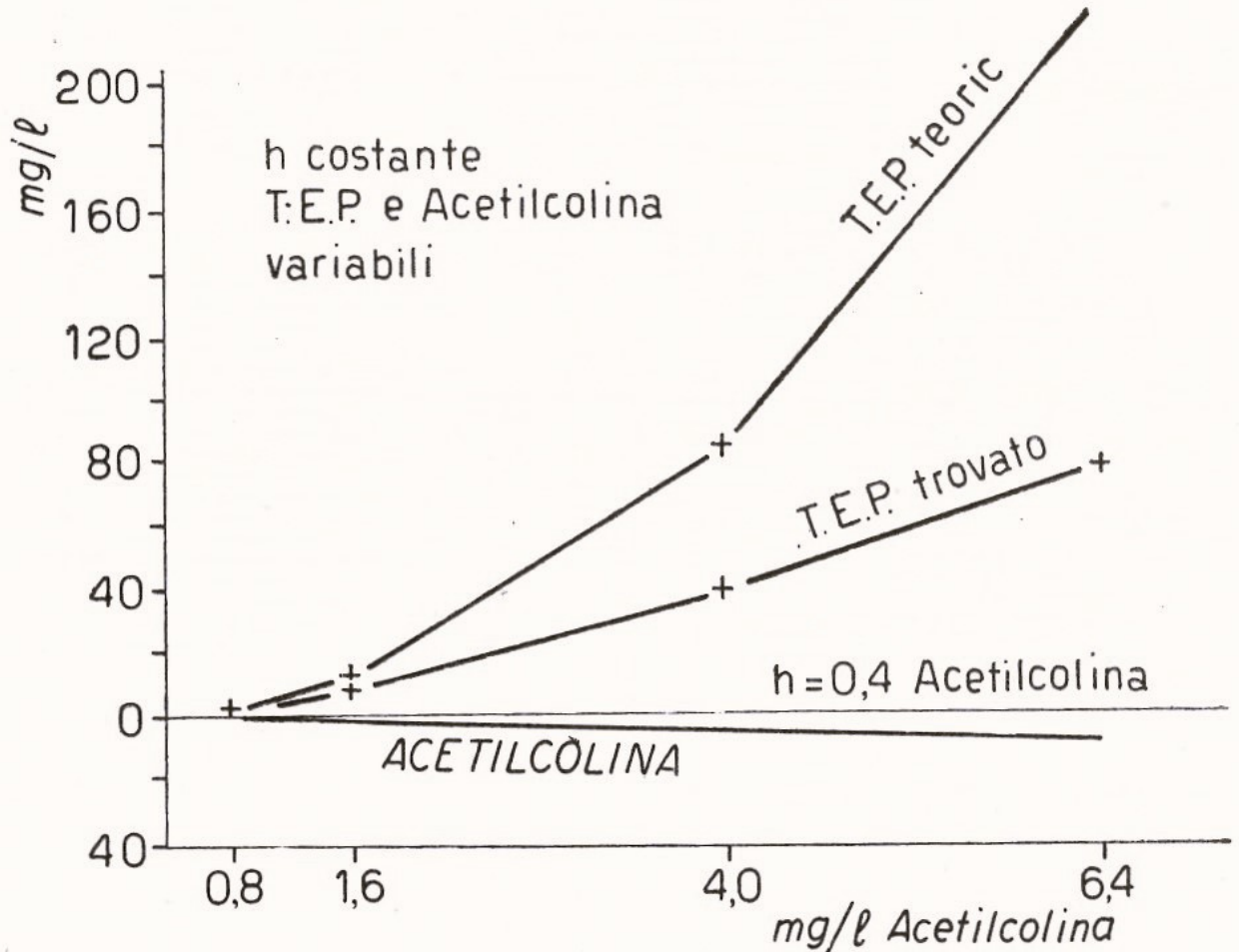


FIGURA 6.

Natura competitiva dell'antagonismo tra curaro e acetilcolina, e l'ipotesi della pseudoacetilcolina. La curva ottenuta con i valori sperimentali ha lo stesso andamento di quella secondo l'equazione $y=n(n-1)x$ (TEP teorico). La differenza tra le due serie di valori è dovuta alla depressione postcurarica.

che col TEP. Questa azione postcurarica è proporzionale in certo modo alla concentrazione del curaro, ed è minima e trascurabile alle piccole dosi di curaro. Così si può spiegare come i valori ottenuti siano più divergenti con l'aumento della quantità di TEP, perchè, sfuggendo una parte del TEP all'equilibrio, ne occorrono quantità minori della previsione, come si può notare confrontando con quelli teorici i valori ottenuti con l'esperimento nel riguardo di quella dose di curaro che riesce a diminuire una dose x di acetilcolina al valore di $\frac{x}{2}$, che teoricamente dovrebbe aumentare proporzionalmente all'aumento della acetilcolina, e invece aumenta, ma con variazioni in meno, quanto più aumenta la quantità di curaro.

Vediamo ora se è possibile eliminare nel calcolo questa depressione postcurarica, in modo da osservare se senza di essa, i valori sperimentali sono eguali a quelli teorici. Consideriamo il caso della quantità di curaro necessaria a ridurre a 0,4 mg/l l'azione di 6,4 mg/l di acetilcolina. Basta considerare che nella contrattura in presenza di curaro il numero

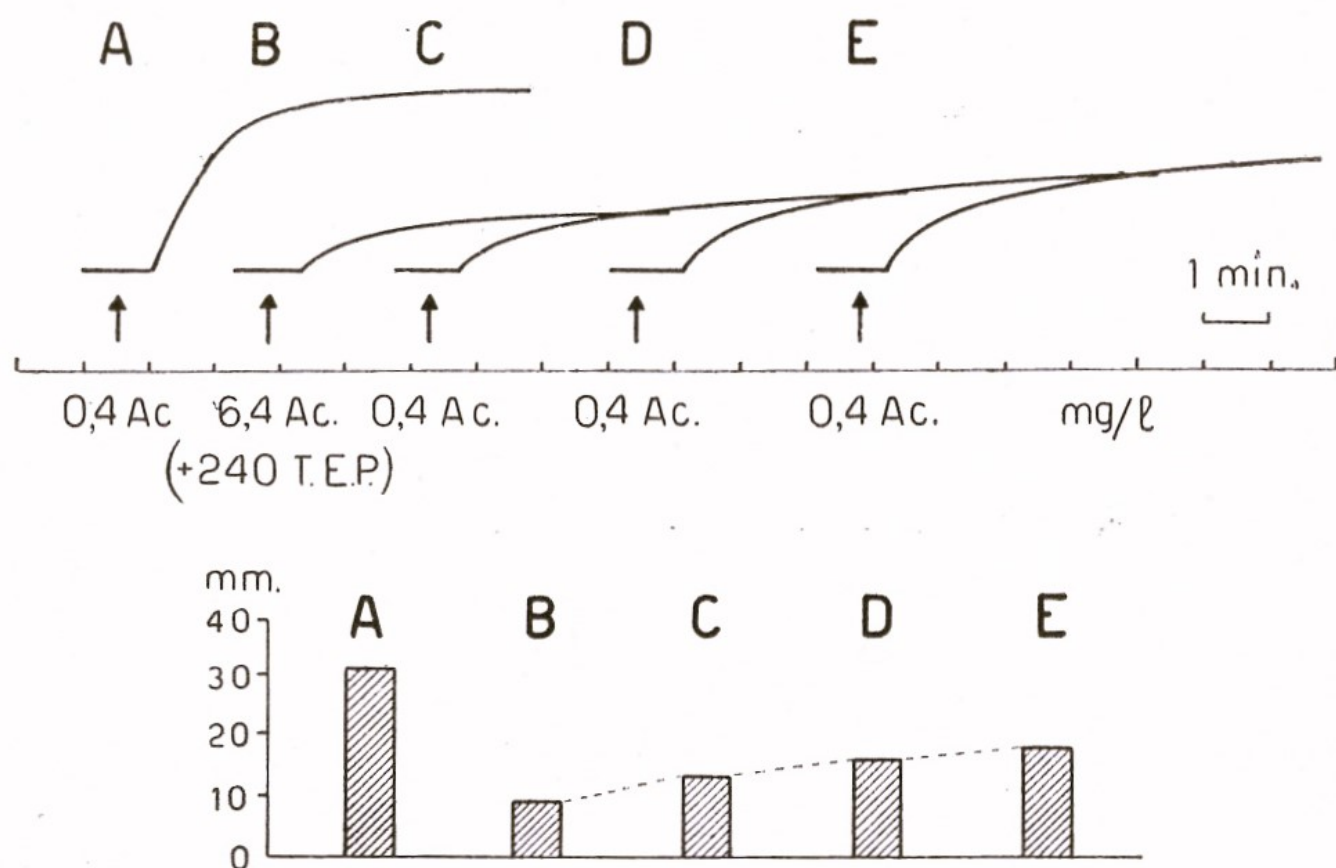


FIGURA 7.

Depressione postcurarica. Dopo una contrattura in presenza di 240 mg/l di 2559 F. e 6,4 mg/l di acetilcolina, le successive contratture con 0,4 mg/l di acetilcolina rimangono più piccole. Questa depressione va man mano scomparendo nelle successive contratture. Essa è probabilmente dovuta ad una parte delle molecole del 2559 F. che si è fissata più stabilmente al muscolo

di ricettori liberi, per cui si svolge l'equilibrio acetilcolina/TEP, cioè non fissati stabilmente dal TEP, deve essere minore del numero di ricettori liberi nella successiva contrattura con la sola quantità 0,4 mg/l di acetilcolina, perchè in questa si è già cominciata a liberarsi parte di quelle molecole di TEP che tenevano fissati stabilmente i ricettori. Così difatti si trova che il numero dei ricettori liberi nella prima contrattura postcurarica è ancora più piccolo di quello della seconda contrattura postcurarica, in cui è continuato il processo di liberazione dei ricettori fissati stabilmente dal TEP (Fig. 7).

Così l'altezza di contrattura alla quale deve essere ridotta l'efficacia di 6,4 mg/l di acetilcolina, deve essere quella stessa che si avrebbe con 0,4 mg/l di acetilcolina in presenza dello stesso numero di ricettori liberi

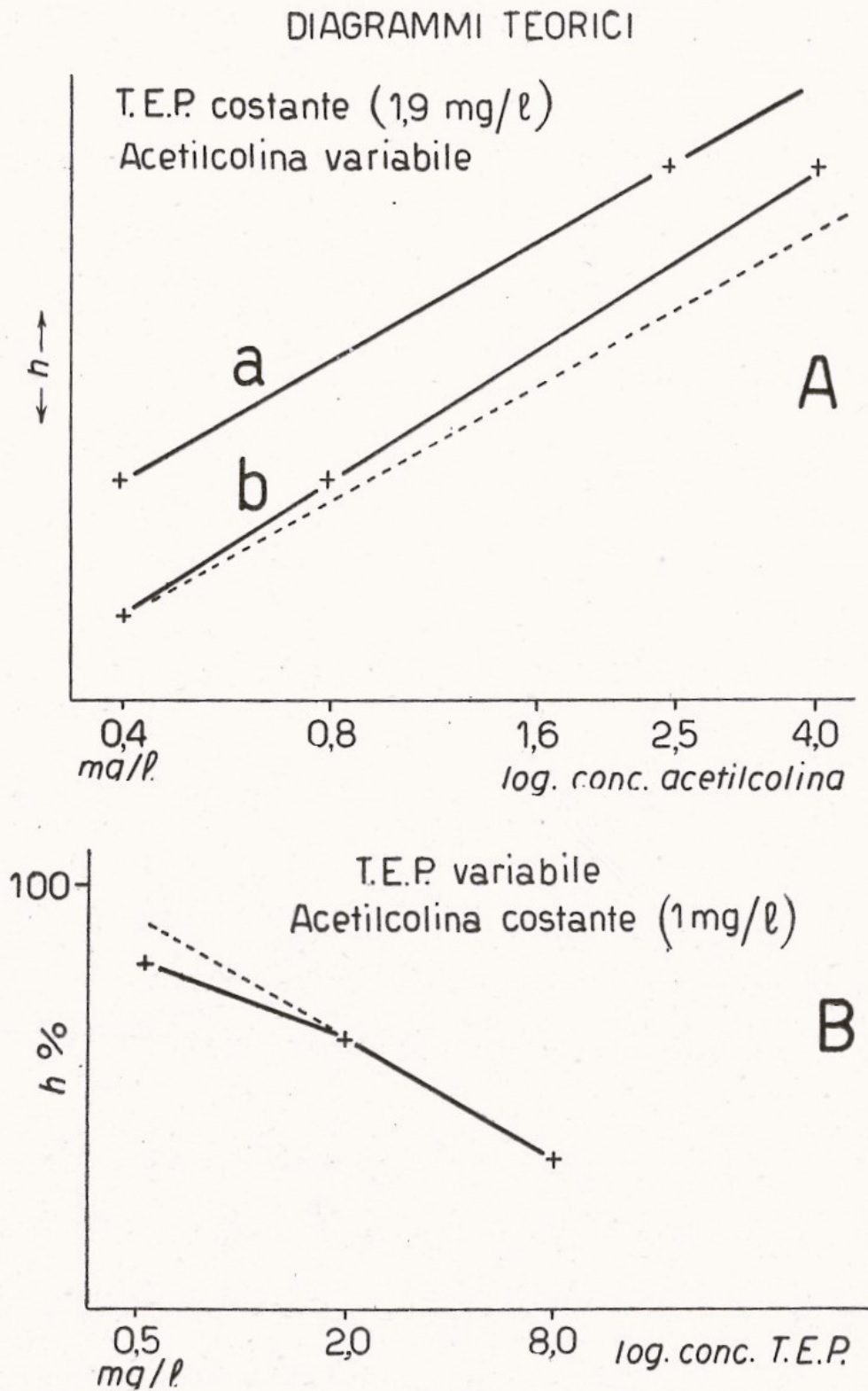


FIGURA 8.

Corrispondenza tra l'esperienza e l'ipotesi della pseudo-acetilcolina. I due diagrammi costruiti in base ai valori di solo alcune esperienze e l'estrapolazione in base alla formula $y=n(n-1)x$, mostrano lo stesso andamento di quelli delle figure 1-b) e 2-b), disegnati in base ai valori sperimentali (spiegazione, v. testo)

per l'equilibrio; cioè deve essere quell'altezza che si trova sulla linea che congiunge i massimi delle successive contratture postcurariche (vd. ancora fig 7).

Con questo criterio, che tiene conto del fattore esistente e inoppugnabile della depressione postcurarica, effettivamente si trova una concordanza tra il valore teorico ed il valore che risulta dall'esperienza, concordanza che naturalmente è ancora approssimativa, tenendo conto le difficoltà di valutare esattamente la velocità della scomparsa della depressione postcurarica.

Si può ora comprendere perchè, pure esistendo un antagonismo dimostrabile, non si hanno generalmente risultati netti dallo studio delle curve azione/concentrazione in presenza o in assenza dell'antagonista.

Se noi usiamo una quantità costante di TEP, ad esempio 1,9 mg/l, sappiamo che il valore di 0,8 mg/l di acetilcolina sarà dimezzato, come se fossero presenti in soluzione solo 0,4 mg/l di acetilcolina. Se si impiegano invece 4 mg/l di acetilcolina, sappiamo che il valore sperimentale di TEP necessario per avere lo stesso effetto di ridurre alla metà l'acetilcolina è di 4 mg/l. Poichè noi usiamo solo 1,9mg/l, cioè circa la metà, il valore dell'acetilcolina, calcolato con l'aiuto dello schema precedente, viene ridotto non alla metà, ma a 2,5 mg/l. Disegnando i valori corrispondenti su un grafico, verifichiamo che le due linee sembrano spostarsi non molto dall'essere parallele, corrispondendo quindi al risultato avuto nelle nostre esperienze. (Fig. 8-a).

Questo si ha nel caso di un antagonismo elettivo, quale è quello che consideriamo; naturalmente quando l'effetto depressorio post-antagonista è più accentuato, o vi è un'altra azione oltre che l'antagonismo per competizione, sarà difficile non considerare le rette come parallele.

L'altro diagramma (fig. 8-b) mostra come varia teoricamente il valore del rapporto acetilcolina variabile/TEP costante. Anche qui si ha una variazione di valori tanto maggiore a più deboli concentrazioni di TEP alle quali l'acetilcolina può spostare un maggior numero di molecole dell'antagonista. Il confronto con i valori ottenuti sperimentalmente mette in luce l'effetto dovuto nelle più forti concentrazioni di curaro, alla fissazione di parte di esso stabilmente al muscolo.

CONCLUSIONI

La possibilità di fare entrare l'antagonismo acetilcolina/TEP in uno schema teorico in cui questo antagonista venga trattato come una molecola di falsa acetilcolina, con la proprietà di reagire con gli stessi ricettori, ma non di provocare la contrattura, prova a sufficienza la rigoro-

sità dell'antagonismo per competizione tra le due sostanze. Quale sia in questo antagonismo l'importanza che hanno i gruppi $-\overset{+}{N}<$, è superfluo accennare.

D'altra parte, la corrispondenza tra i valori sperimentali e lo schema teorico dimostra reciprocamente la validità di questa interpretazione dell'antagonismo che abbiamo dato, che permette di spiegare chiaramente l'andamento quantitativo delle varie relazioni tra l'antagonista e la sostanza attiva; crediamo che la validità di questa interpretazione possa essere estesa in generale anche ad altri antagonismi.

Risulta da essa, come dai valori sperimentali, che il modo migliore di studiare l'antagonismo è nella relazione delle quantità multiple di sostanza attiva e antagonista necessarie a mantenere costante un effetto determinato della sostanza attiva. Qui i valori sono molto divergenti da quelli che si avrebbero se l'antagonismo non fosse per competizione.

Risulta dal nostro studio anche la necessità di considerare maggiormente, per la maggiore rigosità della valutazione quantitativa, l'effetto depressorio successivo all'azione dell'antagonista. Rimane da stabilire con esattezza la legge fisico-chimica, che permetta dall'andamento della curva di defissazione stabilire con maggior precisione la quantità dell'antagonista che sfugge all'equilibrio.

Tra differenti antagonismi si può definire un confronto secondo la notazione di pA_x , soltanto se si fissi arbitrariamente, oltre al valore x , la concentrazione della sostanza attiva.

La dimostrazione dell'esistenza di un rigoroso antagonismo tra TEP e acetilcolina conferma ancora l'importanza del fattore colinergico nell'interpretazione del meccanismo d'azione del curaro nel corso della trasmissione dell'impulso nervoso.
