

UNIVERSITÀ DI NAPOLI
FACOLTÀ MEDICINA E CHIRURGIA

“INFLUENZA DEL VERO PRINCIPIO ATTIVO DEL CYNARA
SCOLIMUS (AC. 1,4 DICAFFEILCHINICO) SUL METABOLISMO
DEL COLESTEROLO”

TESI DI LAUREA

DI

EMILIO MARMO



IL DIRETTORE

Parrinello

UNIVERSITA' DI NAPOLI

Facoltà di Medicina e Chirurgia

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA

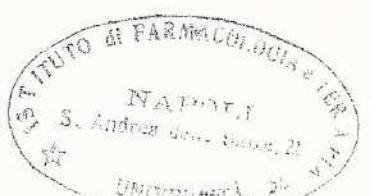
Prof. LEONARDO DONATELLI

"INFLUENZA DEL VERO PRINCIPIO ATTIVO DEL CYNARA SCOLIMUS

(AC. 1,4 DICAFFEILCHINICO) SUL METABOLISMO DEL COLESTEROLO.

TESI DI LAUREA

di



EMILIO MARMO
matr. n. 955

ANNO ACC.: 1956-1957

P R E M E S S A

L'introduzione in terapia del carciofo (*Cinara Scolimus*, fam. Compositae) spetta alla medicina popolare del secolo XVI; l'impiego della droga, consigliata per affezioni epatiche e renali soprattutto sotto forma di infusi e decotti delle radici e delle grandi foglie basali, non utilizzate a scopo commestibile, è stato veramente notevole fino agli ultimi decenni del sec. XIX. Caduto piuttosto in dimenticanza negli anni tra il 1870 ed il 1925, il carciofo ha suscitato di nuovo l'interesse degli studiosi a partire dal 1926, dopo le comunicazioni di H. Leclerc (1) e J. Brel (2), che mettevano in evidenza le proprietà epatostimolanti della droga, riconoscendo in sostanza giuste le indicazioni preconizzate per il carciofo fin dal sec. XVIII da Chomel e Lenery (3): stati itterici ed idropisie.

Sperimentalmente è stata documentata nel cane, da Chabrol e coll. (4), l'azione coleretica (associata ad aumento del residuo secco della bile) di infusi, decotti ed estratti di diverse parti della pianta di carciofo: il principio attivo è apparso contenuto soprattutto nelle grandi foglie basali adulte e nelle radici; meno ricche di esso principio sono apparse le foglie giovani, ed il ricettacolo; le brattee (la cui base è commestibile) ne sono state trovate prive.

Benefici effetti terapeutici di preparazioni di carciofo in diverse epatopatie sono stati osservati da Leclerc (1), Rosa (5), Beggi e Dettori (6); evidenti proprietà diuretiche ne sono state messe in evidenza da Tixier e Eck (7) in soggetti con nefrosclerosi, oligurie ed anurie di natura tossiinfettiva, da Beggi e Dettori (l.c.) in cirrotici con stasi portale, da Ravina (8) in pazienti con affezioni car-

diovascolopatiche comportanti crisi di edema polmonare.

Risulta particolarmente interessante l'attivazione del metabolismo del colesterolo ad opera di preparazioni di carciofo, rilevata da Eck e Desbordes (9) nel 193⁴, ha portato a diversi studi circa le interferenze fra carciofo e metabolismo colesterolico (Eck e Desbordes (9) (10) (11); Tixier (12); Schönolzer (13); Roffe (14); Legrand (15); Del Vecchio (16)). Da tali indagini è risultato che il carciofo provoca ipocolesterolemia (9) (12) (13) preceduta (ma non sempre) da una fase di ipercolesterolemia (9) (10) (12), ostacola l'ipercolesterolemia di natura esogena (da carico colesterolico) ed endogena (da adrenalina) (9), aumenta il potere colesterolitico del siero (9) (10) (11), favorisce l'esterificazione del colesterolo (16).

Dal punto di vista clinico, favorevoli risultati terapeutici sono stati ottenuti con preparazioni di carciofo

da Tixier (12) e Schönholzer (13) nella malattia arterio-sclerotica.

Va rilevato che tutte le indagini sperimentali e cliniche eseguite sul carciofo ed avanti riferite (come altre, di cui non si è fatta menzione, sulla capacità di proteggere il fegato dall'intossicazione arsenicale cronica (17) e sulla utilità dell'associazione di preparazione di carciofo con arsenobenzoli (18)) sono state effettuate con preparazioni della droga molto diverse fra loro; difatti, malgrado l'allestimento di prodotti a base di carciofo somministrabili anche per via parenterale, il vero principio attivo - denominato cinarina - è rimasto ignoto fino al 1953.

Tentativi di purificazione e di isolamento di tale principio sono peraltro effettuati da oltre 20 anni: caduta, per opera di Chabrol e coll. (4), l'ipotesi di Brel

che fossero i sali di K e Mg responsabili dell'effetto coleretico del carciofo e messo in evidenza, per opera degli anzidetti AA., che il principio si conservava in foglie e radici secche e mantenute all'asciutto, alterandosi se queste andavano in fermentazione, gli stessi Chabrol e coll. hanno documentato che la cinarina non era un glucoside ossiantrachinonico, ma una sostanza a carattere acido capace di dare con il Pb dei sali insolubili, con ogni probabilità un composto ciclico con funzioni fenoliche.

Il Rosa (5), che aveva con Brel (2) sostenuto la possibilità che fossero i sali di K e di Mg ad essere responsabili dell'azione coleretica del carciofo (ipotesi, come si è visto, caduta per opera di Chabrol e coll. (5)), ha comunicato, nel 1934, di aver isolato dal carciofo una sostanza che si presentava sotto forma di cristalli inodori, variabili come forma a seconda del solvente usato, identificata

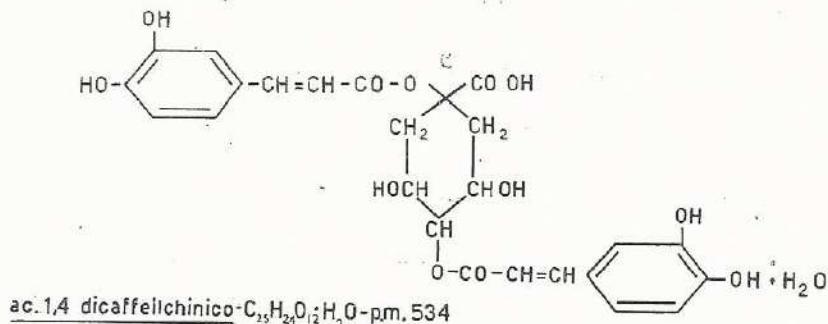
cabile con il principio attivo della droga; quest'ultimo si ritroverebbe nella pianta sia libero sia sotto forma di combinazione calcica, magnesiaca, sodica, potassica. Il prodotto cristallizzato, nel quale, secondo il Rosa (5), sarebbero stati messi in evidenza una funzione alcoolica ed una acida, e le cui soluzioni sarebbero state capaci di provocare una leggera rotazione a sinistra della luce polarizzata, fu messo in commercio con il nome di Chophytal, specialità la più largamente utilizzata, dal 1934 in poi, nelle ricerche sperimentali e cliniche sul carciofo.

Il vero principio attivo del carciofo è stato isolato, purificato (°) ed individuato nella sua costituzione chimica dal Prof. Panizzi e coll. (19) (20). Esso, sug-

(°) Da 1 Kg. di droga si ricavano (19) 0,10-0,20 gm. di prodotto puro.

Il prodotto sintetico presenta le stesse caratteristiche chimiche e fisiche di quello naturale ed anche i rispettivi spettri nell'infrarosso (20) risultano sovrapponibili.

cessivamente ottenuto per via sintetica, può considerarsi l'estere 1,4 dicaffeico dell'ac. chinico e risponde alla seguente formula di struttura.



L'analisi dà valori in buono accordo con la formula (19). La cinnarina si presenta in forma di aghetti piatti, filtrati a lucentezza setacea, più raramente in larghe lamine incolori di sapore lievemente dolciastro e comp. di 226°-227° con vivace decomposizione. È sinistrogira, con potere rotatorio $[\alpha]_{25}^D = -59$ (metanolo; C = 2 oppure 4).

Allo stato puro è poco solubile in acqua fredda (0,06% circa), più solubile in acqua bollente (0,4% circa), in acido acetico glaciale bollente (3% circa) e in alcool metilico ed etilico. È poco solubile in acetone secco, acetato di etile, cloroformio, diossano, ecc., facilmente in piridina. Poco solubile in bicarbonato sodico saturo a freddo, si scioglie facilmente nei carbonati e idrossidi alcalini e in ammoniaca, con intensa colorazione gialla. Le soluzioni alcaline si alterano rapidamente all'aria. Con cloruro ferrico dà una intensa colorazione verde-azzurra; con acetato di piombo e con bario, dà un precipitato giallo. Allo stato anidro la cinarina è debolmente ma nettamente colorata in giallo; lasciata all'aria, nel corso di mezz'ora circa, riassorbe avidamente e totalmente l'acqua perduta, ridiventando perfettamente incolore.

10.

E' titolabile come acido monobasico mediante NaOH N/10 in soluzione idroalcoolica, utilizzando come punto di viraggio la colorazione gialla che la soluzione assume quando l'ambiente diventa alcalino.

Una soluzione M/100 di cinarina in metanolo acquoso al 50% ha un pH di 3,3.

RAGIONI ED OGGETTO DELLA TESI

In relazione a quanto avanti riferito circa le proprietà farmacodinamiche del carciofo e del suo principio attivo (ac. 1,4 di caffeilchinico), abbiano preso in esame l'anzidetto composto allo scopo di giungere ad una valutazione delle sue azioni sul metabolismo del colesterolo.

A tale scopo abbiano preso in esame le eventuali modificazioni, ad opera dell'ac. 1,4 dicaffeilchinico:

- 1) della colesterolemia;
- 2) del contenuto in colesterolo di alcuni organi e tessuti;
- 3) di alcune ipercolesterolemie sperimentali.

Come tentativo di parziale esplicazione di alcuni dei risultati sperimentali ottenuti nelle prove di cui al

paragrafi 1, 2 e 3 sono state anche condotte prove volte ad accertare l'eventuale attività della Cin: in vitro

1) sulla solubilizzazione del colesterolo;

2) sul potere colesterolitico del siero;

3) sull'attività colesterolasica;

ed in vivo:

4) sulla sintesi epatica del colesterolo.

RICERCHE Sperimentali e Risultati

Avanti di riferire dei risultati ottenuti con l'ac.

1,4 di caffeilchinico (indifferentemente denominato, nel corso del presente lavoro, Cinarina o Cin) nei diversi gruppi di prove sperimentali istituite ed avanti specificate, facciamo presente che il prodotto, sintetizzato e gentilmente offertoci in copia dai Laboratori Farmitalia,

è stato di volta in volta solubilizzato, nei diversi esperimenti eseguiti, in:

- a) tampone fosfati (T.F.) M/5 (Na_2HPO_4 p. 7,1 su 100 cc. H_2O dist.); una soluzione completa di Cin all'1-2% in tale tampone si ottiene soltanto scaldando alquanto a b.m. il liquido; la soluz. precipita rapidamente a freddo; ha un pH di 7,2 circa;
- b) solvente allestito dai Laboratori Farmitalia (Solv. Farmitalia); 20 cc. di tale solvente, conservato sterilmente in fiale, scioglie 1 gr. di Cinarina sterile conservata in flaconcini tipo penicillina. Per ottenere la soluzione completa della Cin (al 5%) occorre scaldare alquanto ed agitare vigorosamente. La soluzione che ne risulta, a pH 9 circa, tende col tempo ad ossidarsi, non a precipitare. Esso può essere diluita con H_2O distillata o soluzione fisiologica. Se

rà di volta in volta specificato tipo di solvente impiegato e il titolo della soluzione di Cin in esso.

Ove del caso, i dati numerici delle nostre prove sono stati elaborati statisticamente secondo le formule consigliate da Günther (21) procedendo, se necessario, a stabilire l'eventuale significatività delle differenze fra le medie dei diversi gruppi di animali trattati rispetto ai controlli. Il P è stato letto sulle tavole di Fischer (22). Valori $P < 0,05$ sono stati considerati significativi.

1^a serie di prove. - Azione della Cin sulla colesterolemia.

Con le presenti indagini si è voluto indagare le modificazioni della colesterolemia nel coniglio ad opera di somministrazioni uniche endovenose di differenti dosi di Cin, e nel coniglio e nel ratto a seguito di somministra-

zioni ripetute per via endovenosa (coniglio) o per via endoperitoneale (ratto) di differenti dosi di Cin. Per tutte queste prove la Cin è stata solubilizzata in solv. Farmitalia. Eventuali diluizioni sono state effettuate con H₂O distillata.

a) Azione di somministrazioni uniche di differenti dosi di Cin sulla colesterolemia del coniglio.

Le ricerche di cui al presente paragrafo sono state condotte su conigli di ambo i sessi, escluse le gravidate, del peso medio di Kg. 1,800 ed in ottime condizioni generali, tenuti, per tutta la durata degli esperimenti, nelle medesime condizioni ambientali ed alla stessa alimentazione.

Determinata, su animali digiuni da 12 h, la colesterolemia totale basale, veniva iniettata per via endo-

venosa (marginale dell'orecchio), la Cin, nelle dose di volta in volta stabilita, ricercando a vari tempi, fino a 48 h dopo l'iniezione, i valori colesterinemici per accertare eventuali modificazioni di essi in rapporto alla somministrazione del farmaco. Sono stati sperimentate dosi di Cin pari a 50 - 100 - 200 mg/Kg (in ogni caso in soluz. al 5%). Come controlli sono stati tenuti animali non sottoposti ad alcun trattamento, nei quali si ricercava il comportamento del colesterolo ai medesimi tempi che dopo somministrazione di Cin. I prelievi di sangue sono stati effettuati dalla marginale dell'orecchio nella quantità di 0,4 cc. Il dosaggio del colesterolo è stato effettuato secondo il metodo di Sperry e Webb (23) con le piccole modifiche che riportiamo. Il sangue prelevato veniva immediatamente versato in opportune provette contenenti 3 cc. di alcool-acetone (vcl/vol). Dopo e-

bollizione, si portava a volume finale di 6 cc. filtran-
do e procedendo successivamente su aliquote del filtra-
to pari a 3 cc. La soluzione di digitonina (0,5%) veni-
va aggiunta in quantità pari a 3 cc.

*UVA 40 mm
a T. 112°*

Il precipitato di digitonide di COL essiccato in
istufa veniva disciolto in 2, anziché 1 cc. di acido a-
cetico, cui si aggiungevano 4, anziché 2 cc. della mi-
scela anidride acetica/ac.solforico, e ciò allo scopo
di poter procedere alle letture colorimetriche al foto-
metro Klett-Summerson (il quale ha provette da 5 - 10
cc.). Si è utilizzato il filtro 66 (rosso).

Nella tabella n. 1 vengono riportati sotto forma
(f)
di valori medi (con il rispettivo errore standard $\pm P$)
i risultati degli esperimenti eseguiti; nella fig. n. 1
sono esposte le variazioni percentuali della colestero-
lemia rispetto ai valori basali fatti = 100 nei diversi

TABELLA N. 1

AZIONE DELLA COLESTEROLEMIA DEL CONTIGLIO DI DOSI TINICHE DI CIN.

An. n.	Trattamento sostanza	mg/Kg	soluz.%	Colesterol mia basale (COL tot.)				Valori colesterolemici (v. medi \pm S.M) ai seguenti tempi dopo somministrazione di Cin			
				30 min	1 h 30 min	4 h	8 h	24 h	48 h		
3	-	-	-	97 \pm 12	94 \pm 13	90 \pm 12	95 \pm 24	90 \pm 18	102 \pm 16		
3	Cin	50	5	95 \pm 7	91 \pm 7	89 \pm 6	99 \pm 6	99 \pm 4	99 \pm 9	99 \pm 9	
4	"	100	5	121 \pm 14	108 \pm 17	98 \pm 12	102 \pm 9	91 \pm 12	107 \pm 11	112 \pm 16	
5	"	200	5	97 \pm 19	79 \pm 4	76 \pm 11	79 \pm 10	74 \pm 8	74 \pm 14	96 \pm 11	P = 0,9
								P = 0,1			0,05

Il P è stato naturalmente calcolato rispetto ai valori avanti il trattamento. Sono riportati, a scopo di semplicità, solo alcuni fra gli P calcolati, vale a dire quelli relativi ai dati che più sembravano discostarsi dai valori basali.

La Cin è stata solubilizzata al momento dell'uso. Farmitalia in modo da ottenerne soluz. al 5%.

gruppi di animali in prova.

Dalla tabella n. 1 e dalla fig. n. 1 risulta che le somministrazioni uniche di Cin per via endovenosa possono determinare diminuzione dei valori colesterinici che superano evidentemente le oscillazioni fisiologiche.

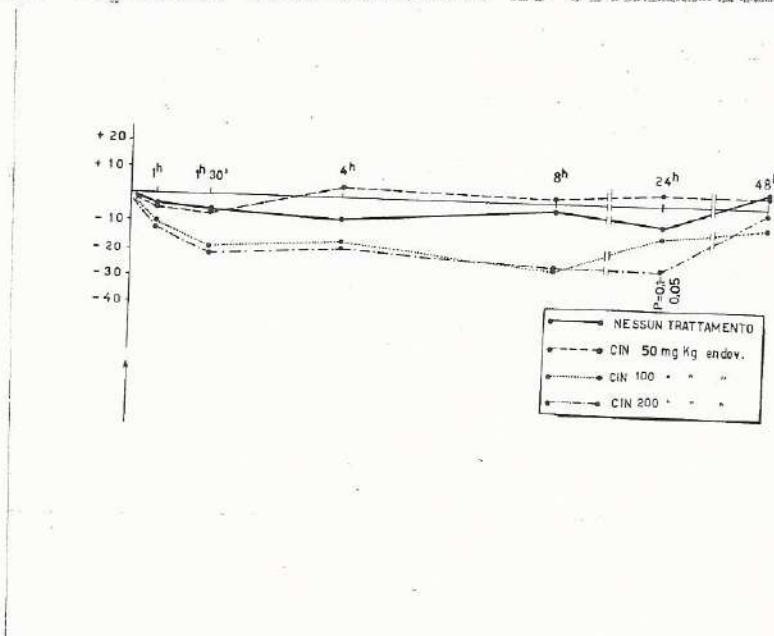


Fig. n. 1

Variazioni percentuali medie dei valori colesterinici ai tempi indicati in animali non trattati o trattati un'unica volta endovenosa con Cin (in solfarnit.) nelle dosi di 50-100-200 mg/Kg.

I numeri lungo l'asse delle ordinate indicano le variazioni percentuali; quelli lungo l'asse delle ascisse i tempi nei quali sono stati effettuati i rilievi.

Alla freccia, per gli animali trattati, iniezioni endovenose di Cin alle dosi indicate.

giche (difatti le massime diminuzioni osservate presentano un P al limite della significatività rispetto ai valori basali e gli eventuali errori sperimentali (vedi risultati in animali non sottoposti ad alcun trattamento).

Risultati più costanti ed evidenti possono ottenersi in animali trattati con la dose di 200 mg/Kg.; la dose di 50 mg/Kg è praticamente inefficace. L'abbassamento dei valori colesterinemici sembra raggiungere un massimo fino all'8° ora o fra 8° e 24° ora, tendendo successivamente ad attenuarsi.

b) Azioni di somministrazioni ripetute di differenti dosi di Cin sulla colesterolemia del coniglio e del ratto.

1) Ricerche sul coniglio: Un gruppo di 6 conigli, del peso medio di 1,500 Kg., sono stati divisi in due lotti, ciascuno di 4 unità.

Un gruppo non ha ricevuto alcun trattamento ed è servito come controllo. Un altro ha ricevuto quotidianamente, per via endovenosa, 50 mg/Kg di Cin in solv. Farmitalia. Il trattamento è durato 30 giorni. Nel corso di questo, gli animali sono stati tenuti nelle medesime condizioni ambientali ed alla comune dieta di laboratorio.

Il trattamento sarà fatto dopo l'ultimo trattamento con Cin.

La colesterolemia è stata dosata, su siero ottenuto da sangue prelevato mediante puntura cardiaca, negli animali in prova (in ogni caso digiuni da 12 h) avanti il trattamento e dopo 15 e 30 giorni dall'inizio di questo. Per il dosaggio del COL si è adoperato il metodo di Sperry e Webb (l.c.) con le modifiche avanti riferite.

I risultati ottenuti, riportati nella tabella n.2, documentano che la Cin nel dosaggio utilizzato non ha da

terminato apprezzabili modificazioni della colesterolemia.

TABELLA N. 2

Azione di un trattamento ormonale con Cip sul colesterolo totale sierico del cane

An.	Valori di colesterolo sierico mg. % ± 6%		
	N.	Avanti al trattamento	Al 15° g. di trattamento
4	86 ± 16	116 ± 7,3	113 ± 8,7
4	101 ± 3,8	102 ± 2,6	104 ± 5,4

2) Ricerche sul ratto: Le presenti ricerche sono state condotte su ratti di ambo i sessi, tenuti tutti nelle medesime condizioni di alimentazione e di ambiente. Dei ratti in esperimento, tutti di sesso maschile, un gruppo era costi-

tuito da adulti di peso non inferiore a 150 gr. ed un gruppo da animali giovani in periodo di crescenza del peso medio iniziale di 50 gr.

Ambedue i gruppi di animali sono stati trattati per via endoperitoneale con Cin, in dosaggi e per periodi di tempo differenti, tenendo come controlli animali iniettati con soluzione fisicologica.

Al termine del trattamento gli animali sono stati sacrificati e sul sangue prelevato mediante puntura cardiaca si è dosato, con il metodo di Sperry e Webb (l.c.), con le modifiche avanti ricordate, il tasso di colesterolo ematico.

Dalla tabella n. 3 risultano schemi di trattamento, posologia della Cin, e risultati conseguiti.

TABELLA N. 3

Azione di un trattamento subacuto o cronico con Cin sulla colesterolemia del ratto

Gruppi n.	Adulti o in crescenza	Trattamento			Colesterol totale ematico (mg.% ± ΣM) al termine del trattamento
		Sostanza	ng/Kg/die	Durata	
1	Adulti	"	"	"	89 ± 6 (10)
2	"	sol. fis.	10cc/Kg/die	15	85 ± 5 (6)
3	"	Cin	50mg " "	"	96 ± 13 (4)
4	"	Cin	125 " " "	"	91 ± 6 (3)
5	In crescenza (peso medio finale 120gm)	sol. fis.	10cc/Kg/die	40	95 ± 6 (5)
6	"	Cin	50mg " "	"	95 ± 9 (5)
7	"	Cin	100 " " "	"	95 ± 7 (5)
8	"	Cin	200 " " "	"	97 ± 6 (5)
9	"	Cin	400 " " "	"	95 ± 11 (5)

(Fra parentesi il numero di dati sui quali sono state effettuate le medie e ricavato il ΣM). Le differenze fra le medie (P) non sono significative.

Dai dati riportati risulta che la Cin non è in grado di modificare, nel ratto, i valori colesterolemici basali normali, anche per somministrazioni prolungate.

c) Azione di somministrazioni ripetute di differenti dosi di Cin sul contenuto in colesterolo di alcuni organi del ratto.

Le presenti ricerche sono state condotte sui medesimi ratti di cui al capoverso 2° del paragrafo b di questo capitolo. Dai ratti nei quali è stato effettuato il rilievo della colesterolemia sono stati prelevati i surreni, puliti e pesati, nonché un frammento di fegato, anche esso pesato. Su tali organi è stato condotto il dosaggio del COL; il dosaggio è stato eseguito con il metodo di Sperry e Webb (1 c.). Il frammento di organo è stato finissimamente spoligliato in provette coniche da centrifuga pirex con un po' di sabbia di quarzo, indi si è proceduto alla estrazione con alcool-acetone, proseguendo come avanti de-

scritto.

I risultati ottenuti sono stati espressi in mg. di COL per 100 g_g di organo o di tessuto.

Essi sono riportati nella tabella n. 4 sotto forma di valori medi con il rispettivo errore standard e le significatività.

P A B L I C N. 4

Azione di un trattamento subacqueo con CIN sui contenuti colestrolico del fegato e del surrene di ratto.

Gruppi n°	Adulti o in crescenza	Trattamento			Colesterol totale (mg/100 g di fegato ± S.M.)		
		Sostanza	mg/Kg/die	Dose	epatico	surrenale	
1	Adulti sol. fisi. CIN	1000	15	2021 ± 218 (5)	3415 ± 594 (6)		
2	sol. CIN	500	17	1879 ± 381 (4)	3534 ± 1231 (3)		
3	sol. CIN	125	17	2162 ± 323 (3)	2895 ± 789 (3)		
4	in crescenza (peso medio nello 120 gm.)	sol. 24 S. CIN	40	1385 ± 217 (6)	2350 ± 611 (5)		
5	sol. CIN	500	17	1268 ± 124 (5)	2662 ± 279 (4)		
6	sol.	100	17	1359 ± 221 (5)	3726 ± 600 (3)		
7	sol.	200	17	1371 ± 290 (5)	4606 ± 684 (3)		
8	sol.	400	17	1906 ± 257 (5)	3285 ± 850 (4)	p < 0,01	

Fra parentesi, il numero di dati sui quali sono state effettuate le medie e ricavato il S.M. Sono stati omessi gli P non significativi. In ogni caso il P è stato calcolato rispetto agli animali iniettati con soluz. fisiologica.

Dai dati riferiti risulta che la Cin non è in grado di modificare in maniera apprezzabile (difatti gli p sono stati trovati non significativi rispetto ai control li iniettati con soluzione fisiologica) il contenuto in colesterolo del tessuto epatico mentre ha determinato un aumento del tasso di COL surrenalico, significativo soltanto negli animali iniettati per 40 giorni con Cin nella dose di 200 mg/Kg/die. Fornita produzione e funzione difinita e specifica

3) Azione della Cin sulle ipercolesterolemie sperimentali.

a) Sulla lipoidosi colesterolica. In un precedente lavoro di Preziosi e Loscalzo (24) si è rilevato che la Cin, in opportune condizioni sperimentali, era capace di ostacolare alquanto l'innalzamento dei valori colesterolemici da carico con colesterolo; non è parso invece che il suddetto prodotto fosse capace di modificare in maniera

Cat. 1gr per 20 gr die in soluz. live w/w 2. il 40%

decisa il quadro lipopatico e proteico nei medesimi animali sottoposti a carico colesterolico.

b) Azione sull'ipercolesterolemia da Triton. E' noto che alcune sostanze tensioattive sono in grado di alterare le componenti lipido-proteiche del siero e determinare - di conseguenza - una dislipidemia (25). Quest'ultima è caratterizzata da ipercolesterolemia, alterazioni del rapporto α / β lipoproteico, con prevalenza delle β -lipoproteine ad elevato peso molecolare (che si trovano aumentate nell'arteriosclerosi sperimentale ed umana), con il risultato ultimo di un insudiciamento plasmatico, il quale risulta in grado di determinare, a lungo andare, alterazioni delle pareti vasali. Fra i tensioattivi più usati capaci di determinare le cosiddette alterazioni è il Triton W.R. 1339, polimero del p-isoctilpoliossatilfenolo.

Secondo studi più recenti (26) (27) (28) ad opera del Triton si ha un blocco, per alterazioni delle lipoproteine circolanti, del passaggio del colesterolo dal sangue nel fegato, per cui la produzione di colesterolo ad opera del parenchima epatico risulta fortemente accelerata, venendo a mancare uno dei fattori fisiologici capaci di bloccarla. Contemporaneamente risulta diminuita l'escrezione di colesterolo, poiché poco colesterolo entra nel fegato e viene convertito a colato ed escreto con la bile. Si ha così, al tempo stesso, un'accentuata sintesi epatica ed una diminuita immissione in circolo di colesterolo.

Il Triton rappresenta un utile mezzo per determinare in breve tempo quadri dislipidemici sperimentali, allo scopo di studiare farmaci attivi sui processi di sintesi e di escrezione del colesterolo in rapporto al problema dell'arteriosclerosi umana.

Le nostre ricerche sono state condotte su ratti adulti di peso superiore a 150 g. Un gruppo di animali non ha ricevuto alcun trattamento ed è servito di controllo; altri gruppi sono stati trattati con Triton o con Triton + Cin.

In ogni caso il Triton è stato somministrato a ratti digiuni da 12 h nella dose di 200 mg/Kg, solubilizzato a caldo in H₂O distillata in modo da ottenere una soluzione al 2%; la Cin (disciolta in solv. Faraditalia in soluz. al 5%) è stata iniettata per via endoperitoneale nella dose di 100-200 mg/Kg immediatamente dopo e a distanza di 13 h ~ 16 h 40' dalla somministrazione del Triton. Gli animali sono stati in ogni caso sacrificati dopo 18 h la somministrazione del Triton. Essi sono stati alimentati 16 h avanti l'uccisione, vale a dire 2 h dopo l'iniezione di Triton.

31.

Sugli animali sacrificati sono stati effettuati i rilievi del colesterolo ematico, utilizzando il metodo di Sperry e Webb, con gli accorgimenti e le modifiche anteriori descritte.

I risultati delle prove da noi eseguite sono riferite sotto forma a valori medi (con il rispettivo errore standard) nella tabella n. 5 e nella fig. n. 2.

TABELLA N. 5

Azione della Cin sull'ipercolesterolemia da Triton

N.ro ratto M. 14 g.	Triton mg/Kg endovenosa	Cinarina (sol. 5%) mg/Kg, per via an- doperitoneale	Colesterolo sierico mg% \pm S.M
10	-	-	89 \pm 6
10	200	-	147 \pm 12
8	"	100, e poi di nuo- vo altri 100 4 h avanti uccisione	152 \pm 17
6	"	200, e poi di nuo- vo altri 200 4 h avanti uccisione	148 \pm 14
5	"	200, e poi di nuo- vo altri 200 1 h - 20' avanti uccisi- one	107 \pm 9

La prima iniezione di cinarina è stata in ogni caso eseguita immediatamente dopo quella di Triton

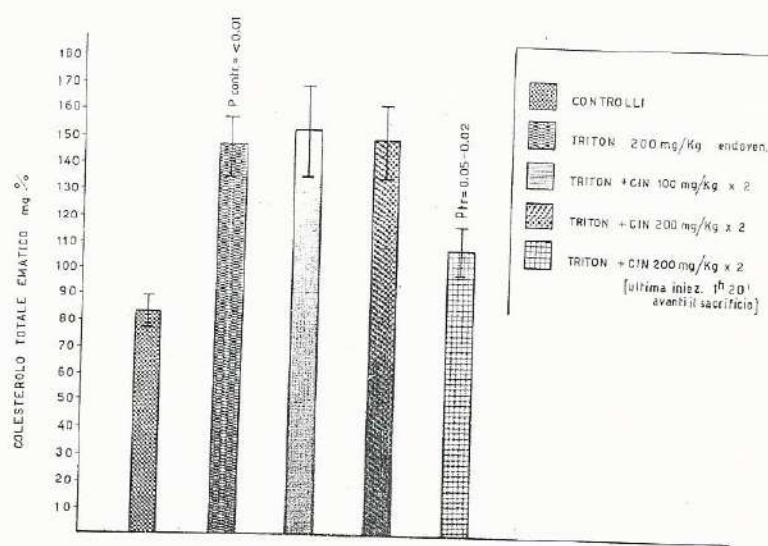


Fig. n. 2

Azione della Cin sull'ipercolesterolemia da Triton

I numeri lungo l'asse delle ordinate indicano i mg% di colesterolo ematico. Le colonnine con base lungo l'asse delle ascisse si riferiscono ai diversi gruppi di animali trattati come indicato nella didascalia e specificato nel testo.

P contr = P stabilito rispetto ai controlli (animali non trattati con alcuna sostanza)

P tr = P stabilito rispetto agli animali trattati con Triton.

Dai dati riportati nella tabella n. 4 e nella fig. n. 2 (ove si rilevano anche gli P significativi) risulta che la Cin è in grado di determinare una inibizione significativa ($P = 0,05 - 0,02$) nei riguardi dell'aumento della colesterolemia ad opera del Triton soltanto quando è somministrata, nella dose di 200 mg/Kg, contemporaneamente al Triton e di nuovo 1 h 20' avanti l'uccisione degli animali.

Allo scopo di meglio precisare alcuni dei risultati sperimentali ottenuti nelle ricerche circa le interferenze fra Cin, colesterolo ematico e ipercolesterolemie sperimentali, abbiamo condotto ricerche in vitro.

Con tali ricerche si è voluto accettare l'eventuale attività della Cin in vitro sulla solubilizzazione del colesterolo, sul potere colesterolitico, del siero e sul-

l'attività colesterolesterasica sierica ed in vivo sulla sintesi epatica del colesterolo.

1° gruppo di prove - Azione della cinarina sulla solubilizzazione del colesterolo in mezzi nei quali è insolubile.

Mediente le ricerche che saranno riferite nel presente paragrafo si è cercato di precisare se la cinarina avesse la capacità di permettere la solubilizzazione del colesterolo in H_2O distillata, in cui come è noto, è praticamente insolubile.

Le prove sono state condotte nel modo che segue.

In una serie di beutine contenenti ciascuna 200 mg. di colesterolo sono stati aggiunti 9 cc. di H_2O distillata, di poi sono stati innessi nelle prove controllate 1 cc. di tampone fosfato (sol. di $NaHPO_4$ N/5) e nelle altre prove

La Cin in diverse dosi, dissolti sempre in 1 cc di F.F., in modo da raggiungere concentrazioni finali comprese fra 1×10^{-5} - 1×10^{-3} .

La determinazione del colesterolo è stata eseguita con il metodo di Sperry e Webb (l.c.) su 0,4 cc. di filtrato (*) delle prove avanti l'incubazione e dopo 72 h di permanenza in termostato a 38°.

I risultati delle prove eseguite sono riferiti nella tabella n. 6.

Dalla tabella si rileva chiaramente che la Cin non permette, anche in concentrazioni elevate, la solubilizzazione del colesterolo in H₂O distillata.

(*) Per la filtrazione ci siamo serviti di carta Schleicher-Schull 587 E.

T A B E L L A N.6

Azione della Cin sulla solubilizzazione del colesterolo in
 H_2O distillata

(Composizione delle prove: H_2O dist. cc. 9 + tampone fosfato (Na_2HPO_4 M/5) cc. 1, contenente colesterolo mg 200. Nelle prove controllo si è aggiunto soltante 1 cc. di T.F. Incubazione a 38°C per 72 h - ambiente di aria.)

Prove n°	Concentrazio- ne finale prodotti in esame ml/100cc	Colesterolo totale mg. %	
		avanti l'incubazione	dopo l'incubazione
3	-	< 5	< 5
3	Cin 1 x 10^{-5}	< 5	< 5
3	" 1 x 10^{-4}	< 5	< 5
3	" 1 x 10^{-3}	< 5	< 5

38°C Temp. incub.

2° gruppo di prove - Azione della cinarina sul potere colesterolitico del siero in vitro.

Le presenti ricerche sono state condotte seguendo in linea di massima, la tecnica consigliata da Eck e Desbordes (9), Autori i quali hanno anche rilevato come un trattamento con estratto di carciofo riesca ad aumentare il potere colesterolitico del siero in vivo.

In particolare, le prove sono state condotte nel seguente modo:

In beutine contenenti 100 mg. di colesterolo sono stati aggiunti 4 cc di siero umano freschissimo; successivamente sono stati immessi nelle prove controllo 1 cc di T.F. M/5 e nelle altre i farmaci nelle dosi stabilite, disciolte sempre in 1 cc di TF. Alcune prove sono state effettuate utilizzando siero inattivato (*) al posto del

(*) Per l'inattivazione, il siero è stato tenuto a b.m. a 56° per 15 min.

siero fresco (°).

La determinazione del colesterolo è stata effettuata con il metodo di Sperry e Webb (l.c.) su 0,4 cc. di filtrato delle prove, avanti e al termine dell'incubazione in termostato a 38° C.

I risultati delle prove eseguite sono riferiti nella tabella n. 7.

(°) E' noto che il potere colesterolitico del siero non dipende da fattori enzimatici, purtuttavia abbiamo voluto studiare se le alterazioni fisico-chimiche del siero prodotte dall'inattivazione potessero influenzare o meno il potere colesterolitico del siero stesso.

T A B E L L A N. 7Azione della Cin sul potere colesterolitico del siero

(Composizione delle prove: siero umano fresco (inattivato o meno) cc. 4 + tampone fosfato (T.F. - Na_2HPo_4 M/5) cc.1+ colesterolo mg 100. Nelle prove controllo si è aggiunto soltanto 1 ml. di T.F. M/5; nelle altre i farmaci in dosi differenti disciolte sempre in 1 cc. di T.F.
Incubazione a 38° per 72 h. Ambiente di aria.)

Prove n.	Sigla	Siero	Concentrazione finale prodot- ti in esame	Colesterolo mg. %	
				avanti l'incuba- zione	dopo l'incuba- zione
3	A	normale	-		102
3	B	inatt.	-		108
3	C	normale	$\text{Cin } 5 \times 10^{-4}$	92	98 (- 4%)
3	D	"	" 5×10^{-3}		110.5 (+10%)
3	E	"	" 5×10^{-2}		116 (+13%)
3	F	inatt.	" 5×10^{-2}		117 (+14%)

Fra parentesi le variazioni percentuali per le prove C, D, E, F, rispetto alla prova A; per la prova F rispetto alla prova B (siero inattivato).

Dalla tabella risulta che la Cin sembra accentuare lievemente il potere colesterolitico del siero in vitro soltanto per concentrazioni molto elevate. In ogni caso il fenomeno è constatabile anche utilizzando siero inattivato, per cui l'eventuale aumento del potere colesterolitico del siero in vitro ad opera della cinarina potrebbe essere riferito ad esaltazione, indotta dalla Cin stessa, dei processi fisico-chimici che permettono la solubilizzazione del colesterolo nel plasma.

3° gruppo di prove. - Azione della cinarina sul potere colesterolo-esterasico.

E' noto (Del Vecchio (l.c.)) che gli estratti di carciofo attivano l'attività colesteroloesterasica del siero, vale a dire quella attività per cui nel siero umano o di cane posto in termostato a 38° diminuisce la fra-

zione di colesterolo libero ed aumenta quella esterificata.

Nell'eseguire le ricerche sulle interferenze della

Cin sull'attività colesterolosterasica abbiano tenuto pre-

*new
fumaria* sente le raccomandazioni di Tayeau (29) (30), ai cui lavori rimandiamo per particolari sull'argomento.

Pertanto le ricerche sono state condotte nel modo che segue. In una serie di beutine sono stati posti 9 cc. di siero umano freschissimo; al siero sono stati aggiunti nelle prove controlli 1 cc. di T.F., nelle altre la cina-rina, nelle dosi stabilite, disciolte sempre in 1 cc. di TF. Le prove sono state incubate a 38°C per 72 h. Determinazioni del colesterolo sono state eseguite avanti l'incubazione e dopo 24 e 72 h. Si è seguito al solito il metodo di Sperry e Webb, con le modifiche avanti descritte. Per il dosaggio del COL sono state utilizzate aliquote di

0,4 cc. per ogni prova.

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle n. 8 e 9.

Dalle tabelle risulta che la diminuzione percentuale del Col libero nelle prove controllo è stata del 22%; nelle prove condotte con la concentrazione maggiore di Cin la diminuzione è stata del 30%.

Pertanto, da quanto sopra riferito sembra risultare una lieve attivazione dell'attività colesteroloesterasica del siero ad opera della Cin, ma soltanto per concentrazioni elevate di tale composto.

TABELLA N. 8

Azione della cin sulla colesteroloesterasi del siero

(Composizione delle prove: siero umano fresco co. 9 + tampone fosfato (T.F. - Na_2HPO_4 M/5) cc. 1.
Nelle prove controlli si è aggiunto soltanto 1 cc. di T.F. M/5, nelle altre la CIN in dosi differenti disciolte sempre in 1 cc. di T.F. Incubazione a 38°C per 72 h. Ambiente di aria).

Prove n.	Sigaretta finali prodotti in esame	Concentrazione avanti l'incubazione	Colesterolo libero (L) ed esterificato (E) mg %		72
			L	E	
3	A	"	31,2 (-13%)	112 (+4%)	28 (~22%)
3	B	CIN 1×10^{-5}	32 (-11%)	111,2 (+3%)	28 (~22%)
3	C	" 1×10^{-4}	32 (-11%)	111,2 (+3%)	28 (~22%)
3	D	" 1×10^{-3}	28 (-22%)	115,2 (+7%)	25 (-30%)

Fra parentesi le variazioni percentuali del COL libero ed esterificato al diversi tempi di incubazione, fatti = 100 i valori avanti l'incubazione.

TABELLA N. 9

Modificazioni percentuali del colesterolo libero (L) ed esterificato (E) del siero umano dopo incubazione in termostato a 38° ad opera della Cin, fatti = 100 i valori delle prove controllo (solo siero).

Prodotti e concen- traz. fi- nale	Valori ai seguenti tempi di incubazione			
	24 h		72 h	
	L	E	L	E
Puro coleste-	100	100	100	100
Cin 1×10^{-5}	+ 2	+ 1	0	0
" 1×10^{-4}	+ 2	+ 1	0	0
" 1×10^{-3}	-11	+ 2	-11	+ 2

4° gruppo di prove. - Azione sulla sintesi epatica del colesterolo.

Per mettere in evidenza un'azione in tal senso del la Cin, ci siamo serviti del metodo consigliato da Byers e Friedmann (31), consistente nel dosare la quantità di colesterolo emesso attraverso la bile nelle 24 h, in ratti pre trattati per un certo periodo di tempo con la sostanza in esame, rispetto ad altri non trattati, funzionanti da controllo.

Pertanto ratti maschi adulti, di peso non inferiore a 160 gn., sono stati iniettati per via endoperitoneale con Cin nella dose di 400 mg/Kg., quotidianamente per 15 giorni consecutivi, mentre un altro gruppo di ratti è stato tenuto in osservazione per un ugual periodo di giorni, senza ricevere alcun trattamento. Al 15° giorno, 3 h dopo l'ultima iniezione di Cin, a tutti è stata praticata la fistola bi-

liare temporanea come riportato in un precedente paragrafo (detti dell'avesi). Di poi si è raccolta la bile per 24 h dosando su di essa il colesterolo totale con il metodo di Sperry e Webb (l.c.) con le modifiche avanti descritte. Per l'estrazione del COL sono stati utilizzati 2 cc di bile (°).

I risultati delle prove da noi eseguite sono riportate nella tabella n. 10, sotto forma di valori medi con il rispettivo errore standard.

(°) Data la scarsa quantità di colesterolo presente nella bile preferiamo eseguire sempre l'estrazione su quantità piuttosto notevoli (almeno 0,8 cc.) di bile stessa, ove naturalmente, come nel caso in esame, ci sia consentito dal volume di bile a nostra disposizione.

T A B E L L A N. 10

An. n.	Tratta- mento	Colesterolto totale biliare presente nella bile di 24 h		
		mg % \pm S.M	Variazione per- centuale rispet- to ai controlli fatti = 100	P
5	-	10,24 \pm 0,5	-	-
5	Cin 400 mg/ Kg/die per 15 gg. Ultima i- niezione 3 ⁴ h avanti inizio raccolta bile	8,21 \pm 0,8	- 20	0,05

In base alla prova riferita sembra che la Cin per trattamenti prolungati sia in grado di modificare in maniera apprezzabile ($P = 0,05$), nel senso dell'inibizione, la sintesi epatica del colesterolo.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dai dati avanti riferiti risulta che la Cin è in grado di esplicare notevoli azioni sul metabolismo del colesterolo. Difatti iniettata per via endovenosa nel coniglio in dosi opportune la Cin determina abbassamenti della colesterolemia che raggiungono la significatività statistica; inoltre per opportune modalità di somministrazione è in grado di ostacolare nel ratto la ipercolesterolemia da Triton, e, sempre nel ratto, di inibire alquanto la sintesi epatica di colesterolo.

Si ricordi a tal proposito che alcuni fra i più noti ipocolesterinemizzanti di sintesi (ac. feniletilacetico ed ac. difeniletilacetico) avrebbero le medesime proprietà (32) (33) (34) (35) (36).

Peraltro il composto non modifica nel ratto i valo-

ri colesterinemici basali per somministrazioni prolungate anche di dosi di 400 mg/Kg/die, comportandosi così in modo analogo ai più noti ipocolesterinemizzanti, gli ac. feniletil (*) e difeniletilacetico (36); anche il contenuto di colesterolo dei diversi organi e tessuti non è stato significativamente modificato, se si eccettui un aumento del colesterolo nel surrene di alcuni gruppi di animali trattati in maniera cronica con dosi elevate di Cin.

Prove condotte in vitro allo scopo di chiarire alcuni dei risultati avanti ricordati, hanno documentato la incapacità del composto di favorire la solubilizzazione del colesterolo in mezzi nei quali è insolubile.

(*) L'ac. feniletilacetico abbasserebbe, per trattamenti assai più prolungati di quelli da noi effettuati con la cinarina, del 15% la colesterolemia del ratto (37).

Il potere colesterolitico in vitro del siero umano non è stato gran che influenzato.

L'attività colesterolesterasica del siero umano è apparsa accentuata dalla Cin, ma solo per concentrazioni elevate.

In base a quanto osservato, potrà essere interessante studiare, in clinica umana, gli effetti dell'ac. 1,4 dicaffeilchinico in tutte le condizioni morbose nelle quali sia opportuno influenzare il metabolismo del colesterolo, come negli stati pleriorici e vascolodisgresici (nei quali particolarmente favorevole può essere anche l'effetto coleretico e diuretico del farmaco) nelle ipercolesterolemie prearteriosclerotiche ed anche nella malattia arteriosclerotica conclamata.

L'interesse di ulteriori studi farmacologici e clinici in tal senso rigiede proprio nel fatto che, al giorno

d'oggi, malgrado le più recenti teorie circa la patogenesi della malattia arteriosclerotica (38) (39), il fattore colesterolico riveste nella patogenesi dell'anzidetta malattia un'importanza indiretta o diretta tutt'altro che trascurabile (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46).

====O====

R I A S S U N T O

L'ac. 1,4 dicaffeilchinico, estratto dal carciofo e ottenuto per via sintetica, è apparso in grado di determinare effetto ipocolesterinemizzante evidente per somministrazioni uniche endovenose nel coniglio, di ostacolare alquanto nel ratto l'ipercolesterolemia da Triton, e di ridurre, sempre nel ratto, la sintesi epatica di colesterolo.

L'ac. 1,4 dicaffeilchinico non ha modificato in maniera apprezzabile i valori colesterinemici del ratto e del coniglio per somministrazioni prolungate né il contenuto in colesterolo del fegato e del surrene.

In prove in vitro è stato trovato incapace di favorire la solubilizzazione del colesterolo in mezzi nei quali è insolubile ovvero di accentuare in maniera evidente

il potere colesterolitico del siero; in concentrazioni elevate ha accentuato l'attività colesterolasica del siero umano.

Se ne prospetta l'impiego in affezioni caratterizzate da alterato metabolismo del colesterolo e in particolare negli stati prearteriosclerotici e nella malattia arteriosclerotica.

=====
000====

B I B L I O G R A F I A

- 1) LECLERC H. - Presse Méd. 36, 1546, 1928.
- 2) BREL I. - Bull. Soc. Thér. 11 giugno del 1929.
- 3) CHOMEL e IEMERY - cit. da CHABROL e coll., 4.
- 4) CHABROL E., CHARONNAT R., MAXIMIN M., WAITZ R. - C.R. Soc. Biol. 108, 1020, 1931.
- 5) ROSA G.E. - Gaz. des Hôp. 107, 21, 1934.
- 6) BEGGI A. e DETTORI B. - Polycl. Sez. prat. 41, 489, 1934.
- 7) TIXIER L. ed ECK M. - Bull. Soc. Thér. 11 aprile del 1934.
- 8) RAVINA A. - Presse Méd. 42, 1299, 1934.
- 9) ECK M. e DESBORDES I. - C.R. Soc. Biol. 117, 428, 429, 615 e 681, 1934.
- 10) ECK M. e DESBORDES I. - Ibidem 118, 498, 1935.
- 11) ECK M. e DESBORDES I. - Ibidem 118, 11, 341, 1935.
- 12) TIXIER L. - Presse Méd. 42, 880, 1939.
- 13) SCHONHOLZER G. - Schweiz. Med. Wschr. 69, 1288, 1939.
- 14) ROFFO A.H. - Bol. Inst. Med. Exper. Cancer. 20, 65, 1943.
- 15) LEGRAND G. - C.R. Soc. It. Biol. 227, 600, 1948.
- 16) DEL VECCHIO V. - Boll. Soc. It. Biol. Sp. 29, 48, 1953.
- 17) GAUDIN O. - Bull. Soc. Pharmacol. 46, 167, 1939.

- 18) OUDOT P. - Rev. de phytothér. 80, 27, 1948.
- 19) PANIZZI L. e SCARPATI M.L.: Gazz. Chim. it. 34, 792, 1954.
- 20) PANIZZI L., SCARPATI M.L. e SCARPATI R.: Gazz. Chim. it. 34, 806, 1954.
- 21) GÜNTHER - in Guy Pomeau Delille, Techniques biologiques et éndocrinologie expérimentale chez le rat, Masson et Cie éd. Paris 1953, pag. 161, 199.
- 22) FISHER R. - Metodi statistici ad uso dei ricercatori, U.T.E.T. Torino, p. 161, 1948.
- 23) SPERRY W.M. e WEBB M. - J. Biol. Chem., 187, 97, 1950.
- 24) PREZZIOSI P. e LOSCALEO B.: Fitoterapia 22, 666 e 690, 1956.
- 25) KELLNER A., CORREL I.W., LADD A.T. - J. exp. Med. 93, 373, 1951.
- 26) FRIEDMANN M. e BYERS S.O. - J. exp. Med. 22, 117, 1953.
- 27) FRANTZ I.D. e HINKEIMAN B.T. - J. exp. Med. 101, 227, 1955.
- 28) HIRSCH R.L. e KELLNER A. - J. exp. Med. 104, 1 e 15, 1956.
- 29) TAYEAU F. - Exposés ann. Bioch. Méd. Masson et Cie id. Paris, vol. 17°, p. 213, 1955.
- 30) TAYEAU F. - Arch. Sci. Biol. 19, 545, 1955.
- 31) BYERS S.O. e FRIEDMANN M. - Am. J. Physiol. 168, 292, 1952.
- 32) GOTTEZ J., MATHIVAT A., REDEL J. - Presse Méd. 62, 939, 1954.

- 33) ROSSI C.A. e SANGUINETTI F. - Giorn. Biochimica 4, 240, 1955.
- 34) MININNI G. e LE BRUN G. - Min. Med. 46/II, 1864, 1955.
- 35) GARATTINI S., MORPURGO C. e PASSERINI N. - Boll. Soc. It. Biol. Sp. 32, 80, 1956.
- 36) GARATTINI S., MORPURGO C., MURELLI B., PAOLETTI R., PASERINI N. - Arch. inter. pharmacodyn, 109, 400, 185.
- 37) COFET J., VIGNALOU J., REDEL J. e COLAS-BELCOUR - Bull. et Mém. Soc. Hôp., Paris 62, 903 sgg., 1953.
- 38) NICROSINI F. - Il Farmaco, 12, 125, 1957.
- 39) CICALA P. - La sintesi 1, 112, 1957.
- 40) KATZ L.N. - Sett. Med. 38, 483, 1950.
- 41) FIRSTBROOK J.B. - Brit. Med. J. n. 4724 - II - 133 - 1951.
- 42) SEHR D. e CHUNG J. - J. MOUNT SINAI Hosp. 14, 106, 1952.
- 43) MILLOT J. - Le Concours Méd. 37, 3043, 1953.
- 44) KATZ L.N., KEYS, GOTMANN - Ibidem p. 3049.
- 45) FAVARGER P. - Exposés ann. Bioch. Méd., Masson et Cic. éd. Paris, vol. 15°, p. 93, 1953.
- 46) FRIEDMANN M. - Journ. Gerontol. 10, 60, 1955.
- 47) KEYS A. - Lancet n. 6900, II, 1103, 1955.