

Misc B 70 / 27

27

PROF. ITALO SIMON



Sulla necessità di adottare criteri internazionali stabili e definitivi per la determinazione della dose minima letale dei farmaci in modo di poter disporre di mezzi sicuri di confronto della tossicità dei farmaci.

Studii e proposte

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", - VOL. VI, 1945

PROF. ITALO SIMON

Sulla necessità di adottare criteri internazionali stabili
e definitivi per la determinazione della dose minima
letale dei farmaci in modo di poter disporre di
mezzi sicuri di confronto della tossicità dei farmaci.

Studii e proposte

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", - VOL. VI, 1945

ITALO SIMON

SULLA NECESSITÀ DI ADOTTARE CRITERI INTERNAZIONALI STABILI E DEFINITIVI PER LA DETERMINAZIONE DELLA DOSE MINIMA LETALE DEI FARMACI IN MODO DI POTER DISSPORRE DI MEZZI SICURI DI CONFRONTO DELLA TOSSICITÀ DEI FARMACI. STUDI E PROPOSTE

GÌÀ altre volte ho trattato dell'importanza che ha il possesso di dati sicuri, confrontabili, sulle dosi minime letali dei farmaci [1]. Sono stato il primo ad affrontare l'importante e fondamentale problema [2]: ho in venti anni determinato e fatto determinare in Istituto con metodo univoco molte dosi letali minime. Mi pare perciò giunto il momento di raccogliere i molti dati ottenuti e di formulare la proposta che costituisce lo scopo del presente lavoro. Prima però è necessario esaminare da vari punti di vista l'argomento, ciò che varrà a preparare il terreno atto a giustificare la proposta per la quale i tempi mi sembrano maturi e che, senza dubbio, passato il momento attuale, troverà accoglienza favorevole nel mondo dei farmacologi o, per lo meno, diventerà oggetto di discussioni feconde.

I. — IMPORTANZA FARMACOLOGICA E TERAPEUTICA DELLA CONOSCENZA DELLA DOSE MINIMA LETALE DEI FARMACI.

La necessità di determinare per ogni farmaco la dose minima letale, almeno per una delle tante vie di somministrazione, non è oggi pienamente intesa da molti ricercatori, sebbene Falck fin dal 1884 [3]

avesse determinato in modo esattissimo la dose minima letale dei sali di stricnina per via sottocutanea. Il suo esempio non ebbe il seguito che si sarebbe desiderato. Infatti, se si cercano le dosi minime letali dei farmaci, anche in libri assai recenti, si trovano dati assai imprecisi ed anzi molto spesso vi si parla di dosi letali pure e semplici. Ora indicare semplicemente la dose letale x di un farmaco senza alcun'altra indicazione è dare una nozione la quale può appena servire come orientamento per ricerche successive, essendo ben noto che le dosi letali di un farmaco per le diverse vie di somministrazione possono essere infinite. A maggior ragione, se l'incomprensione in argomento fu quasi generale, non si devono trascurare le acquisizioni recenti, sulle quali avrò occasione di fermarmi in seguito, perchè esse possono costituire la base e la guida di nuove ricerche atte a formare un corpo di cognizioni la cui necessità si va di giorno in giorno manifestando più indispensabile. Infatti l'importanza della conoscenza della dose minima letale di un farmaco è fondamentale sia dal punto di vista farmacologico che da quello terapeutico. Dal primo punto di vista la nozione sicura in proposito consente: di porre un farmaco in una data categoria piuttosto che in un'altra, di passare a confronti, pienamente attendibili e di studiare il rapporto fra azione farmacologica e costituzione chimica. Ci illumina inoltre sulle cause della morte e, conseguentemente, sull'azione del farmaco sui vari organi, apparecchi e sistemi dell'organismo. Dal lato terapeutico offre elementi sicuri per la posologia e per le possibili applicazioni alla cura delle malattie sia nell'uomo che negli animali.

II. - DELLA DOSE MINIMA LETALE IMMEDIATA E DELLA DOSE MINIMA LETALE LONTANA (O NON IMMEDIATA, O A DISTANZA).

Quando si somministra un farmaco in dose tale che uccide l'animale da esperimento la morte può aversi o subito dopo la somministrazione o ad una certa distanza da questa. Nel primo caso si ottiene una dose letale immediata, nel secondo una dose letale lontana. Se, nel modo che sarà esposto in seguito, avremo determi-

nato non una dose letale qualsiasi, ma la dose minima letale, si otterrà o la *dose minima letale immediata* o la *dose minima letale lontana*. Le vie che si prestano meglio per queste ricerche sono l'endovenosa, l'intramuscolare, la sottocutanea, meno la gastrica, la quale non può dare la morte immediata se non in alcuni casi particolari, ancora meno l'endoperitoneale, via ricca di cause d'errore sulle quali avrò occasione di ritornare più tardi.

Fra le due dosi letali corre la seguente differenza: l'*immediata* è sempre l'espressione di un fatto grossolano, brutale, che spegne la vita con un'azione rapida sulle funzioni circolatoria e respiratoria; che, in genere, non consente di estendere l'analisi all'effetto dei farmaci sugli altri organi; che, perciò, a meno che non si tratti di sostanze ad azione elettiva sui sistemi circolatorio o respiratorio, non dà indicazioni sufficienti sul vero modo di agire del farmaco. La dose minima letale *lontana*, quando è possibile ottenerla, permette, invece, di cogliere bene l'azione dei farmaci sui vari organi o, per lo meno, dà modo d'individuare così nettamente da consentire l'impostazione di esperienze adeguate al fine che interessa. Da quanto si è detto si comprende che nel caso della ricerca della dose letale immediata s'introduce nell'organismo dell'animale d'esperimento un eccesso di dose rispetto a quella più piccola che può dare la morte (d. m. l. lontana), eccesso col quale si crea un quadro tutto particolare, che molte volte, anzi quasi sempre, maschera il vero modo d'agire del farmaco.

Non sempre è possibile determinare la dose minima letale lontana, almeno per certe vie d'introduzione. Esempio tipico quello dei sali di stricnina nei quali la dose minima letale immediata e quella lontana sono identiche: infatti la morte degli animali avviene sempre con una data dose a pochi minuti di distanza dall'iniezione. Altre volte è assai difficile determinare la dose minima letale immediata per una data via o anche per diverse vie. Ad esempio, quando s'impiega la via endovenosa coi sali di tetrametilammonio, se l'iniezione è rapida si ha la morte con dosi piccolissime, mentre, se l'iniezione viene fatta lentamente, il farmaco, a mano a mano che entra nell'organismo, viene rapidamente trasformato in prodotti atossici o poco tossici sicchè si possono introdurre dosi altissime senza produrre disturbi pericolosi per

la vita dell'animale [4]. Comunque si tratta di eccezioni che non infirmano la regola.

III. — SUL MODO DI DETERMINARE LA DOSE MINIMA LETALE.

Incomincio col fissare alcuni punti fondamentali.

- a) La dose minima letale dei farmaci si può determinare per diverse specie animali (ascaridi, rane, rospi, pesci, piccioni, polli, topi, ratti, cavie, conigli, cani, asini, ecc.);
- b) Si può determinare per diverse vie: endovenosa, endoperitoneale, intramuscolare, respiratoria, sottocutanea, gastrica ecc.;
- c) Non esiste ancora un accordo internazionale circa la specie animale su cui ottenerla a preferenza delle altre e circa la via che è più conveniente impiegare.

C'è, per esempio, chi ancora oggi fa esperienze, per una data via, su rane, e si crede autorizzato, senz'altro, a confrontare i dati suoi con quelli di autori che, sullo stesso animale, in stagioni diverse ed in altri paesi hanno molti anni prima determinato una dose letale (che non è mai la minima) con altri farmaci. C'è chi studia le dosi letali indifferentemente per una via qualsiasi di introduzione: chi impiega animali inferiori, chi animali superiori, e via dicendo. Non si è ancora riusciti ad intendersi per seguire, in tali ricerche, metodi e criteri uguali in tutti i Laboratori farmacologici in modo da ottenere una raccolta cospicua di dati sicuri ed esatti che permettano comparazioni attendibili. Ne è scaturita una massa confusa di nozioni fra le quali è difficile orientarsi, sicchè chi vuol avere dati sicuri è costretto a rifare ricerche per conto suo. Frequenti sono infatti le contraddizioni fra AA. che studiarono lo stesso farmaco: ma, se si fa un esame accurato dei risultati degli autori che si contraddicono, si trova che le modalità tecniche impiegate da essi sono assolutamente diverse e tali da portare a conclusioni differenti.

Or sono molti anni io ho cercato di stabilire alcune massime per la ricerca della dose minima letale, che riassumo brevemente, aggiungendovi quelle altre constatazioni cui mi hanno portato le ricerche fatte dopo la pubblicazione di quel lavoro.

IV. - DELLA DOSE MINIMA LETALE PER VIA ENDOVENOSA.

SULLA NECES-
SITÀ DI ADOT-
TARE ECC.

È chiaro che non si può determinare tale dose se non per i farmaci liquidi per sé, o solubili in acqua, o pseudosciolti (colloidi). La ricerca della dose minima letale immediata richiede una lunga serie di esperienze nelle quali il farmaco venga introdotto in circolo con velocità d'iniezione diverse. Si ottengono così varie dosi letali. Se segniamo sulle ascisse la velocità dell'iniezione e sulle ordinate la dose minima letale si ottiene una *curva di tossicità* (che io descrissi per primo nel 1905 [2]), dalla quale si ricava la *dose minima letale alla minima velocità*. Curve analoghe furono poi ottenute da Sabbatini per alcuni composti ossigenati del c'oro [5], da Rabbeno per i saponi e per l'acido oleico [6], da Testoni per il nitrato mercurico [7]. Accanto ad esse, solamente perchè permettono di rilevare la minima dose alla minima velocità, si possono porre le curve ottenute da me col cacodilato [8] e col metilarzinato di sodio [9]. Ma non sempre le curve presentano un solo minimo di tossicità ad una velocità minima: talora i minimi sono diversi a velocità diverse. Così, ad esempio, risulta da esperienze di Meneguzzi col cloruro d'ammonio [10], di Rabbeno con l'acqua di mare [11] e col cloruro di sodio [12], di Testoni col nitrato mercurico [7].

Sicchè possiamo sicuramente affermare che la determinazione della dose minima letale dei farmaci per via delle vene è laboriosa e che non sempre riesce a conseguire lo scopo. Questa conclusione non vuole affatto dire che la ricerca non sia utile, ed anzi necessaria, dal punto di vista farmacologico: ci dice solamente che, se si vuole conoscere la dose minima letale per via endovenosa, questo metodo non sembra il più adatto. Appare perciò senza dubbio più consona allo scopo la determinazione della dose minima letale lontana che da molti anni praticiamo sistematicamente in Laboratorio tutte le volte che studiamo un farmaco.

Per avere dati confrontabili noi sperimentiamo sempre sul coniglio e procediamo nel modo seguente. Scelta una concentrazione della soluzione da impiegarsi, la iniettiamo, di regola, in una vena marginale di un orecchio, e, quando vediamo insorgere fenomeni tes-

sici, sospendiamo l'iniezione e mettiamo in libertà l'animale rilevando accuratamente i sintomi e seguendo il soggetto fino a che si riprende oppure interviene la morte. Nel primo caso somministriamo ad altri animali dosi via via più elevate fino a che cadiamo nella dose minima letale cercata: nel secondo, invece, iniettiamo ad altri animali, in serie, dosi progressivamente minori fino a che si tocca la dose minima letale. Nell'un caso e nell'altro, però, si ha cura di somministrare dosi superiori ed inferiori alla minima letale, in modo da eliminare dubbi di sorta sul valore effettivo della dose cercata.

Di regola poi si pratica l'autopsia degli animali venuti a morte e si procede all'esame istologico degli organi, ciò che permette di convalidare i risultati conseguiti con l'esame dei sintomi durante la sopravvivenza degli animali e di indicare con precisione, quasi sempre, le cause della morte.

Nel praticare cosifatte ricerche occorrono parecchi accorgimenti. In primo luogo è necessario scegliere accuratamente gli animali: non troppo giovani nè avanzati in età, di peso poco diverso l'uno dall'altro, apparentemente in buono stato di salute (l'eventuale debole resistenza al farmaco ed i risultati dell'autopsia e degli esami istologici ci diranno poi quali animali erano malati) e, quando si tratti di femmine, assicurandosi che non sieno gravide.

Data poi l'importanza che la velocità dell'iniezione ha sui risultati bisogna scegliere una velocità che per sè non sia tossica (*): l'iniezione deve essere praticata con lentezza e, se si tratta di un veleno ad azione cardiaca, è bene sospenderla per qualche momento non appena si facciano palesi sintomi di depressione della funzionalità del cuore (per questo l'esperimentatore deve tenere a contatto del torace dell'animale uno stetoscopio unito mediante un tubo di gomma ad un oliva che introduce in un meato uditivo), salvo a riprendere l'iniezione quando ogni pericolo è cessato.

È ugualmente necessario scegliere concentrazioni del farmaco che non ledano i tessuti e che consentano la penetrazione in circolo di dosi non eccessive nell'unità di tempo.

(*) Il primo a parlare di *velocità tossica* fu DASTRE nel 1888 [DASTRE e LOYE, « Archiv. de Physiol. norm. et pathologique », 2 (Serie 4), 1888, 93].

Non bisogna servirsi di materiale che possa reagire chimicamente coi mezzi impiegati per l'iniezione o che favorisca la formazione di precipitati dei farmaci che s'introducono nelle vene. Nel primo caso occorre servirsi di cannule di vetro e non di metallo: nel secondo occorre impiegare o cannule di metallo munite di un canale piuttosto largo o cannule di vetro.

Dissi più avanti come per certi farmaci sia assai difficile determinare la dose minima letale immediata per via endovenosa e diedi l'esempio dei sali di tetrametilammonio. Aggiungo ora un altro esempio, quello dell'acido borico. Se iniettiamo, con velocità per sè non tossica, una soluzione satura di acido borico (4 %) nelle vene di un coniglio, noi vediamo che, introducendone cc 100 per kg., l'animale sta abbastanza bene e muore dopo sei ore dalla fine dell'iniezione [13]. È chiaro che iniettando ancora la soluzione nelle vene l'animale sarebbe venuto a morte, ma è altrettanto palese che la morte non si sarebbe dovuta attribuire solamente all'acido borico, ma ad un complesso di condizioni abnormi delle quali la dose del farmaco somministrata avrebbe rappresentato solamente uno dei fattori.

V'è anche il rovescio della medaglia, vale a dire con alcuni farmaci si ottiene la dose minima letale immediata e non la lontana: così per i sali di stricnina: così per tutti i farmaci molto tossici, quali in genere molti alcaloidi. Sebbene teoricamente si possa ammettere per essi una dose m. l. lontana, dal punto di vista pratico è impossibile ottenerla e si deve concludere che le due dosi, minima l. immediata e m. l. lontana, praticamente coincidono.

V. — DOSE MINIMA LETALE PER VIA SOTTOCUTANEA.

I farmaci che si introducono per via sottocutanea possono essere liquidi, o sciolti in acqua, o sciolti in altri solventi [idrocarburi, alcoli (glicole, glicerina), olio, acetamide, ecc.], o sospesi in veicoli diversi, od emulsionati.

Anche per questa via si possono determinare sia la dose minima letale immediata come la dose minima letale lontana.

Quando i farmaci liquidi o solidi sono solubili in acqua di regola si possono ottenere tutt'e due le dosi minime. Fanno eccezione alcuni farmaci ad azione potentissima (quali, ad esempio, la stricnina ed altre sostanze attivissime a dosi minime) per le quali non si può ricavare praticamente la dose lontana, ma solamente la immediata. In questo caso le due dosi praticamente coincidono.

Ma, di regola, l'importanza della dose m. l. immediata non ha il valore della lontana. Così ad esempio determinando le dosi minime letali per via sottocutanea del cacodilato di sodio nel coniglio trovai i seguenti valori [8]:

g. 5/Kg: l'animale muore dopo ore 2,11 .

g. 0,5/Kg: l'animale muore dopo ore 11.

È chiaro che, se avessi introdotto sotto la cute g. 7-8 per Kg., la morte sarebbe avvenuta qualche minuto dopo l'iniezione ed è anche intuitivo che non avrei potuto fare un'analisi dettagliata delle cause della morte perchè la sintomatologia sarebbe stata assai diversa e l'esame istologico degli organi non mi avrebbe permesso di rilevare quanto vidi poi nell'animale morto con la dose minima letale lontana. Quindi, se la dose minima letale immediata per questa via può aver valore per i confronti con la corrispondente dose lontana, non ne ha affatto quando si vuole conoscere la tolleranza dell'animale e la vera causa della morte.

Molte sono le possibili cause d'errore nella somministrazione sottocutanea, dalle quali bisogna guardarsi.

a) È indispensabile che le soluzioni vengano preparate in solventi per sè privi d'azione (acqua, olii vegetali, olio di vaselina). Altri solventi frequentemente usati come la glicerina [14] ed il glicole etilenico [15] possono per conto loro uccidere o, per lo meno aggiungere la loro azione a quella del farmaco.

b) La presenza di colloidi organici viscosi, come gomma arabica, amido, albumina [16], o di sostanze che in concentrazione elevata possono assumere la funzione colloidale (zuccheri), può diminuire la tossicità dei farmaci.

c) La presenza di elettroliti può alla sua volta diminuire la tossicità dei farmaci: ad esempio è noto che il cloruro, il bromuro,

l'ioduro di sodio possono diminuire la tossicità del bicloruro di mercurio [17] e quella della stricnina [18]; che il cloruro [19], il solfato [20] ed il fosfato bisodico [21] diminuiscono l'attività farmacologica della chinina.

d) L'ipertonìa o l'ipotonìa delle soluzioni può modificare profondamente la rapidità dell'assorbimento dei farmaci e quindi la loro attività [22].

e) L'invecchiamento dei farmaci può alla sua volta portare ad errori gravi in quanto le soluzioni acquose di molti alcaloidi si alterano dopo poco tempo dalla loro preparazione (così avviene delle soluzioni di solfato neutro d'atropina [23], di quelle di cloridato di morfina, di pilocarpina, di cocaina, ecc. [24]).

e) La presenza di sostanze ad azione vasocostrittrice (adrenalina) può ritardare l'assorbimento dei farmaci [25]: così può avvenire per la presenza di sostanze astringenti [26].

*SULLA NECES-
SITÀ DI ADOT-
TARE ECC.*

VI. — DOSE MINIMA LETALE PER VIA GASTRICA.

Come già scrissi nel lavoro citato questa via dev'essere, di regola, riservata ai farmaci insolubili in acqua od in altri solventi atosici o, se solubili, così poco attivi che bisognerebbe introdurli per via endovenosa o sottocutanea in volumi eccessivamente elevati di solvente. Qualche volta però questa via si adopera per i farmaci solubili in acqua quando si debbano fare confronti con farmaci insolubili.

I farmaci si somministrano a mezzo di sonda gastrica sospesi in acqua allorchè si tratta di dosi non eccessive: emulsionati con gomma arabica quando si debbano somministrare dosi elevate: gli animali devono essere digiuni da 12 ore, in stato eccellente di salute e non in condizioni fisiologiche speciali (gravidanza, puerperio, allattamento).

La precisione dei risultati che si ottengono per questa via non è forse così grande come per le altre finora considerate, ma è certamente notevole e tale da permettere di toccare mete pienamente attendibili.

VII. - DOSI MINIME LETALI (*) OTTENUTE FINORA IN ISTITUTO SUL CONIGLIO.

A) *Via endovenosa.*

a) *Dosi minime l. lontane di sali di sodio ad anione inorganico*

	g-mol normali per Kg		g-mol normali per Kg
Solfato di sodio	0,05650 [27]	Fosfato bisodico	0,00900 [32]
Cloruro di sodio	0,05000 [28]	Solfito di sodio	0,00550 [33]
Bromuro di sodio	0,03900 [28]	Perborato di sodio	0,00389 [31]
Nitrato di sodio	0,03100 [29]	Fluoruro di sodio	0,00250 [34]
Fosfato monosodico	0,02850 [30]	Persolfato di sodio	0,00150 [27]
Joduro di sodio	0,01460 [28]	Nitrito di sodio	0,00050 [29]
Borato di sodio	0,01046 [31]		

b) *Dosi minime l. lontane di sali di sodio ad anione organico*

	g-mol normali per Kg		g-mol normali per Kg
Lattato di sodio	0,0455 [35]	Sale di sodio del p. amino- fenilsolfonamidetiazolo (**)	0,0040 [40]
Piruvato di sodio	0,0430 [36]		
Gluconato di sodio	0,0353 [37]	Sale di sodio della p. ami- no-fenilsolfonamide-pi- ridina (**)	0,00383 [40]
Jodossipiridinacetato di sodio	0,0274 [38]		
Acetato di sodio	0,0260 [39]	Sale di sodio del p-amino fenil-solfonamide metil- tiazolo (°°)	0,00353 [40]
Cacodilato di sodio	0,0125 [8]		
Metilarsinato di sodio . .	0,0113 [9]	Sale di sodio della p. ami- no-fenilsolfonamide (**) .	0,00191 [40]
Tartrato di sodio . . *	0,0075 [39]		

c) *Dosi minime l. lontane di alcuni sali di calcio e di stronzio*

	g-mol normali per Kg		g-mol normali per Kg
Piruvato di calcio . .	0,0180 [41]	Lattato di calcio	0,0070 [41]
Gluconato di calcio . .	0,0130 [41]	Guaiacolglicolato	0,0060 [41-ter]
Canfosulfonato di calcio	0,0100 [41-bis]	Cloruro di stronzio	0,0134 [64]
Cloruro di calcio . .	0,0080 [41]		

(*) Sono compresi i farmaci per i quali la dose minima letale immediata e quella lontana coincidono.

(**) Le esperienze furono praticate col mio metodo.

d) *Dosi minime l. lontane di alcuni composti organici*

*SULLA NECES-
SITA' DI ADOT-
TARE ECC.*

g-mol normali per Kg		g-mol normali per Kg	
Alcool metilico	0,1320 [42]	Cloridrato di semicar- bazide.	0,00441 [44]
Glicole etilenico	0,1080 [15]	Antipirina	0,00420 [45]
Glicerina	0,0900 [15]	Acido acetilsalicilico . .	0,00388 [46]
Alcool etilico	0,0870 [42]	Solfoguaiaicolato di potassio	0,000151 [65]
Uretano etilico	0,0224 [43]	Guaiacolo	0,000095 [47]
g-mol normali per Kg			
e) Acido borico	0,043 [13]		

B) *Via sottocutanea.*

Dosi minime l. lontane di diversi farmaci

g-mol normali per Kg		g-mol normali per Kg	
Glicole etilenico	0,1438 [15]	Ioduro di tetrametilammo- nio	0,000198 [52]
P. aminofenilarsinato di mercurio.	0,0292 [48]	Formiato di tetrametilam- monio.	0,000175 [53]
Glicerina	0,0220 [14]	Cloruro di tetrametilam- monio.	0,000136 [54]
Cacodilato di sodio . . .	0,0156 [8]	Fosfato di tri-tetrametil- ammonio	0,000088 [49]
Metilarsinato di sodio . .	0,0124 [9]	Arsenito di tri-tetrametil- ammonio	0,000086 [51]
Idrato di tetraetilammonio	0,00143 [50]		
Fosfato di tri-tetraetil- lammonio	0,00100 [49]		
Idrato di tetrametilammo- nio	0,000219 [50]		

C) *Via gastrica.*

Dosi minime l. lontane di alcuni farmaci

g-mol normali per Kg		g-mol normali per Kg	
Uretano etilico.	0,02245 [55]	Cloralio idrato.	0,00362 [55]
Piramidone.	0,00368 [56]	Veronale	0,00239 [55]

Non mi fermo a fare considerazioni, che riservo ad altro lavoro. Ma è chiaro che si possono fare confronti sicuri, addirittura impossibili prima di possedere questi dati. Piccola è però la messe dei fatti noti di fronte ai bisogni della Farmacologia e della Terapia.

VIII. — CONFRONTO DEI RISULTATI OTTENUTI COL METODO
DELLA DETERMINAZIONE DELLA TOSSICITÀ LONTANA NEL
CONIGLIO COI RISULTATI RICAVATI CON ALTRI METODI
LARGAMENTE ADOTTATI.

Il metodo da oltre venti anni impiegato in Istituto mi ha permesso di ottenere la serie di dati che ho esposto nel par. 7.

Sono però ben noti e largamente impiegati anche fra noi metodi che, proposti per la determinazione della dose letale di una data sostanza, vennero poi estesi ad altri farmaci. Mi limito a parlare dei più importanti e più seguiti fra essi.

a) Uno è il metodo di Behrens [56]. Quest'A. trovò che nella rana temporaria la dose di k-strofantina per infusione endovenosa lenta varia da γ 0,186 a γ 0,549. Le 149 esperienze fatte dal novembre 1926 al febbraio 1928 gli dettero una dose letale media di γ 0,3264: egli ritiene che questa media possa rappresentare la dose minima letale del farmaco studiato. Le date delle esperienze, fatte in tre annate diverse, la constatazione che la dose letale massima è addirittura il triplo della minima, mi danno la sicurezza che il metodo non solamente si può estendere alla determinazione della dose minima letale di qualsiasi farmaco, ma che lascia del tutto scettici anche per quello che si riferisce alla k-strofantina. Nè l'applicazione di formule che l'A. propone, dopo queste manchevolezze fondamentali, può in alcun modo correggerlo.

b) Il metodo che attualmente gode un grande favore fra gli studiosi e quello cosiddetto di Trevan [57] che, viceversa, era stato proposto qualche anno prima da Shackell [58]. Quest'A. lo propose come metodo universale: Trevan se ne servi per titolare biologicamente la digitossina. Consiste nel somministrare a diversi gruppi numericamente uguali di animali della stessa specie (finora furono adoperati quasi sempre rane e topolini) dosi crescenti del farmaco in esperimento (ad ogni gruppo una dose) e nel rilevare il numero di animali che vengono a morte in ogni gruppo. Mettendo in grafica sulle ascisse la dose somministrata e sulle ordinate la percentuale degli animali morti, si ottiene una curva ad S, la parte mediana della quale è costituita da una linea dritta. Ciò significa che, fatta

eccezione delle dosi estreme, ad aumenti uguali di dose corrispondono aumenti uguali di effetto.

Trevan che, come dissi, qualche anno dopo otteneva una curva identica per la digitossina, fa il seguente ragionamento: « l'espressione dose minima letale, come è comunemente intesa, a torto suppone che per tutti i veleni esista solamente una data dose capace di uccidere tutti gli animali di una data specie, o la maggiore parte di essi, e che dosi assai più piccole non uccidano alcun animale di tale specie ». Partendo da tale concetto eseguì su diversi gruppi di rane la titolazione della digitossina e costruì una curva identica a quella ottenuta da Shackell. Chiamò valore centrale della curva quello nel quale il numero delle sopravvivenze e delle morti era uguale. Fra noi questo metodo fu usato, fra gli altri, da Scolari (59) e da Chiancone per i solfonamidici sui topolini (60), e, nel mio Istituto da Baldacci per lo studio comparato della tossicità del cloridrato e del l'ascorbato d'istidina (61). Quest'A. però avverte che l'impiegò perchè non poteva disporre di grandi quantità dei due farmaci, dimostratisi assai poco tossici nel coniglio.

c) Che vantaggio presentano questi metodi rispetto a quello della tossicità lontana sul coniglio?

Lasciamo senz'altro il metodo di Behrens che, per le cose dette, non regge ad una critica superficiale, e consideriamo quello di Shackell-Trevans.

Quando con questo metodo s'impiegano rane i risultati sono sempre meno sicuri che quando gli esperimenti si compiono su animali a sangue caldo: sono ancora più attendibili se si lavora su animali di grossa taglia. Ma quello che qui mi preme di affermare è che le esperienze sulle rane non possono servire per costituire un metodo di ricerca di valore universale. Infatti la resistenza di questi animali ai farmaci varia da paese a paese, da stagione a stagione, da razza a razza. Altro è sperimentare su rane nostrane di g. 30 ed altro su rane ungheresi, ad esempio, che pesano perfino g. 120. Valgono solamente le osservazioni fatte nello stesso momento, su rane della stessa provenienza, di peso press'a poco uguale, in condizioni perfettamente paragonabili. Mutando una delle condizioni sperimentali si mutano in modo impressionante i risultati,

*SULLA NECES-
SITA' DI ADOT-
TARE ECC.*

che diventano affatto inattendibili. Quindi le determinazioni sulla tossicità comparata dei glucosidi della digitale lanata valgono esclusivamente per quei glucosidi e per quel metodo, ma non si possono fare confronti con la tossicità di altri farmaci, a meno che non si tratti di esperienze praticate contemporaneamente nelle condizioni sperimentali più su indicate.

Le ricerche sui topolini richiedono un numero grandissimo di animali. Chiancone, ad esempio, nelle sue ricerche sui preparati solfonamidici ha impiegato 1000 topolini [61], un numero ancora maggiore ne ha impiegato Scolari [60]. Ma neppure le ricerche sui topolini si salvano da critiche assai facili e logiche. Dato il grande numero di animali che si deve inoculare e la loro piccolezza, sono facili gli errori involontari. Se, ad esempio, il farmaco viene somministrato per via endoperitoneale non è difficile iniettarlo nella compagine di un viscere addominale senza averne il più lontano sospetto: se si introduce sotto la cute si può cadere nel lume di un vaso, o nello spessore di un fascetto muscolare, o sotto una fascia aponeurotica e così si spiega che talora muoiono o sopravvivano alcuni animali contrariamente all'aspettativa. Si aggiunga che la resistenza dei topolini ai farmaci varia secondo la razza, secondo la regione ed il continente in cui vivono. Si tenga presente, infine, che gli animali venuti a morte in queste esperienze non furono sezionati, nè si praticò l'esame istologico dei loro organi (come si fa in Istituto coi conigli) e non è perciò possibile stabilire quali animali erano in stato di salute perfetta e quali, invece, debilitati da forme morbose, erano meno resistenti all'azione del farmaco. Perchè, se col metodo di Shackell e Trevan si riesce a stabilire in modo sicuro che col crescere della dose cresce la percentuale degli animali morti (ciò che, del resto, si dimostra con qualsiasi altro metodo), si è ben lontani da quella precisione che potrebbe servire per confronti di valore universale. Nè le formule di calcolo statistico proposte da diversi AA [62], possono sanare i difetti fondamentali ed insanabili del metodo.

Oggi la mia lunga esperienza personale mi porta ad affermare che quando si fanno ricerche col metodo adottato da noi in Istituto su conigli, a parità di condizioni sperimentali ed avendo cura di evitare le numerose cause d'errore, non solamente sia possibile

determinare la dose minima letale, ma che i risultati ottenuti sono sempre praticamente uguali e le esperienze quindi comparabili. Ne dò qualche esempio.

La dose minima letale di nitrato di stricnina determinata da Falck nel coniglio per via sottocutanea fu trovata esatta non solo da me, ma da tutti gli AA. che lavorarono in argomento; la dose minima letale di fosfato di tri-tetrametilammonio per via sottocutanea fissata da me nel 1932 [4] fu recentemente confermata da Gajatto [63]. Quest'A. trovò inoltre uguale a quella determinata da Cassano in Istituto [49] la dose minima letale per via sottocutanea del cloruro di tetrametilammonio nel coniglio [63]. La dose minima letale di cloradio idrato per via gastrica che io ho trovato [55] risultò quasi identica a quella di Bianchi in ricerche fatte in Istituto qualche tempo dopo (*).

Concludendo a me pare che, impiegando nelle esperienze volte a determinare la dose minima letale animali superiori di una certa taglia, e meglio di tutto, i conigli, che è facile procurarsi in grande numero, evitando con cura le facili cause d'errore indicate per ogni via, si può costituire quel corpo di cognizioni che valga a darci le dosi minime letali dei farmaci per le diverse vie d'applicazione. Una dimostrazione dei risultati che è possibile ottenere risulta già dalle mie esperienze riportate più innanzi. Ciò mi autorizza a formulare le proposte che formano oggetto del paragrafo che segue.

IX. — PROPOSTE RIGUARDANTI: LA SCELTA DELL'ANIMALE
SUL QUALE SI DEBBO NO FARE I CONFRONTI DELLE DOSI
MINIME LETALI; L'ADOZIONE UNIVERSALE DI CRITERII UNI-
VOCI E FISSI PER DETERMINARE TALE DOSE.

Ho esposto le ragioni per le quali le ricerche sulle rane e sui topi, che sono gli animali più largamente usati per la determinazione delle dosi letali, si debbano considerare infide e come, per conseguenza, non possono avere tutto il valore ad esse attribuito le formule appli-

(*) Ricerche di prossima pubblicazione.

cate ai risultati sperimentali da diversi AA. Dissi anche che bisogna lavorare su animali di una certa mole. L'animale più adatto sarebbe il cane, ma le razze e le varietà sue nel mondo sono tante che è assolutamente impossibile far cadere le esperienze sempre su animali della stessa razza e taglia. Meglio si presta il coniglio così comune, di facile allevamento, di taglia press'a poco uguale, salvo eccezioni particolari, in tutti i paesi.

Le regole che, a mio avviso, si dovrebbero adottare, sono le seguenti:

I. - L'animale di scelta per la determinazione delle dosi minime letali è il coniglio. Si debbono usare animali di media taglia, del peso di g. 1400-1800, adulti (nè giovani, nè vecchi), in stato di perfetta salute e, se di sesso femminile, non gestanti, nè durante l'allattamento, nè quando questo sia terminato da poco tempo. È bene tenere le femmine destinate all'esperimento separate dai maschi almeno un mese.

II. - Le vie che si debbono usare sono: l'endovenosa, la sottocutanea, la gastrica.

III. - La dose minima letale che si deve determinare è la *lontana* (o non immediata, o a distanza).

IV. - Quando si adopera la via endovenosa bisogna seguire i seguenti precetti. La soluzione del farmaco da impiegarsi dev'essere per sè poco tossica, vale a dire la sua concentrazione non troppo forte (nel qual caso s'introduce una dose troppo elevata nell'unità di tempo); nè, d'altra parte, dev'essere eccessivamente debole; sia una concentrazione adatta per ogni farmaco, che è necessario determinare con esperienze preliminari. L'iniezione endovenosa dev'essere praticata lentamente, in modo che la morte non sia prodotta da disturbi idraulici del circolo (*) o dall'introduzione di una dose eccessiva del farmaco nell'unità di tempo; durante l'iniezione occorre sorvegliare lo stato dell'animale, e se il farmaco ha azione

(*) DASTRE e LOYE (loc. cit.) hanno stabilito che quando la velocità d'iniezione supera in cc. 3,5 per kg e minuto nel coniglio si ha morte per disturbi idraulici del circolo.

sul cuore, praticare l'ascoltazione dell'organo durante l'iniezione in modo da poterla sospendere al minimo accenno di pericolo, salvo a riprenderla quando questo sia cessato; la vena d'elezione sia la marginale d'un orecchio o la giugulare quando per ragioni tecniche (pericolo di reazioni chimiche tra la cannula di metallo o di precipitazione del farmaco nelle cannule metalliche troppo strette) sia più opportuno immettere il farmaco in quest'ultima; occorre iniettare in diversi animali una serie di dosi; dalla innocua alla minima letale ed oltre, in modo da poter determinare con esattezza la dose cercata; venuti a morte gli animali l'autopsia e l'esame istologico degli organi deve dare la certezza dello stato di salute dell'animale e dimostrare l'azione dei farmaci sui vari organi e sistemi d'organi.

V. - Quando ci si serve della via sottocutanea l'iniezione deve essere praticata con cura in un fianco, dall'avanti all'indietro rispetto all'asse antero-posteriore del corpo dell'animale, avendo cura di evitare l'immissione del farmaco o nei muscoli, o sotto una fascia aponeurotica o in una vena. La concentrazione del farmaco dev'essere tale da non produrre alcun'azione locale. Occorre impiegare su molti animali una serie di dosi che comprendano le innocue e via via dosi crescenti fino alla minima letale ed oltre. Nel preparare le soluzioni bisogna guardarsi dal cadere nelle cause d'errore che furono esposte nella pagina precedente.

VI. - La via gastrica, in ultimo, deve essere impiegata quando si debba determinare la dose minima letale di farmaci poco tossici, insolubili o quasi in acqua o nei comuni solventi, che non sia possibile somministrare per altre vie. Altre volte si adopera anche per farmaci solubili, sia per confrontare la tossicità per « os » con quella per altre vie, sia per altri scopi sperimentali. Il coniglio dev'essere sempre digiuno da 12 ore. Il farmaco insolubile o poco solubile si somministri con sonda sospeso in acqua se la dose è piccola e bastano pochi lavaggi della sonda per avere la sicurezza che è penetrato completamente nello stomaco, ma, se il volume del farmaco è notevole, conviene emulsionarlo col minimo di gomma arabica possibile e lavare tre volte, avendo cura di non introdurre un volume eccessivo di acqua.

VII. — Le dosi letali devono essere riferite in grammi molecole normali.

VIII. — Sempre dopo la morte si deve praticare la sezione del cadavere e l'esame istologico degli organi in modo da poter conoscere la causa del decesso.

BIBLIOGRAFIA

- [1] SIMON I., « Archivio di Scienze Biologiche », 12, 1928, 478; « Archivio di Scienze Farmacologiche », 2, 1933, 425.
- [2] SIMON I., « Bollettino delle Scienze Mediche di Bologna », 5 (8), 1905.
- [3] FALCK F. A., « Arch. f. d. ges. Physiologie », 34, 1884, 50.
- [4] SIMON I., « Archives intern. de Pharmacodynamie et de Thér. », 46, 1933, 375.
- [5] SABBATANI L., « Archivio per le Scienze Mediche », 50, 1927, 301.
- [6] RABBENO A., « Archivio per le Scienze Mediche », 50, 1927, 331; Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmak., 134, 1928, 17.
- [7] TESTONI P., « Archives intern. de Pharmacodynamie et de Thér. », 32, 1926, 241.
- [8] SIMON I., « Archives int. de Pharmacodyn. et de Thér. », 42, 1932, 283.
- [9] SIMON I., « Archives is. id. », 44, 1933, 142.
- [10] MENEGUZZI R., « Archivio di Farmacol. sper. e Scienze aff. », 14, 1912, 41.
- [11] RABBENO A., « Archivio di Scienze Biologiche », 12, 1928, 469.
- [12] RABBENO A., « Archivio d id. id. », 13, 1929, 399.
- [13] NEGRI G., « Rassegna di Terapia e Patologia », 1, 1929, 472.
- [14] SIMON I., « Archivio di Farmacol. sper. e Scienze affini », 20, 1916, 120.
- [15] CORAZZA M., (in corso di stampa nella « Gazzetta degli Ospedali e Cliniche »).
- [16] SIMON I., « Bollettino della Soc. Medica di Parma », 1 (2), 1908; « Biochemische Zeitschr. », 22, 1909, 394.
- [17] SABBATANI L., « Archivio di Fisiologia », 3, 1905, 81.
- [18] SIMON I., « Archives int. de Pharmacodynamie et de Thér. », 33, 1927, 61.
- [19] SIMON I., « Bollettino della Soc. it. di Biologia sper. », 14, 1939, 131.
- [20] SIMON I., « Bollettino della Soc. it. di Biologia sper. », 14, 1939, 132.
- [21] SIMON I., « Bollettino id. id. », 14, 1939, 133.
- [22] SIMON I., « Archives int. de Pharmacodynamie et de Thér. », 50, 1935, 180.
- [23] SIMON I., « Archivio di Farmacol. sper. e Scienze affini », 15, 1913, 254; « Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche », 1915, n. 2.
- [24] MURA E. e PETITI E., « La Clinica Medica Italiana », a. 56, 1925, 298.
- [25] PATA A., « Archivio di Farmacol. sper. e Scienze aff. », 4, 1905, 229.
- [26] BARINETTI C., « Archivio id. id. », 16, 1913, 210.
- [27] DAL VAL E., « Archivio di Scienze Farmacologiche », 2, 1933, 445.
- [28] RAVASINI G., « Archivio id. id. », 2, 1933, 428.
- [29] BENEDET A., « Archivio id. id. », 2, 1933, 461.
- [30] GAJATTO S., « Archivio di Farmacologia sper. e Scienze aff. », 68, 1939, 87.

- [31] Esperienze inedite.
- [32] OSSER S., « Archivio di Scienze Farmacologiche », 2, 1933, 478.
- [33] PIVA A., « Archivio id. id. », 2, 1933, 435.
- [34] BOLLETTINO A., « Biochimica e Terapia sper. », 16, 1929, f. lo 9.
- [35] GAJATTO S., « Archivio di Farmacol. sper. e Sc. zaff. », 68, 1939, 54.
- [36] GAJATTO S., « Archivio id. id. », 68, 1939, 72.
- [37] GAJATTO S., « Archivio id. id. », 68, 1939, 1.
- [38] RAVASINI G., « Archivio di Urologia », 7, 1931, f. lo 5.
- [39] BARATTO M., « Archivio di Scienze Farmacologiche », 2, 1933, 495.
- [40] BERTELLOTTI L., « Archivio di Farmacol. sper. e Sc. aff. », 72, 1941, 145.
- [41] BALDACCÌ U., « Archivio id. id. », 62, 1936, 91.
- [41-bis] BALDACCÌ U., « Archivio id. id. », 65, 1938, 102.
- [41-ter] SIMON I., « Archivio id. id. », 68, 1939, 214.
- [42] NOÈ M., « Biochimica e Terapia sper. », 16, 1929, f. lo 8.
- [43] SPANIO A., « Archivio di Farmacologia sper. e Scienze aff. », 53, 1931, 55.
- [44] BATTISTONI L., « Bollettino della Soc. it. di Biologia sper. », 6, 1931, 863.
- [45] SPANIO A., « Archivio di Farmacologia sper. e Scienze aff. », 53, 1931, 122.
- [46] SIMON I., « Archivio id. id. », 55, 1933, 151.
- [47] BERTINO S. e PITTORRU Q., « Archivio id. id. », 67, 1939, 190.
- [48] TESTONI P., « Archivio id. id. », 41, 1926, 219.
- [49] SIMON I., « Archives int. de Pharmacodynamie et de Thér. », 47, 1934, 75.
- [50] Ricerche inedite.
- [51] SORBI U., « Archivio di Farmacologia sper. e Scienze affini », 65, 1938, 53.
- [52] Ricerche inedite.
- [53] GAJATTO S., « Archivio di Farmacologia, sper. e Scienze aff. », 65, 1938, 1.
- [54] CASSANO F., « Archivio di Farmacologia sper. e Scienze aff. », 65, 1938, 177.
- [55] SIMON I., « Archivio id. id. », 71, 1941, 180.
- [56] BEHRENS B., « Archiv f. exper. Pathologie u. Pharmak. », 140, 1929, 237.
- [57] TREWAN J. W., « Proc. of the Royal Soc. of London », 101, (serie B), 1927, 483.
- [58] SHACKELL L. F., « Journal of general Physiology », 5, 1923, 783; « Journ. of Pharmacology a. exper. Ther. », 24, 1924, 53.
- [59] SCOLARI E., « Giornale it. di Dermat. e Sifil. », 81, 1940, 843.
- [60] CHIANCONE F. M., « Archivio di Scienze Biologiche », 27, 1941, 273.
- [61] BALDACCÌ U., « Archivio di Farmacologia sper. e Scienze aff. », 70, 1940, 172.
- [62] KAERBER G., « Archiv f. exper. Path. u. Pharmak. », 162, 1931, 480.
- [63] GAJATTO S., « Archivio di Farmacologia Sper. e Scienze aff. », 71, 1941, 132.
- [64] FACCINI A., « Archivio id. id. », 62, 1936, 187.
- [65] BERTINO S. e PITTORRU Q., « Archivio id. id. », 67, 1939, 213.

RIASSUNTO

L'A. illustra il concetto della dose minima letale in Farmacologia e ne sottolinea l'importanza dal punto di vista scientifico e pratico. Rileva poi che nel campo farmacologico si determinano le dosi minime letali dei farmaci per le varie vie di ap-

**SULLA NECES-
SITÀ DI ADOT-
TARE ECC.**

plicazione con metodi non univoci che ci hanno dato una massa di cognizioni imprecise e tali da non permettere confronti sicuri. Conseguenza di questo stato di cose è che noi non disponiamo finora di una scala di tossicità dei farmaci nella quale si possano inquadrare i dati ottenuti coi composti nuovi che andiamo man mano studiando. Dopo una critica dei metodi oggi usati propone l'adozione di un metodo che egli da molti anni impiega nel suo Istituto sul coniglio e che, praticato con le cure particolari indicate dall'A., permetterebbe, quando fosse universalmente adottato, di avere a disposizione una serie di dati precisi che darebbero al capitolo delle dosi letali quella base indispensabile per i confronti che oggi ci manca quasi completamente. Riporta una lunga serie di dosi minime letali ottenute nel suo Istituto con tale metodo.

97847

250559





