



RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estratto dal vol. XXVIII, serie 6^a, 2^o sem., fasc. 1-2 ferie. - Roma, luglio 1938-XVI.

Fisiologia (Chimica biologica). — *Sull'effetto di iniezioni endomuscolari di estratti acquosi di fegato, rene e intestino, sul tasso cloroemico del ratto albino*⁽¹⁾. Nota⁽²⁾ di A. SALVATORI, presentata dal Corrisp. S. BAGLIONI.

In seguito ai lavori di Duval⁽³⁾, di Legueu, Palazzoli, ecc.⁽⁴⁾, si è potuto accertare, che nei tessuti traumatizzati si osserva un notevole aumento di cloro, tanto che, mentre normalmente, per es. nel muscolo, il tasso di questo elemento si aggira intorno all'1 per mille, in caso di trauma il tasso stesso si eleva fino al 4 e anche al 5 per mille. Ciò vale, non solo per i traumi occasionali, ma anche per i traumi provocati sperimentalmente. Gli autori sopra citati, in una bella ricerca sul coniglio, hanno trovato differenze notevoli nei muscoli e in organi, per es. il rene, sui quali si erano provocati dei traumi chirurgici, rispetto al muscolo e al rene rispettivamente simmetrici non traumatizzati.

Questo risultato si completa, nel suo valore, con quanto noi abbiamo potuto osservare in una ricerca ancora inedita, e cioè che il contenuto in cloro di vari organi pari e simmetrici (reni, testicoli, polmone, ecc.), è uguale rigorosamente nei due simmetrici.

Contemporaneamente alla determinazione del cloro negli organi traumatizzati gli autori sopra citati, hanno determinato il tasso cloroemico prima e dopo il trauma, tenendo distinto il plasma dai globuli. Ne è risultata una ipocloremia plasmatica, mentre il tasso del cloro globulare non è variato. Anche l'ipocloremia plasmatica non è stata in tutti i casi notevole; ma è noto che il tasso cloroemico molto difficilmente subisce variazioni notevoli. Comunque, dalle ricerche ora illustrate, si può trarre con un certo fondamento la convinzione, che, per effetto di un trauma, certamente si ha un aumento di cloro nel tessuto traumatizzato, e molto probabilmente questo aumento si effettua a spese del cloro ematico.

Questo risultato porta un notevole appoggio sperimentale all'ipotesi di Chabannier e Lobo-Onnel sul meccanismo dell'ipocloremia post-operatoria. Questi autori pensano, infatti, che dai tessuti traumatizzati per l'atto operatorio si liberino delle sostanze tossiche, che vengono neutralizzate dal cloro

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica biologica della R. Università di Roma.

(2) Pervenuta all'Accademia l'11 luglio 1938.

(3) DUVAL, « Soc. Nat. de Chir. », 1933, p. 975.

(4) LEGUEU, PALAZZOLI ecc., « Bull. Acc. Méd. », 1933, p. 879.

Mes
B
55
52

del sangue, d'onde l'ipocloremia che in genere si osserva dopo gli interventi.

Seguendo le conseguenze di questa ipotesi, noi fummo portati in un precedente lavoro ⁽¹⁾, a pensare, che, se l'ipotesi era giusta, iniettando direttamente un estratto di muscoli, o di fegato, o di reni, ecc., triturati, si sarebbe potuto osservare ipocloremia. In quel lavoro, noi abbiamo infatti iniettato in ratti adulti, estratto di muscoli della coscia, della gamba e della regione glutea del ratto, ed abbiamo ottenuto in effetti una ipocloremia in 7 ratti su 10. Nello stesso lavoro, abbiamo voluto tener presenti anche le ricerche di Quenu ⁽²⁾ e di Duval e Grigaut ⁽³⁾, secondo le quali, le sostanze che producono l'ipocloremia, sono di natura azotata, e che probabilmente almeno una frazione di esse concorre a formare l'azoto non proteico dei tessuti. Abbiamo quindi determinato, oltre che il cloro, anche l'azoto non proteico del sangue, prima e dopo l'iniezione, onde formarci un'idea su una possibile relazione tra ipocloremia e azoto non proteico del sangue, in seguito ad iniezione di estratto muscolare.

Proseguendo ora, nel piano di lavoro enunciato ed illustrato nella predetta nostra Nota, abbiamo iniettato estratto acquoso di fegato, di intestino e rene, seguendo nel complesso la stessa tecnica, che riassumiamo brevemente.

Ratti adulti, sani, di taglia media, venivano sacrificati per dissanguamento. Si apriva poi l'addome e si prelevava l'organo voluto, che posto su un vetrino da orologio, tarato in precedenza, veniva subito e rapidamente pesato. Si passava poi in mortaio di porcellana insieme ad un po' di silice, e si triturava finemente, fino ad ottenere una poltiglia uniforme. Si estraeva allora ripetutamente con acqua distillata e si filtrava per carta da filtro molto rapida. Per quanto riguarda l'intestino, dobbiamo dire, che prima di ogni altro trattamento, veniva svuotato e poi lavato con acqua distillata. Sul liquido così ottenuto da ciascun organo, di volta in volta si determinava l'azoto totale, l'azoto non proteico e l'azoto amminico. Per le prime due determinazioni abbiamo usato il metodo di Kieldahl, servendoci per la distillazione, dell'apparecchio di Wagner e Parnas. Per la determinazione dell'azoto amminico, abbiamo usato l'apparecchio di Van Slyke.

I liquidi ottenuti come sopra, vennero iniettati nella regione glutea in ratti adulti di grossa taglia, tenuti ad alimentazione mista per tutta la durata delle esperienze. Su ogni ratto abbiamo determinato per tre giorni consecutivi sia l'azoto non proteico che il cloro del sangue, in modo da avere un sicuro dato medio normale. Al 3° giorno, eseguito il prelevamento

(1) A. SALVATORI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », XXV, 1937, p. 404.

(2) E. QUENU, « Soc. Nat. de Chir. », 5 dicembre 1917 e 26 marzo 1919.

(3) DUVAL e GRIGAUT, « Soc. Nat. de Chir. », 16 ottobre 1918, p. 1506; *Id.*, *id.*, 26 marzo 1919, p. 565; « Compt. Rend. Acc. Sc. », CLXXVI, 1918, p. 562.

del sangue per i valori normali, abbiamo iniettato in corrispondenza della regione glutea 4 oppure 8 cc. di estratto acquoso di organo, preparato di fresco con la tecnica sopra descritta. L'animale è stato poi seguito per altri tre giorni, determinando nel sangue, ancora l'azoto non proteico e il cloro.

Il sangue per tutte le determinazioni venne prelevato dalla vena caudale e in parte fatto assorbire, in parte raccolto da una listarella di carta da filtro, piegata a doccia, preventivamente bagnata con ossalato di potassio e asciugata a temperatura ambiente. La listarella stessa veniva poi sistemata in pesafiltri e pesata. Poichè in precedenza si era tarato sia il pesafiltri che la listarella, per differenza si otteneva così la quantità di sangue prelevato.

Dopo ciò, per la determinazione del cloro, si travasava quantitativamente in un becher da cc. 50 e si aggiungevano cc. 2 di permanganato saturo, cc. 2 di acido nitrico concentrato, qualche goccia di allume ferrico, e nitrato di argento N/100 in eccesso (in genere cc. 6-9 risultavano sufficienti). Si riscaldava a modico calore fino a completa decolorazione, e dopo raffreddamento, si titolava con solfocianato N/100.

Per la determinazione dell'azoto, al sangue contenuto nel pesafiltro si aggiungevano cc. 2 di acqua distillata e si agitava ripetutamente in modo da emolizzare il sangue e da ridurre la listarella di carta da filtro in finissima poltiglia. Dopo ciò si aggiungevano cc. 4 di acido tricloroacetico al 20%, si agitava accuratamente e si lasciava in riposo per tre o quattro ore, agitando di tanto in tanto. Passato tale periodo di tempo, si filtrava per carta da filtro e si riceveva il filtrato in un palloncino da microkjeldahl, nel quale già si trovavano cc. 1 1/2 di acido solforico concentrato e cc. 0.5 di solfato di rame al 5%. Si procedeva poi alla Kjeldahlizzazione con le usuali norme. La soluzione solforica così ottenuta veniva passata quantitativamente nell'apparecchio di distillazione di Parnas e Wagner, e l'ammoniaca si raccoglieva su acido solforico N/100 in eccesso. Questo veniva poi titolato con idrato sodico N/100.

Come nel citato nostro lavoro, anche in questo abbiamo determinato il fattore di correzione dovuto ai reattivi. Detto fattore ha oscillato tra mg. 0.065 e mg. 0.072 di azoto, con un valore medio ricavato da cinque determinazioni di mg. 0.068. Da tutti i valori delle nostre determinazioni nel sangue abbiamo quindi detratto quest'ultima cifra.

La quantità di sangue prelevata, è stata maggiore in queste esperienze che non in quelle con estratto di muscoli. Infatti, mentre in quelle abbiamo prelevato da mg. 30 a 60 di sangue, in queste ne abbiamo prelevato da mg. 150 a 300. Nel predetto nostro lavoro, l'azoto non proteico normale ha oscillato intorno ai mg. 100-120 per g. 100 di sangue, e noi, allora, mettemmo in evidenza, che questi valori erano certamente un po' alti, e attribuiamo ciò alla esiguità del sangue prelevato, esiguità che faceva fortemente sentire il suo effetto nel riportare i valori a 100.

Segue TABELLA.

N. progressivo	Organo di cui si è iniettato l'estratto	Azoto iniettato mg.			Cloro ‰		Azoto non proteico mg. per 100 g. di sangue	
		Totale	Non proteico	Amminico	Prima della iniezione	Dopo l'iniezione	Prima della iniezione	Dopo l'iniezione
11	Fegato	15.3	3.84	1.00	5.04	5.11 5.42 5.12	57	50 85 110
12	"	15.3	3.84	1.00	5.14	4.99 5.00 5.14	47	40 70 130
13	Rene	3.92	0.94	0.41	4.70	4.9 4.5 4.7	53	54 87 85
14	"	3.92	0.94	0.41	5.33	5.21 4.97 4.77	71	50 95 94
15	"	4.48	0.82	0.33	4.37	4.97 4.26 5.30	54	59 55 81
16	"	4.48	0.82	0.33	4.76	4.73 4.78 4.75	66	70 50 85
17	"	3.60	1.52	0.56	4.33	3.50 4.80 4.60	74	78 100 110
18	"	3.60	1.52	0.56	4.65	3.28 4.77 4.73	60	100 89 110
19	"	7.44	2.24	0.75	5.06	4.97 5.04 5.04	51	46 70 100
20	"	7.44	2.24	0.75	4.90	5.30 4.90 5.24	42	55 81 110

Segue TABELLA.

N. progressivo	Organo di cui si è iniettato l'estratto	Azoto iniettato mg.			Cloro o/100		Azoto non proteico mg. per 100 g. di sangue		
		Totale	Non proteico	Amminico	Prima della iniezione	Dopo l'iniezione	Prima della iniezione	Dopo l'iniezione	
21	Intestino	3.52	1.38	0.71	4.92	4.84	70	75	
						4.66			90
						4.77			78
22	»	3.52	1.38	0.71	4.87	4.89	64	79	
						4.28			78
						4.82			78
23	»	3.20	1.74	0.80	4.94	4.98	57	39	
						5.06			110
						5.05			130
24	»	3.20	1.74	0.80	4.79	5.70	70	75	
						4.94			75
						5.05			130
25	»	3.20	1.74	0.80	5.02	5.26	59	65	
						5.26			99
						5.28			110
26	»	3.20	1.74	0.80	4.79	5.03	65	60	
						4.98			65
						5.00			80
27	»	10.40	4.25	1.80	4.87	5.75	52	93	
						5.18			107
						4.55			110
28	»	10.40	4.25	1.80	4.88	4.88	46	77	
						5.07			77
						4.94			110
29	»	10.47	4.25	1.80	4.96	4.11	43	100	
						4.81			84
						Obitus			

Che in realtà così fosse, viene dimostrato chiaramente dalle presenti esperienze, nelle quali la tecnica essendo rimasta assolutamente identica, differenza essendosi avuta soltanto nella maggiore quantità di sangue prelevato, abbiamo ottenuto dei valori normali oscillanti da mg. 35 a 70 per g. 100 di sangue, cioè dei valori che sono sensibilmente gli stessi che si ottengono con qualche grammo di sangue, e che vengono comunemente dati dagli autori come normali pel sangue di ratto.

Abbiamo sperimentato in complesso su 29 ratti, iniettando cc. 4 o 8 di estratto di organo, contenenti quantità di azoto oscillanti da mg. 3.20 a mg. 16.00.

Diamo nella tabella precedente i risultati ottenuti. I dati dell'azoto non proteico e del cloro nel sangue, prima dell'iniezione, sono la media delle tre determinazioni fatte nei tre giorni precedenti l'iniezione. I singoli dati invece, ottenuti dopo l'iniezione, sono riportati in ordine di tempo.

Il cloro è espresso in grammi di NaCl per mille di sangue; l'azoto non proteico invece è espresso in mg. per 100 g. di sangue.

Osservando i dati riportati nella tabella, si nota subito, che i tre estratti iniettati hanno avuto sull'animale un effetto diverso. Infatti, con l'estratto di fegato, su 12 ratti si sono avuti 7 casi di ipocloremia, 3 di ipercloremia e 2 casi che noi chiameremo misti (ratti nn. 8 e 9), perchè nel primo giorno dopo l'iniezione si è osservata ipercloremia, nel 2° giorno ipocloremia e nel 3° ancora ipercloremia.

Con l'estratto di rene su 8 ratti, si sono avuti 2 casi di ipocloremia, 1 di ipercloremia, un caso in cui non si è osservata alcuna variazione della cloremia in seguito all'iniezione (n. 16) e 4 casi misti secondo la definizione data sopra.

Con l'estratto di intestino su 8 ratti (escludiamo il n. 29, perchè morto al 3° giorno dopo l'iniezione) si sono avuti 2 casi di ipocloremia, 4 di ipercloremia e 2 misti.

Nel complesso possiamo quindi dire, che l'estratto di fegato ha avuto un notevole effetto ipocloremico, meno gli estratti di rene e di intestino; anzi con quest'ultimo si è avuto, nel 50% dei ratti posti in esperienza, un effetto opposto, cioè ipercloremico.

Per quanto riguarda i rapporti tra quantità di azoto iniettato e entità dell'ipocloremia osservata, nessuna relazione è risultata tra esse. Infatti, con mg. 16 di azoto i ratti 1 e 2 hanno avuto una marcatissima ipocloremia, mentre i ratti 11 e 12 con quasi la stessa quantità di azoto, e cioè con mg. 15.3 hanno avuto l'uno ipercloremia e l'altro una lievissima ipocloremia al primo giorno dopo l'iniezione, subito compensata nei due giorni seguenti l'iniezione. E ancora: il ratto n. 3 ha ricevuto mg. 8 di azoto, ed ha presentato una ipocloremia egualmente notevole che quella del ratto n. 1, per esempio, che ha ricevuto doppia quantità di azoto.

Esempi analoghi possono riscontrarsi nei ratti, nei quali si è iniettato estratto di rene o di intestino.

Tutto ciò che abbiamo ora detto per l'azoto totale, possiamo estenderlo sia all'azoto non proteico che all'azoto amminico, poichè in genere questi seguono proporzionalmente, nei vari estratti, l'azoto totale.

Si deve dunque pensare, a nostro parere, ad una differenza non quantitativa, ma qualitativa.

Alla stessa conclusione portano i confronti tra azoto non proteico dosato nel sangue dopo l'iniezione, e le variazioni di cloro osservate. Anche qui nessuna corrispondenza tra i valori dell'azoto non proteico e quelli del cloro. In genere, si è notato, che gli estratti di fegato, intestino e rene hanno prodotto un aumento dell'azoto non proteico del sangue, ma quest'aumento non ha condizionato in alcun modo però, nè l'entità, nè il senso delle variazioni di cloro osservate.

Ciò ci conferma in una nostra idea, espressa nel nostro citato lavoro, e cioè, che ipocloremia e aumento di azoto non proteico, e quindi, naturalmente, iperazotemia, sono manifestazioni concomitanti e non necessariamente dipendenti.

In tutte le nostre esperienze, gli animali sono sopravvissuti all'iniezione anche per mesi; soltanto il ratto n. 29 è morto al terzo giorno dopo l'iniezione.

Tutti gli animali hanno mostrato di sopportare bene l'iniezione, e infatti, dopo di essa, hanno continuato ad alimentarsi, ad emettere feci e urine, normali per quantità e qualità. Solo nel primo giorno dopo l'iniezione, si mostravano un po' torpidi, con tendenza ad isolarsi e rimanere immobili per lunghe ore agli angoli della gabbia. Ma già al 2° giorno erano tornati vivaci, e al 3° giorno completamente normali nel loro comportamento esteriore.

Riassumendo, e tenendo presenti in questa Nota anche i risultati riferiti nel lavoro più volte citato, sull'iniezione di estratto muscolare, sempre nel ratto, possiamo dire, che in generale gli estratti acquosi di muscoli e di altri organi quali il fegato, il rene e l'intestino, si sono mostrati capaci di provocare una ipocloremia più o meno marcata.

L'ipotesi quindi, che nei muscoli e in vari organi, come per es. rene, fegato, intestino ecc., siano presenti sostanze, che, direttamente o indirettamente possano provocare una ipocloremia più o meno marcata, acquista a nostro parere, un più solido fondamento dai risultati da noi ora esposti.

Quale la natura di questa o di queste sostanze? Gli autori francesi, chirurghi per la maggior parte, propendono per sostanze di natura azotata, e più specificamente di natura azotata non proteica, riferendosi in particolar modo alle sostanze azotate non proteiche, che normalmente sono contenute nel sangue, e cioè, urea, acido urico, amminoacidi, creatina, creatinina, ecc.

I risultati da noi ottenuti riguardo ai rapporti tra ipocloremia e quantità di azoto non proteico iniettato, e i rapporti tra ipocloremia e azoto non

proteico trovato nel sangue dopo l'iniezione di estratti muscolari e di organi, non confortano questa ipotesi.

Ma a questo riguardo ci proponiamo di portare un contributo più diretto con una serie di esperienze, che abbiamo in corso, sulle variazioni della cloremia in seguito all'iniezione di urea, acido urico, creatina, creatinina, ecc., vale a dire dei componenti la frazione azotata non proteica del sangue normale. Per ora, a conclusione del presente lavoro, ci contenteremo di poter affermare:

1° che l'estratto acquoso di fegato iniettato nella regione glutea del ratto, ha avuto un notevole effetto ipocloremico; meno gli estratti di rene e di intestino: con quest'ultimo anzi, si è avuto nel 50 % dei ratti posti in esperienza, un effetto opposto, cioè ipercloremico;

2° che in quasi tutti i ratti studiati si è osservato un aumento dell'azoto non proteico del sangue, dopo l'iniezione degli estratti di organi sopra detti;

3° che nessun rapporto quantitativo è risultato tra l'entità dell'ipocloremia e dell'ipercloremia osservate, e la quantità di azoto sia totale che non proteico iniettata. Egualmente nessun rapporto è stato notato tra entità della stessa ipocloremia o ipercloremia e aumento dell'azoto non proteico del sangue dopo l'iniezione;

4° che l'ipotesi di Chabannier e Lobo-Onnel sulla possibilità che l'ipocloremia post-operatoria possa essere prodotta da sostanze azotate tossiche, liberatesi a livello dei tessuti traumatizzati per l'atto operatorio, trova riscontro e appoggio nei risultati sperimentali da noi ottenuti; dimodochè ci sembra utile perseguirla in tutte le sue conseguenze, come sopra abbiamo annunciato.

~~327225~~



