

Mbx B73/9

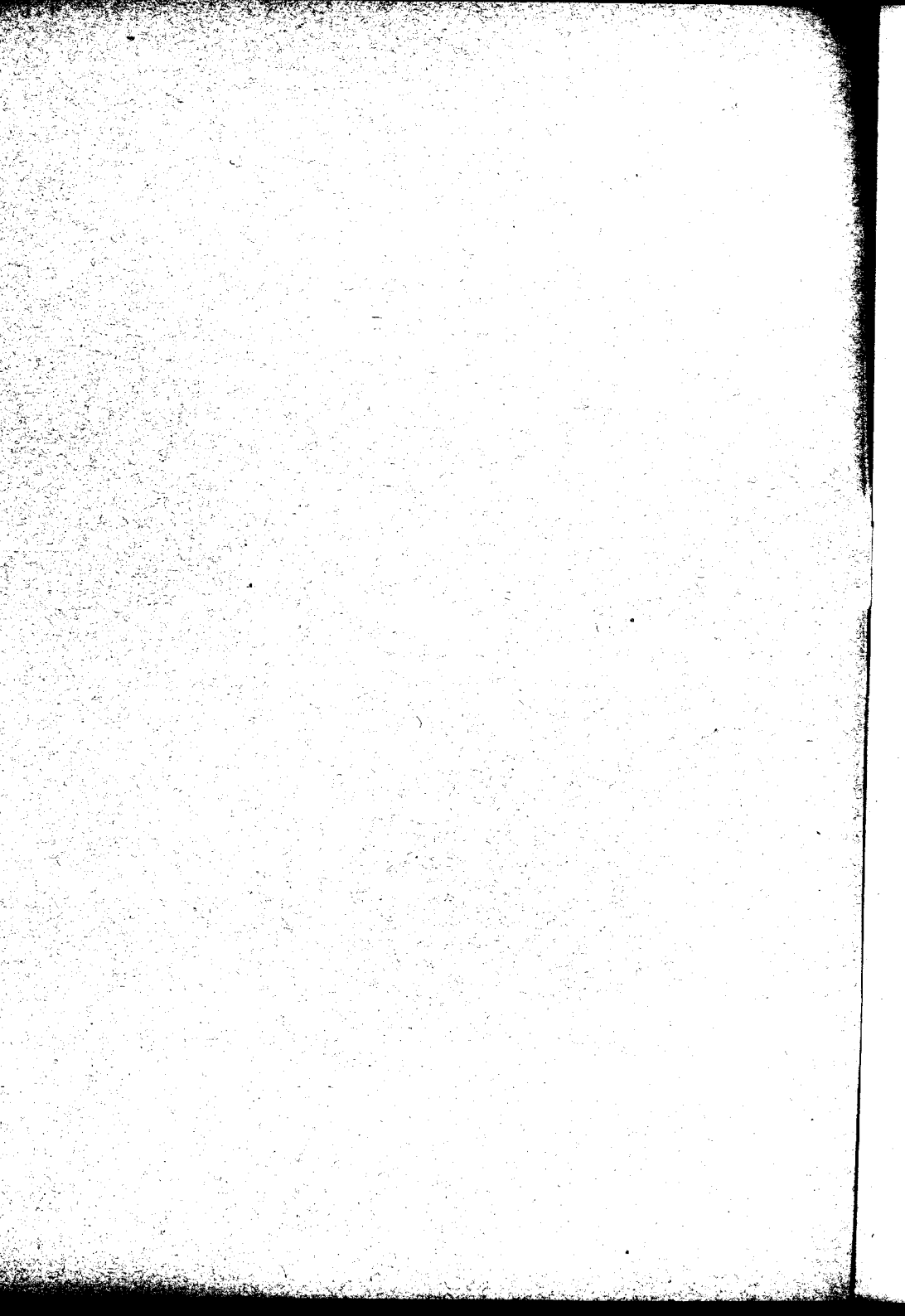
Dott. A. de NIEDERHÄUSERN

LA PREPARAZIONE DEL PLASMA ETE-  
ROLOGO SECCO ED IL SUO IMPIEGO  
IN LUOGO DELLA TRASFUSIONE DI  
SANGUE.

Estratto dal BOLLETTINO E ATTI  
DELLA R. ACCADEMIA MEDICA DI ROMA  
Anno LXVII (1941-XIX) - Fasc. VII



DITTA TIPOGRAFIA CUGGIANI  
ROMA - VIA DELLA PACE, 35  
1941-XIX

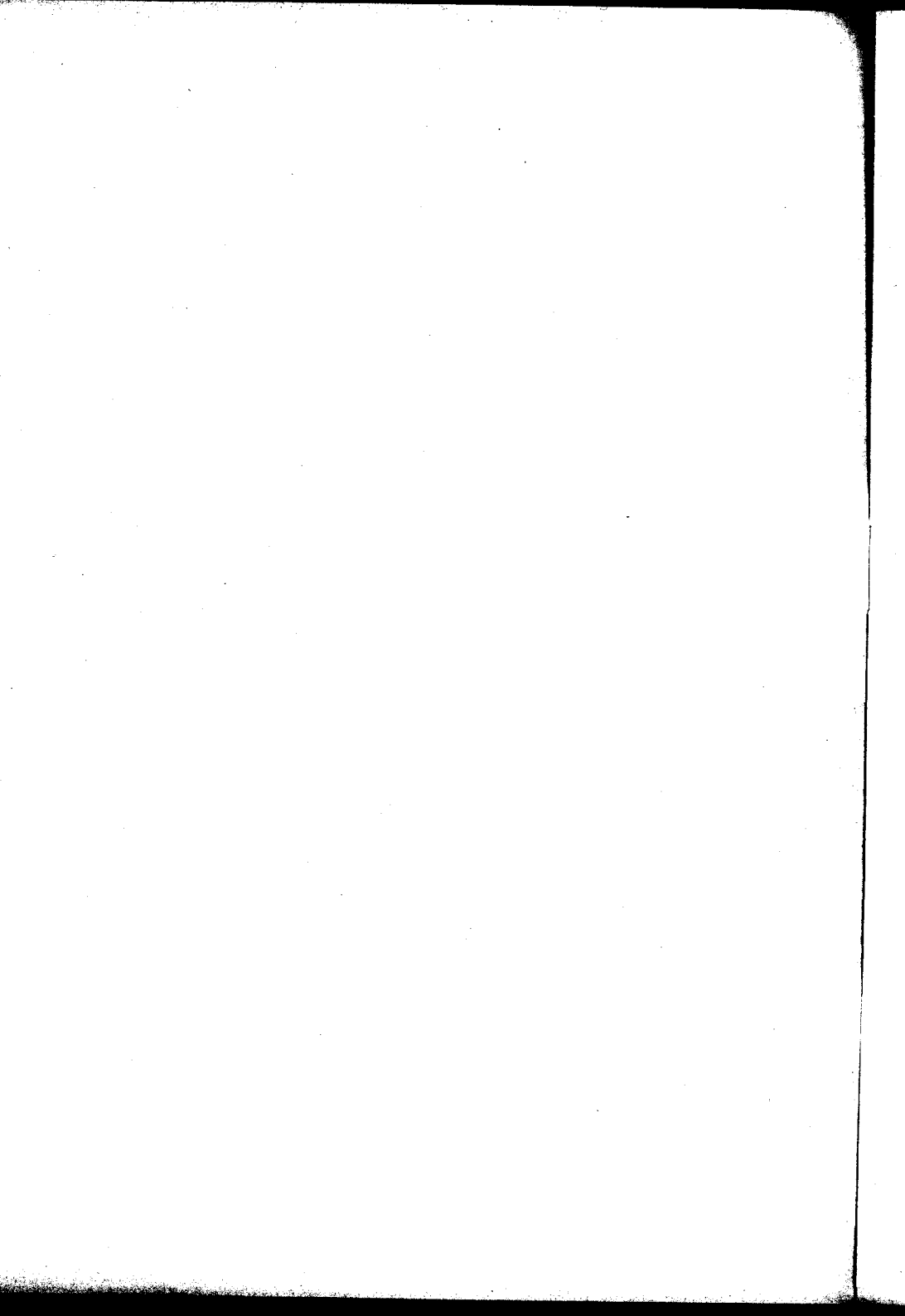


DIREZIONE GENERALE DI SANITÀ MILITARE — LABORATORIO DI PATOLOGIA FISIO-PATOLOGICA  
Direttore: TEN. COL. MED. PROF. DOTT. U. CASSINIS

DOTT. A. DE NIEDERHÄUSERN  
CAPITANO MEDICO

La preparazione del plasma eterologo secco ed il suo  
impiego in luogo della trasfusione di sangue.

*Comunicazione alla Seduta del 26 luglio 1941-XIX  
della Reale Accademia Medica di Roma*



Non è facile poter stabilire sperimentalmente, in modo evidente, che una perdita acuta di sangue, per un volume non molto discosto dal limite di tolleranza medio, sarebbe riuscito letale se non avessimo ricorso ad un liquido quale mezzo di sostituzione della quantità sottratta. È certo che le osservazioni cliniche e le ricerche di laboratorio hanno suffragato l'esperienza dell'utilità di sostituire il sangue perduto con un mezzo sufficiente a mantenere in vita l'organismo, risollemandone le condizioni del circolo e del respiro.

La trasfusione di sangue fresco ed omologo rappresenta sempre il miglior mezzo di sostituzione. Poichè questo non è adoperabile in ogni circostanza (sul campo di guerra, negli infortuni collettivi, nei casi di particolare urgenza, nelle grandi attività chirurgiche), non essendo possibile avere a portata di mano ed in tempo utile una corrispondente quantità di sangue fresco, data poi la limitata durata del sangue conservato, è spiegabile che in numerose nazioni (Germania, Svizzera, Inghilterra, Stati Uniti, Francia, Giappone, Russia) si siano ricercati i più opportuni mezzi di sostituzione.

Ecco che hanno ripreso voga ricerche sugli antichi liquidi o soluzioni, ccsi dette, fisiologiche, tanto più che mano a mano si è andato affermando il concetto che il liquido sostitutivo del sangue non tanto ha importanza, per la maggiore o minore attiva partecipazione alla funzione respiratoria emoglobinica, quanto per il suo valore emodinamico considerato nel complesso: volume, densità, viscosità, pressione osmotica e colloidosmotica, persistenza in circolo, reazione attuale e potenziale.

SCHÖRCHER (« Zentr. f. Chirurg. », 67, 959, 1940) afferma anzi che la funzione del mezzo sostitutivo è il riempimento del circolo. « Cuore e vasi devono essere forniti di un liquido capace di mantenere una sufficiente pressione circolatoria. La causa della morte non è dipendente dalla diminuzione del numero degli eritrociti, bensì dalla caduta della pressione, con che ne soffre più di ogni altro il sensibile territorio del midollo ».

Dalle sue ricerche viene concluso che è sufficiente un quantitativo del 15 % della massa primitiva di sangue per mantenere in vita l'animale allorchè si provveda opportunamente alla sostituzione del volume idrico

mancante. Il mezzo migliore, dopo il sangue, è rappresentato dal siero o dal plasma in confronto della soluzione di Ringer, Tutofusin, o soluzione di glucosio.

LENGGENHAGER (« Zentr. f. Chirur. », 67, 1961, 1940) appoggiandosi alle ricerche di SCHÖRCHER ha confermato che soluzioni di cristalloidi: cloruro di sodio, glucosio, Ringer, Tjrode inoltre Tutofusin, Holofusin, Normosal, dopo due ore hanno abbandonato le vie circolatorie nella proporzione dell'80-90 %.

Anche le soluzioni gommose hanno l'inconveniente di determinare facilmente uno shock e di agglutinare gli eritrociti.

Però il sangue conservato, che sembrerebbe dunque di necessità il mezzo di più largo impiego, non è privo di inconvenienti. L'A. riferisce che la sua conservabilità è limitata (2-3 settimane, con sangue conservato col metodo citrato-glucosio; 6 settimane, col metodo al tiosolfato secondo CORELLI); che deve essere conservato a bassa temperatura (2-4° C.); che deve essere mantenuto in perfetta sterilità (ammesso che il donatore avesse al momento del prelievamento un sangue sterile); che durante il trasporto non sia soggetto ad eccessivo scuotimento.

Il voto che era stato espresso da SCHÖRCHER: che si riuscisse a preparare un siero secco, facilmente solubile, e ben conservabile, è esaudito dalle ricerche di LENGGENHAGER.

BIOSTEAU e ERIKSSON-QUENSEL (ref. « Chem. Zbl. », II, 2549, 1936) avevano dimostrato che l'aggiunta di cristalloidi alle proteine impedisce la loro denaturazione durante l'essiccamento. Riprendendo tali risultati, LENGGENHAGER è riuscito a preparare siero secco, facilmente solubile in acqua, da sangue di uomo, di bue, maiale e cavallo.

Il metodo di preparazione è un brevetto della casa Ciba e l'A. riferisce solamente che prima dell'essiccamento aggiungeva per il siero umano il 7,7% di glucosio e per quello di animale il 10%. Il primo, allo stato secco, era solubile in uno e mezzo volumi di acqua, il secondo in 1,5-2 volumi e così era possibile riscaldarlo anche ad ebollizione senza determinare alcun intorbidamento. Anzi, secondo l'A., l'ebollizione stessa ha la proprietà di annullare il potere anafilattogeno del siero.

Il problema appariva a questo punto quando anche noi ci siamo proposti:

a) elaborare un metodo di preparazione del siero o del plasma secco, da sangue di grossi animali da macello, facilmente solubile e conservabile a lungo;

b) provarne sperimentalmente l'utilità d'impiego, o meno, in luogo della trasfusione di soluzioni saline fisiologiche o di sangue conservato.

### PREPARAZIONE DEL PLASMA SECCO

In un primo tempo abbiamo seguito per la preparazione di siero essiccato la tecnica proposta da SCHÖRCHER (opera citata). In recipiente di vetro sterile si prelevava sangue di bue che si lasciava coagulare in termostato a 37° per 24 h.. Dopo spremitura del siero questo veniva decantato in tubi da centrifuga sterili, e lo si centrifugava per 30' a circa 3.000 giri. Il siero si suddivideva in tubi da centrifuga nella quantità di 5 cc. per tubo ed era quindi precipitato con 20 cc. di alcool a 95. Il precipitato, dopo centrifugazione, era per 3 volte lavato con 10 cc. di alcool. Quindi la stessa operazione era ripetuta per due volte con etere. Ogni volta il liquido di lavaggio veniva allontanato per aspirazione. Il precipitato residuo dei lavaggi veniva prima liberato dall'etere con evaporazione b.m. a 37° e poi essiccato in essiccatore a vuoto su cloruro di calcio.

La polvere essiccata, finissimamente suddivisa e di colore bianco, dimostrava una scarsa solubilità in acqua distillata, soluzione fisiologica e glucosio al 10 per mille; anche se tenuta in presenza dei solventi, in termostato a 37°, per 24 h..

Gli stessi risultati si ottenevano anche lavorando su plasma ricavato da sangue aggiunto di ossalato di sodio.

Trattando il siero o il plasma con solo alcool, non si ottennero risultati più soddisfacenti.

In considerazione dell'esito negativo ottenuto usando mezzi di preparazione chimici, ci rivolgemmo a mezzi fisici, utilizzando anche alcune delle indicazioni fornite da LENGGENHAGER nell'opera citata.

Rimaneva sempre però da risolvere per noi il problema primo per l'essiccamento del siero o del plasma, dato che LENGGENHAGER stesso non precisava con quale tecnica raggiungesse tale risultato.

Però una accurata e paziente ricerca bibliografica ci ha portato a ritrovare notizie di un metodo, pure brevettato, ottenuto da SHARPE e DOHNE di Philadelphia (« Chem. Zentr. », 12, 1981, 1937) mediante forte congelamento del siero e successiva distillazione nel vuoto dell'acqua liberatasi dalla massa congelata.

In tal modo, dalla riunione di molteplici elementi tecnici, e dopo ripetuti tentativi, siamo pervenuti al metodo di preparazione del plasma secco, in quantità notevoli e tali da permetterci esperimenti su cani anche di grossa taglia.

Abbiamo preferito essiccare plasma, anzichè siero, perchè si potrebbe ritenere che la presenza di una quantità notevole di fibrinogeno, anche se

denaturato, dovesse essere un elemento vantaggioso per l'apporto di sostanze proteiche e forse un elemento favorevole alla emostasi spontanea.

Ci siamo serviti di sangue di bue, perchè più facile risulta la raccolta di tale materiale da trattare.

Il sangue raccolto direttamente in matracci sterili, contenenti ossalato di sodio anidro in proporzione del 0,20 %, veniva centrifugato a 3-4.000 giri per 30', in modo da separarne il plasma. Questo era allontanato per aspirazione, riunendo mano a mano tutto quello che veniva dato dalle centrifugazioni.

Al plasma riunito si aggiungeva glucosio nella proporzione del 10 % in volume. Tentativi di diminuire la quantità di glucosio non hanno dato buoni risultati, in relazione al riscaldamento cui il plasma unito poi secco col solvente doveva venire sottoposto prima dell'impiego sperimentale.

Quando il glucosio era perfettamente disciolto il plasma si poneva a gelare; quindi veniva collegato con un apparato di distillazione particolarmente studiato.

Quando il plasma glucosato aveva raggiunto un volume corrispondente a un quarto del primitivo volume od anche meno, si sospendeva la distillazione ed il residuo veniva trasferito in essiccatore da vuoto contenente cloruro di calcio ed anidride fosforica.

Rinnovando ripetutamente l'anidride fosforica idratatasi, si portava il plasma a completa secchezza.

Il plasma secco così ottenuto è conservabile indefinitamente, specie quando sia chiuso in recipiente sterile e fuori del contatto dell'aria.

Esso è solubile completamente in acqua distillata corrispondente al volume iniziale del plasma naturale. La quantità di plasma glucosato secco corrisponde in peso a circa il 15-20 % del volume iniziale.

Il plasma secco ridisciolto in volume di acqua distillata corrispondente al volume iniziale del plasma naturale non può essere riscaldato oltre 70-80° perchè a tale temperatura esso gelifica in blocco. Per permettere al plasma ridisciolto di essere riscaldato oltre tale temperatura, sino a giungere alla ebollizione, è necessario diluire ulteriormente il plasma 1:3.

Il plasma glucosato secco ridisciolto, ha trasparenza e colore analoghi al plasma naturale. Alla diluizione di 1:2,5 quando venga riscaldato sopra 95° il colore diviene lievissimamente più scuro, forse per caramella del glucosio, senza però che sia compromessa la sua trasparenza e la sua caratteristica opalescenza.

In alcuni esperimenti ci siamo proposti di ottenere plasma secco anche privato di sostanze lipoidi e lipidi. A tale fine subito dopo la separazione del plasma dal sangue questo è stato sottoposto ad estrazioni ripetute con

etere etilico sino al completo allontanamento delle sostanze estraibili. Per quanto la preparazione di tale plasma sgrassato sia riuscita tecnicamente soddisfacente, non si è creduto opportuno provarlo sperimentalmente perchè i buoni risultati ottenuti col plasma integro hanno rese superflue ulteriori ricerche.

#### PROVE SPERIMENTALI NEGLI ANIMALI

In possesso del mezzo che volevamo ottenere abbiamo cercato di dimostrarne l'utilità d'impiego nella emorragia acuta. Le ricerche di SCHÖRCHER e quelle di LENGGENHAGER già avevano messo in evidenza alcuni dei lati più appariscenti degli elementi d'indagine. Però nessuno dei due autori aveva cercato di convalidare con prove funzionali quali fossero le condizioni emodinamiche dell'animale da esperimento dopo la infusione del plasma.

Così abbiamo seguito in dieci cani di taglia media, dopo emorragia di volumi di sangue del 30-40 % (quantità questa al limite medio della sopportabilità) l'effetto di infusione endovenosa di corrispondenti volumi di plasma secco ridisciolti. Le caratteristiche funzionali seguite sono state: sfigmogramma, curva respiratoria addominale, elettrocardiogramma, massa totale del plasma e del sangue, tasso emoglobinico, numero degli eritrociti, glicemia.

1° — Sfigmogramma: raccolto con bracciale posto alla radice della coscia. Le oscillazioni sfingiche, trasmesse a capsula oscillografica, sono registrate con chimografo elettrico. Un apparecchio sfigmomanometro di RIVA ROCCI od un oscilometro di PACHON, intercalato nel sistema serve alla taratura della curva.

Le pressioni massima, media e minima cadono dopo il salasso, si risolleivano parzialmente subito dopo l'infusione del plasma ridisciolti, mentre dopo qualche ora raggiungono i valori normali. È notevole che l'indice oscilometrico già ridotto per il salasso a 1-2 segni del Pachon, si risolleiva alquanto dopo l'infusione.

2° — Curva del respiro: raccolta con piccola camera d'aria e registrata fotograficamente per mezzo di capsula oscillografica su chimografo elettrico.

La curva non dimostra nulla di caratteristico dopo l'emorragia se si eccettua un relativo aumento di frequenza che cede di poco dopo l'infusione endovenosa del plasma secco ridisciolti.

Tale assenza di manifeste reazioni respiratorie è legata forse allo stato di profonda narcosi in cui trovasi l'animale (cloralosio).

3° — Elettrocardiogramma: nelle tre derivazioni classiche. Dimostra già dopo la sola narcosi delle profonde alterazioni consistenti prevalentemente in uncinature del complesso rapido ventricolare ed in difasismo-inversione della T. Tale inversione si accentua fortemente dopo emorragia in cui la T assume l'aspetto coronarico. L'infusione di plasma secco ridisciolto modifica di poco il reperto che scompare rapidamente col cessare dello stato di narcosi da cloralosio (poche ore) che per contro è più tardivo nella scomparsa per gli altri narcotici (evipan, dial), tendendo a persistere anche per settimane.

4° — Massa totale del plasma e del sangue determinato col metodo del rosso congo.

Dopo l'infusione di plasma secco ridisciolto la massa idrica iniettata permane nel circolo sino alla 12<sup>a</sup> ora. Si inizia a quel punto l'allontanamento di essa dal circolo, però non si può affermare con sicurezza, e col metodo impiegato, quando è che tale allontanamento sia completato: perchè gli spontanei fenomeni di richiamo di liquido interstiziale dai tessuti nel torrente circolatorio, che sogliono avvenire spontaneamente, possono compensare variamente la eventuale diminuzione dell'acqua del plasma iniettato.

5° — Valori ematologici: l'emoglobina fu determinata coll'emoglobiometro di SHALI ed espressa i grammi per cento. Già alla 12 h. dopo l'infusione del plasma il quantitativo tendeva a risalire confermando i dati della massa plasmatica. I valori poco più elevati si stabilizzavano intorno alle 24-48 ore dopo l'infusione.

I globuli rossi seguivano approssimativamente il comportamento dell'emoglobina. Essi vennero determinati colla camera contaglobuli di BÜRCHER.

La glicemia presentava qualche interesse per vedere quale sorte subisse dopo la somministrazione di notevole quantità di glucosio endovena. Essa non è mai salita oltre i 2,50 per mille subito dopo l'infusione per scendere poco più tardi ed alla 12<sup>a</sup> h. aver quasi raggiunto il valore che preesisteva alla infusione. Non v'è dubbio che il glucosio iniettato espliciti una benefica azione particolarmente sul cuore, in virtù del suo potere dinamogeno.

Tutte le considerazioni ora esposte sono state vagliate coll'aiuto dei risultati avuti da prove di salasso non seguite dalla infusione di plasma secco ridisciolto, ovvero seguite da somministrazione endovena di soluzioni saline fisiologiche.

Le iniezioni di plasma secco ridisciolti praticate negli animali per via endomuscolare ed endovenosa non hanno scatenato manifestazioni di shock proteico precoce e tardivo.

Ciò è dovuto verosimilmente alle denaturazioni dei proteidi coll'aggiunta di glucosio ed alla ebollizione del plasma secco ridisciolti prima della somministrazione.

È singolare la perdita del potere antiogeno anafilattogeno che il plasma eterologo subisce per effetto di tale trattamento.

Anche le prove sull'uomo possono confermare tali ottimi risultati.

Le conclusioni che possono essere tratte nella presente nota preventiva mettono in chiaro alcuni punti fondamentali del problema impostoci.

1. — Colla tecnica da noi seguita ci è stato possibile preparare un plasma secco di sangue di bue facilmente e completamente e stabilmente solubile in acqua distillata (liofilo).

2. — Il plasma secco ridisciolti in volume corrispondente a 2,5 volte quello iniziale è riscaldabile sino ad ebollizione prolungata senza che in esso compaia intorbidamento o gelificazione veruna.

3. — Il plasma secco è perfettamente conservabile a lungo pure se esposto all'aria. Anche quello secco, ridisciolti, purchè sterile, è conservabilissimo per mesi.

4. — Il potere anafilattogeno del plasma secco e ridisciolti è eliminato dalla ebollizione prolungata per pochi minuti.

5. — Il suo impiego trova giustificato motivo di applicazione nell'emorragia acuta, quale mezzo di sostituzione della trasfusione di soluzioni saline fisiologiche di sangue o in tutti quei casi in cui questa non è possibile; per le seguenti ragioni:

a) è bene sopportato;

b) risolve la funzione circolatoria sino ai valori normali, anche quando venga impiegato per sostituire il 40-50% della massa totale del sangue;

c) rimane in circolo abbastanza a lungo. Dopo 24 h. ancora ne è possibile metterne in evidenza il 60-80 %;

d) alcune caratteristiche fisico-chimiche (densità, viscosità, abbassamento del punto di congelamento) lo indicano vicino al siero di sangue umano;

e) il glucosio aggiunto, non altera sensibilmente la glicemia anche se l'iniezione endovena sia in proporzione del 40 % della massa totale del sangue;

f) il fibrinogeno in esso presente può favorire gli spontanei processi di coagulazione.

RIASSUNTO. — L'Autore espone un suo metodo per la preparazione di plasma secco, facilmente solubile in acqua distillata, ricavato da sangue di bovino. Riferisce sui risultati sperimentali ottenuti nel cane, impiegando il plasma secco ridisciolti come mezzo di sostituzione della massa sanguigna, nell'emorragia acuta grave, in luogo della trasfusione di sangue.

Il plasma secco ridisciolti somministrato per via endomuscolare ed endovenosa non determina fenomeni di shock proteico immediati o di anafilassi.



345207



