

Man B7h

2

ISTITUTO «CARLO FORLANINI»
CLINICA FISIOLÓGICA DELL'UNIVERSITÀ DI ROMA
Direttore inc. : Prof. A. OMODEI-ZORINI

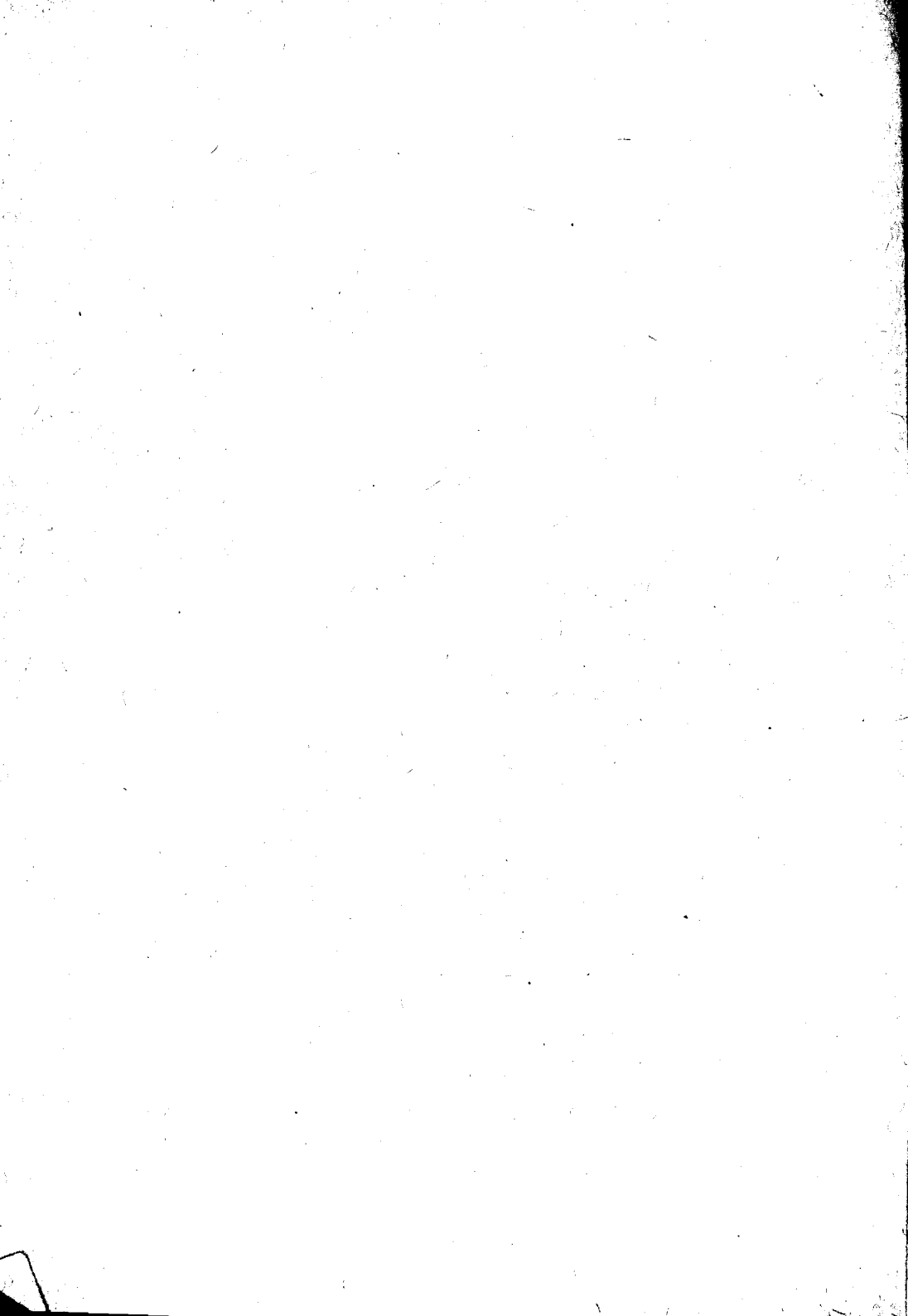
CARLO CATTANEO e BRUNO BASSANI

L'anidrafi carbonica nella tubercolosi polmonare umana

Estratto dagli *Annali dell'Istituto «Carlo Forlanini»* - Volume IX - Fasc. 1



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
1946

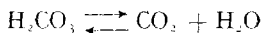


L'ANIDRASI CARBONICA
NELLA TUBERCOLOSI POLMONARE UMANA.

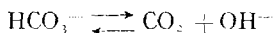
CARLO CATTANEO e BRUNO BASSANI.

Il problema dell'evoluzione e del trasporto del CO_2 negli organismi, nonostante gli studi numerosi dei quali è stato oggetto, offre ancor oggi argomento a ricerche originali e interessanti nel campo della fisiologia. Prescindendo da una esposizione particolareggiata della cinetica dell'acido carbonico in vivo e delle possibilità dell'esistenza di varie forme del CO_2 nel sangue ad equilibrio, ci limitiamo a trattare brevemente di questi argomenti solo per quanto essi hanno di attinenza col fermento, che abbiamo preso in istudio.

Con la dimostrazione della presenza nella parte corpuscolata del sangue di un catalizzatore della reazione di idratazione e di disidratazione del CO_2 secondo gli schemi :



oppure



che rende ragione della capacità del sangue di liberarsi prontamente del CO_2 nel suo percorso attraverso i polmoni, il problema della cinetica di questa reazione è stato posto sotto nuovi aspetti. Infatti in vitro, al pH dei liquidi organici, la reazione di idratazione e disidratazione dell'acido carbonico decorre molto lentamente sia in un senso che nell'altro ed è stato dimostrato che in un secondo essa è completa soltanto per il 16%. Nei polmoni invece, nel medesimo periodo di tempo, il sangue venoso si equilibra completamente con l'aria alveolare, la reazione quindi nei polmoni deve essere accelerata da un meccanismo attraverso il quale il tempo necessario per raggiungere tale equilibrio si riduce ad una frazione di secondo.

Le prime fondamentali esperienze, che misero in evidenza l'importanza dell'accelerazione di questa reazione, indispensabile per la vita degli organismi superiori, furono quelle di HENRIQUES (1), il quale riconobbe al sangue, e più precisamente all'emoglobina, la capacità di attivare in vitro tale reazione, senza però giungere alla conclusione della presenza di un'attività enzimatica specifica. Furono le successive ricerche di VAN SLYKE e HAWKINS (2) che portarono ad ammettere un effetto catalitico delle soluzioni di emoglobina, successivamente confermato da BRINKMAN e MARGARIA (3) e da DIRKEN e MOOK (4). Questi AA. osservarono che l'aggiunta di una soluzione di emoglobina dializzata, già nella concentrazione di 1/220.000, riduce alla metà il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella reazione di idratazione del CO_2 , e nella

concentrazione di 1/1000 lo riduce a circa 1/20. Risultati analoghi furono ottenuti nel processo di disidratazione. Successivamente MELDRUM e ROUGHTON (5) giunsero ad isolare dai globuli rossi l'enzima puro, che denominarono « anidraasi carbonica » (*) e di cui studiarono le caratteristiche fisiche e chimiche. È un enzima altamente specifico e le preparazioni pure non mostrano attività catalasica, perossidasica o ossidasica e l'analisi spettrometrica dimostra che non ha relazione con l'emoglobina o con composti ematinici. È un prodotto praticamente non dializzabile e termolabile. È relativamente stabile in un campo di pH compreso tra 4 e 12; in ambiente più acido o più alcalino perde rapidamente la propria attività. In vitro è inibito dai veleni enzimatici tipici quali il CO₂, l'H₂CN, i sali di CU, Ag, Au etc. e sarebbe secondo LEINER (6) attivato da siero, latte, peptone, estratto di polmone, di muscolo, di ipofisi, di fermenti di birra etc., risultati che però non sono stati confermati da KIESE (7).

Questo enzima è largamente diffuso, sebbene in quantità differenti, nei vari tessuti: si trova nei globuli rossi, ma non nel plasma; quantità apprezzabili sono contenute nel pancreas, fegato, ipofisi e milza, molto meno in estratti acquosi di muscolo. Manca nel latte, nella bile, nell'urina. Nell'uomo, in condizioni normali, ha valori abbastanza costanti sia nei giovani che negli adulti; è da rilevare che il sangue del cordone ombelicale del feto, sebbene contenga grandi quantità di eritrociti, contiene quantità relativamente piccole di anidraasi carbonica.

Da ciò risulta evidente l'importanza vitale dell'anidraasi carbonica nell'organismo: nella rete vascolare del polmone catalizza la reazione di disidratazione dell'H₂CO₃, permettendo la pronta liberazione del CO₂, nei tessuti catalizza soprattutto la reazione opposta di idratazione, accelerando il passaggio del CO₂ allo stato ionico. È poi interessante ricordare che l'andamento della catalisi enzimatica nel senso della idratazione nei tessuti e della disidratazione negli organi respiratori è influenzata da fattori vari, alcuni dei quali puramente fisici come la pressione del CO₂, il valore del pH etc., altri chimici quali la presenza di attivatori e di inibitori. Ed è su questa proprietà, che discuteremo più ampiamente nelle conclusioni delle esperienze, parte delle quali si riferiscono specificatamente all'attivazione e all'inibizione in vivo dell'attività dell'anidraasi carbonica.

Argomento infatti di questo lavoro è lo studio dei valori dell'anidraasi carbonica nella malattia tubercolare polmonare in relazione con l'importanza di questo fermento nel processo di eliminazione del CO₂ dal sangue dell'alveolo polmonare, e delle variazioni che questi valori subiscono in seguito alla modificazione dei potenziali di ossido-riduzione cito-umoriali, ottenuta mediante la somministrazione di sostanze adatte nei soggetti in studio.

Sino ad oggi poche sono le ricerche sull'andamento dell'anidraasi carbonica in rapporto a condizioni patologiche, nonostante l'importanza di questo fermento specialmente nelle malattie del sistema respiratorio e cardiaco, e per quanto riguarda l'uomo esse sono limitate ad un esiguo numero di casi non patologici studiati da MELDRUM e ROUGHTON [l. c.] da HODGSON (9) e da SHISKIN (10).

Per questo insieme di considerazioni ci è parsa interessante una ricerca sistematica su questo enzima della respirazione in rapporto con l'andamento della malattia tubercolare.

(*) Secondo LEINER (8), ed a ragione, si dovrebbe chiamare più esattamente anidraasi carbonica o idratasi carbonica.

PARTE SPERIMENTALE.

Vari sono i metodi usati per la misura dell'attività dell'anidraasi carbonica. Noi ci siamo serviti di quello manometrico, descritto da PRINKMAN-MARGARIA e ROUGHTON (11), con alcune varianti suggerite da SHISKIN (l. c.), secondo cui si misura manometricamente la velocità di sviluppo del CO_2 da una soluzione di NaHCO_3 , mescolata con una soluzione tampone di fosfati

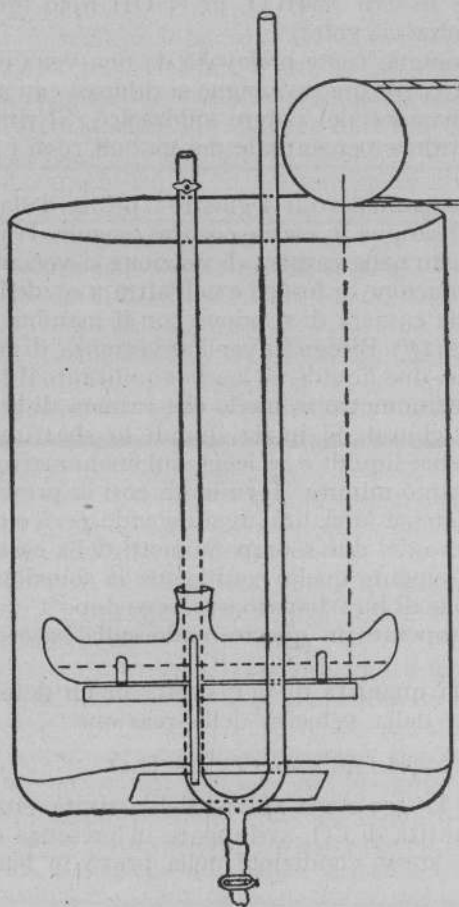


Fig. 1. - Schema dell'apparecchiatura.

in presenza del catalizzatore biologico. È necessaria a tale scopo la seguente attrezzatura :

- 1) un recipiente termostatico per mantenere la temperatura costante, a 15° , durante il periodo dell'esperienza ;
- 2) una camera di reazione del volume di 40-50 cc. in vetro neutro a forma di barca, con una profonda incisura longitudinale nel fondo, che la divide in due scompartimenti ;
- 3) un motorino elettrico per l'agitazione, che deve essere costante e regolare, altrimenti lo svolgimento del CO_2 varia da esperimento a esperimento, anche con lo stesso campione di sangue ;

4) un manometro ad U del diametro interno di 2 mm., lungo circa 60 cm., con scala graduata in mm.; delle due estremità del manometro una è aperta mentre l'altra è in comunicazione secondo la figura 1 con la camera di reazione.

Per il manometro è stata usata la soluzione di BRODIE.

I reagenti occorrenti per l'esperimento sono i seguenti:

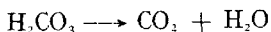
una soluzione m/5 di fosfati a pH 6,8;

una soluzione m/5 di NaHCO_3 in NaOH n/50 (questa soluzione deve essere rinnovata volta a volta).

Il campione di sangue viene prelevato da una vena e raccolto su ossalato di potassio. (0,1%) 1 cc. di questo sangue si diluisce con acqua 1 : 30 e si adopera per la determinazione del potere anidrasico; il rimanente serve per la determinazione del valore percentuale dei globuli rossi e del plasma all'ematocrito.

Il procedimento manuale è il seguente: prima della determinazione del potere anidrasico del sangue in esame occorre eseguire la prova in bianco con i soli reattivi. Per questo nella camera di reazione si versano in uno scompartimento 2 cc. di una soluzione di fosfati e nell'altra 2 cc. della soluzione di bicarbonato. Si connette la camera di reazione con il manometro e si immerge nel bagno termostatico a 15°. Bisogna aver l'avvertenza di non scuotere per evitare la mescolanza dei due liquidi. Si lascia equilibrare il tutto a 15°. Si chiude poi il rubinetto del manometro in modo che camera di reazione e manometro formino un sistema chiuso. Si inizia quindi lo sbattimento della navicella così da mescolare i due liquidi e si legge sul manometro la quantità di CO_2 svoltasi durante il primo minuto. Terminata così la prova in bianco, si ripete l'esperimento con le stesse modalità, aggiungendo però 0,05 cc. della diluizione di sangue 1 : 30 in uno dei due scompartimenti della camera di reazione, che può essere indifferentemente quello contenente la soluzione di fosfato o quello contenente la soluzione di bicarbonato e si legge dopo 1' sul manometro il nuovo valore. Abbiamo operato in questo modo sulla base dei risultati di ricerche comparative.

Infatti, poichè la quantità di CO_2 svolta in un determinato tempo rappresenta una misura della velocità della reazione:



noi diamo in questo lavoro come valore dell'attività enzimatica in esame la differenza tra la quantità di CO_2 sviluppata in presenza di sangue e la quantità sviluppata nelle stesse condizioni nella prova in bianco.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Come risulta dalle tabelle n. 1 e 2, riferentisi ad individui sani, l'ora del prelievo ed il sesso non comportano variazioni apprezzabili nell'attività dell'anidrasi carbonica ed i valori oscillano intorno a 16,54 per mmc. di sangue in toto e a 42,07 per mmc. di parte corpuscolata.

Dopo queste ricerche preliminari e di orientamento abbiamo iniziato la serie di determinazioni sul sangue di soggetti affetti da tbc. polmonare. Le esperienze hanno dimostrato che nelle forme leggere e ad andamento benigno i dati si differenziano poco da quelli trovati nei soggetti normali, mentre man mano che la malattia progredisce l'anidrasi carbonica presenta una netta diminuzione dei valori. Riservandoci di eseguire successivamente una ricerca

dettagliata sui rapporti tra anidresi carbonica e stato generale dell'ammalato, ci limitiamo in questa nota a riportare per esteso soltanto i dati che si riferiscono agli ammalati di forme gravi, estese, febbrili, rapidamente evolutive, con evidente stato di tossiemia. Come risulta dalla tabella n. 3 questi valori oscillano tra 3,64 e 12,02 per mmc. di sangue in toto e 10,40 e 32,48 per mmc. di parte corpuscolata.

Per quanto riguarda i rapporti tra l'attività dell'anidresi carbonica e i valori trovati all'ematocrito per la quantità di parte corpuscolata del sangue; le nostre esperienze confermano l'indipendenza dei due dati. Infatti come risulta dalla tabella n. 3, sebbene in alcuni casi sia evidente una concomitanza della diminuzione dell'attività catalitica e dell'abbassamento dei valori della parte corpuscolata del sangue, pure nella maggior parte dei casi questo valore è pressochè normale, mentre la attività catalitica è sempre in netta diminuzione. Inoltre con il trattamento con vitamina C, iposolfito di sodio e pilocarpina, mentre, come vedremo appresso, si ha un nettissimo aumento dell'attività catalitica, non si osservano variazioni a carico della quantità dei globuli rossi e dell'emoglobina. Questi dati confermano ancora una volta la non identificabilità tra anidresi carbonica ed emoglobina, del resto già dimostrata da diversi AA. e confermata in modo indiscutibile dalle esperienze di MARGARIA e FERRARI (12) sulla rigenerazione dell'anidresi carbonica nel sangue della rana salata. Infatti questi AA. hanno dimostrato che « l'anidresi carbonica nel sangue della rana salata si ripristina rapidamente si da portarsi alla concentrazione del 24 % di quella esistente nel sangue normale in circa 10 giorni, e ciò malgrado che nello stesso periodo di tempo il numero delle cellule per mmc. di sangue non sia aumentato che del 2,83 % e che l'emoglobina sia scarsissima »

In una successiva serie di esperienze, riallacciandoci a concetti già sviluppati da uno di noi (13) in precedenti lavori abbiamo voluto seguire il comportamento dell'anidresi carbonica del sangue di fronte al trattamento con acido ascorbico, iposolfito di sodio, pilocarpina e atropina. sostanze capaci di modificare i potenziali di ossido-riduzione cito-umorale. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle n. 4, 5, 6 e 7. Come risulta chiaro da queste, anche l'anidresi carbonica è attivata dalle sostanze riducenti e da quelle aventi azione vagotonica, mentre è inibita dall'atropina, sostanza ad azione simpaticomimetica. Non è qui il caso di ripetere il meccanismo secondo cui a parer nostro hanno luogo questa attivazione e questa inibizione; è argomento ampiamente discusso nei precedenti lavori, ma ci basta far presente che questi risultati completamente sovrapponibili a quelli ottenuti con altre e diverse attività biologiche, mostrano come il problema dell'attivazione e dell'inibizione rappresenti per le attività biologiche un campo di studi fecondo.

Concludendo: l'anidresi carbonica negli ammalati di tubercolosi polmonare, in condizioni generali gravi, è abbassata notevolmente e può essere riportata verso la norma con la somministrazione di sostanze aventi proprietà riducenti o vagotoniche.

* * *

Il presente lavoro era già in corso di stampa, quando siamo venuti a conoscenza che D. A. SCOTT e A. M. FISHER [J. Biol. Chem. 144, 371, (1944)] hanno ottenuto da una soluzione acetonica ammoniacale l'anidresi carbonica allo stato cristallizzato sotto forma di composto ammonio-anidresi carbonica, che contiene 16,5 % di N₂ e 0,2 % di Zn. Gli AA. hanno ottenuto anche delle cristallizzazioni di piperidina-anidresi carbonica, isoamilamina- e n-amilamina-anidresi carbonica.

TABELLA I.

Anidraasi carbonica nel sangue di soggetti sani di sesso maschile, determinata in prelevamenti eseguiti a diverse ore del giorno, e in diverse stagioni.

N.	Data	Anidraasi carbonica per mmc. di sangue in toto	Valore ematocrito	Anidraasi carbonica per mmc. di parte corpuscolata	Ora prelievo
1	21. 7. 44	16, 26	40	40, 65	11
	21. 7. 44	16, 86	40	42, 15	16
	23. 7. 44	16, 56	40	41, 40	11
2	23. 7. 44	16, 56	40	41, 40	16
	25. 7. 44	16, 86	40	42, 15	11
3	25. 7. 44	16, 86	40	42, 15	16
	27. 7. 44	17, 46	40	43, 65	11
4	27. 7. 44	16, 86	39	43, 23	16
	2. 8. 44	16, 26	39	41, 69	11
5	2. 8. 44	16, 86	39	43, 23	16
	10. 10. 44	17, 46	40	43, 65	11
	30. 10. 44	16, 86	40	42, 15	11
6	6. 12. 44	17, 16	40	42, 90	11
	5. 1. 45	16, 86	40	42, 15	11
	3. 2. 45	17, 77	39	45, 56	11

TABELLA 2.

Anidraasi carbonica nel sangue di soggetti sani di sesso diverso.

N.	Data	Anidraasi carbonica per mmc. di sangue in toto	Valore ematocrito	Anidraasi carbonica per mmc. di parte corpuscolata	Sesso	Ora prelievo
1	22. 7. 44	16, 86	39	43, 23	m.	11
2	23. 7. 44	17, 77	37	48, 02	f.	11
3	23. 7. 44	17, 46	39	44, 76	f.	11
4	24. 7. 44	15, 65	38	41, 18	f.	11
5	27. 7. 44	16, 86	40	42, 15	m.	11
6	2. 8. 44	14, 45	37	39, 05	f.	11
7	2. 8. 44	14, 75	38	38, 87	m.	11
8	9. 8. 44	14, 45	38	36, 12	f.	11
9	15. 8. 44	16, 26	37	40, 65	m.	11
10	20. 8. 44	16, 56	40	41, 40	m.	11
11	21. 8. 44	16, 86	39	43, 23	m.	11
12	24. 8. 44	16, 26	40	40, 65	f.	11

TABELLA 3.

Anidraasi carbonica in tubercolotici affetti da forme gravi.

N.	Data	Anidraasi carbonica per mmc. di sangue in toto	Valore ematocrito	Anidraasi carbonica per mmc. di parte corpuscolata	Sesso	Ora prelievo
1	29.7.44	6,62	30	22,06	m.	II
2	29.7.44	10,23	40	25,57	m.	II
3	30.8.44	3,64	35	10,40	f.	II
4	30.8.44	6,62	38	17,42	m.	II
5	1.8.44	12,02	37	32,48	f.	II
6	4.8.44	4,82	35	13,77	f.	II
7	22.8.44	11,74	37	31,72	f.	II
8	23.8.44	7,82	38	20,57	f.	II
9	10.9.44	6,02	36	16,72	m.	II
10	5.12.44	9,63	35	27,51	f.	II
11	20.12.44	9,34	40	23,35	f.	II
12	2.2.45	9,63	39	24,69	f.	II
13	4.3.45	8,72	38	22,94	f.	II
14	8.3.45	10,23	40	25,57	f.	II
15	3.4.45	5,72	39	14,66	f.	II

TABELLA 4.

Anidraasi carbonica in tubercolotici affetti da forme gravi di tbc. prima e dopo il trattamento con Vit. C.

N.	Anidraasi carbonica per mmc. di sangue in toto		Valore ematocrito		Anidraasi carbonica per mmc. di parte corpuscolata	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	Prima	Dopo
1	6,62	14,45	30	30	22,06	48,16
2	10,23	14,75	40	35	25,57	42,14
3	3,64	14,15	35	35	10,40	40,43
4	6,62	15,06	38	36	17,42	41,83
5	12,02	14,65	37	34	32,48	42,50
6	4,82	14,15	35	37	13,77	38,24
7	11,74	14,45	37	36	31,72	40,13
8	7,82	15,06	38	37	20,57	40,71
9	6,02	14,15	36	35	16,72	40,42
10	9,63	15,36	35	35	27,51	43,88

TABELLA 5.

*Anidrasi carbonica in tubercolotici affetti da forme gravi di tbc.
prima e dopo il trattamento con Na₂ S₂ O₃ (6 gg.).*

N.	Anidrasi carbonica per mmc. di sangue in toto		Valore ematocrito		Anidrasi carbonica per mmc. di parte corpuscolata	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	Prima	Dopo
1	7,23	12,04	36	36	20,08	33,44
2	8,43	12,95	37	37	22,78	35,00
3	9,63	13,85	36	36	26,75	38,47
4	9,34	14,45	38	38	24,58	38,29
5	6,62	12,35	36	36	18,39	34,30
6	6,02	13,85	36	36	16,72	38,47
7	10,23	14,15	40	40	25,57	35,37

TABELLA 6.

*Anidrasi carbonica in soggetti tubercolotici prima e dopo il trattamento
con pilocarpina (3 gg. I ctgr.).*

N.	Anidrasi carbonica per mmc. di sangue in toto		Valore ematocrito		Anidrasi carbonica per mmc. di parte corpuscolata	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	Prima	Dopo
1	9,34	14,45	38	38	24,57	38,02
2	6,62	14,15	36	37	18,39	38,24
3	9,34	14,75	38	38	24,68	38,81
4	8,43	16,26	37	37	22,83	43,94
5	6,92	14,15	35	35	19,76	40,42
6	6,02	13,85	36	36	16,72	38,47

TABELLA 7.

*Anidrasi carbonica in soggetti affetti da tbc. prima e dopo il trattamento
con atropina (3 gg. I mgr.).*

N.	Anidrasi carbonica per mmc. di sangue in toto		Valore ematocrito		Anidrasi carbonica per mmc. di parte corpuscolata	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	Prima	Dopo
1	11,74	5,72	37	37	31,72	15,45
2	10,23	5,12	37	37	27,65	13,84
3	12,04	7,23	38	38	31,69	19,02
4	14,45	9,34	37	38	39,05	24,57
5	12,95	6,02	38	38	34,07	15,84
6	12,34	4,82	38	38	32,47	12,68
7	16,86	9,63	40	40	42,15	24,07

RIASSUNTO

È stato studiato il comportamento dell'anidraasi carbonica nel sangue di individui sani ed ammalati di tubercolosi polmonare. Negli individui sani tale attività non varia sensibilmente nè con il sesso nè con l'ora del prelievo del sangue. Nei tubercolotici in condizioni generali gravi è invece notevolmente abbassata. Normalizzando i potenziali di ossido-riduzione cito-umorale, il valore viene riportato verso la norma.

BIBLIOGRAFIA

- (1) HENRIQUES O. M. — « *Biochem. Z.* » 200, 1 (1928).
- (2) VAN SLYKE D.D.-HAWKINS J. A. : « *J. Biol. Chem.* », 87, 265, (1930).
- (3) BRINKMAN R. e MARGARIA R. : « *Journ. of. Physiol.* », 72, 6, (1931).
- (4) DIRKEN M.N. e MOOK H. W. : « *Journ. of. Physiol.* », 73, 249, (1931).
- (5) MELDRUM N.U. e ROUGHTON F.J.W. : « *Journ. of. Physiol.* », 75, 3, (1932) ; 80, 113, (1933).
- (6) LEINER M. e LEINER G. : « *Biol. Zbl.* » 60, 449, (1940) ; « *Chem. Zbl.* » (1940), II, 2480.
- (7) KIESE M. : « *Naturwiss* » 29, 116, (1941).
- (8) LEINER M. : « *Naturwiss* » 28, 165, (1940).
- (9) HODGSON T. H. : « *Brit. J. exp. Pat.* » 17, 75, (1936).
- (10) SHISKIN C. « *Tubercle* » 20, 227, (1938-39).
- (11) BRINKMANN R., MARGARIA R. e ROUGHTON F. J. W. : « *Philos. Trans. Roy. Soc. London* » (A) 232, 65, (1933).
- (12) MARGARIA R. e FERRARI R. : *Enzymologia*, 2, 117, (1937).
- (13) CATTANEO C. e MARIANI B. : « *Arch. Sci. Biol.* » 24, 139 (1938) ; « *Ann. Ist. C. Forlanini* » 3, 319, (1939) ; CATTANEO C. e MORELLINI M. : « *Ann. Ist. C. Forlanini* », 4, 321, (1939), « *Boll. Ist. Sier. Milanese* », 18, 52, (1939) ; CATTANEO C. e MACCONE V. « *Giorn. Batt. Immun.* » 27, 38, (1941).

