

4. L. TENTORI e G. VIVALDI — **Sindrome mortale caratterizzata da manifestazioni a carico del sistema nervoso nel ratto alimentato con una dieta altamente purificata contenente solfonamidoguanidina. - IV. Relazioni con uno stato di ipertiroidismo sperimentale.**

Riassunto. — I risultati ottenuti nel corso di nuove ricerche sulla sindrome mortale caratterizzata da manifestazioni a carico del sistema nervoso in ratti alimentati con dieta sintetica purificata contenente solfonamidoguanidina (S.M.N.) hanno condotto gli AA. a trarre le seguenti conclusioni:

1) La polvere di fegato intero 1:5 somministrata agli animali mescolata con la dieta nella proporzione del 10%, possiede una attività protettiva non completa contro l'insorgenza della S.M.N., contrariamente a quanto era già stato osservato nel caso degli estratti di fegato parzialmente purificati.

2) Nel corso della S.M.N. il metabolismo basale si abbassa notevolmente raggiungendo valori medi di —65,5%.

3) Contrariamente a quanto avviene per molte carenze di fattori vitaminici, l'ipertiroidismo sperimentale non accelera la comparsa della S.M.N., anzi nessuno degli animali che ricevevano nella dieta caseina iodata è stato colpito da tale malattia.

4) I risultati ottenuti nel presente lavoro fanno pensare che uno stato di ipotiroidismo abbia una certa importanza nella genesi della S.M.N., o che, per lo meno, renda possibile il suo insorgere.

Résumé. — Les résultats obtenus au cours de nouvelles recherches sur le syndrome mortel caractérisé par des manifestations dues au système nerveux chez les rats alimentés avec une diète synthétique purifiée contenant de la sulfonamidoguanidine (S.M.N.) ont dicté aux auteurs les conclusions suivantes:

1) La poudre de foie entier 1:5 administrée aux animaux, mêlée à la diète dans la proportion du 10%, possède une activité protectrice incomplète contre la S.M.N., contrairement à ce qui avait été déjà observé dans le cas d'extraits de foie partiellement purifiés.

2) Au cours du S.M.N. le métabolisme basal s'abaisse d'une façon remarquable jusqu'à des valeurs moyennes de —65,5%.

3) Contrairement à ce qui a lieu pour beaucoup de carences de facteurs vitaminiques, l'hyperthyroïdisme expérimental n'accélère pas la manifestation du S.M.N., loin de là : aucun des animaux qui recevaient de la caséine iodée dans la diète n'a été frappé par cette maladie.

4) Les résultats obtenus dans cette étude font penser qu'un état d'hyperthyroïdisme a une certaine importance comme cause du S.M.N., ou tout au moins, facilite sa manifestation.

Summary. — 1) The results obtained in the course of further researches on the mortal syndrome characterized by neurological symptoms (S.M.N.) which affects rats fed a purified synthetic diet containing sulfaguanidine (S.M.N.) are reported.

2) Powdered whole liver 1:5 administered to the animals mixed to the diet in the amount of 10% showed an incomplete activity in preventing S.M.N., contrary to what has been previously observed with partially purified liver extracts.

3) In the course of the S.M.N., a significative fall of basal metabolism was observed; average values of —65.5% were obtained.

4) Contrary to what often occurs in a number of vitamin deficiencies, experimental hyperthyroidism does not hasten the appearance of the S.M.N.: none of the animals fed with iodinated casein containing diet was affected by the disease.

5) The foregoing observations lead to the hypothesis that experimental hyperthyroidism plays a role in the production of the S.M.N. or that, at least, it facilitates its appearance.

Zusammenfassung. — Die Ergebnisse neuer Forschungen auf dem Gebiet der Lethalsyndrome gekennzeichnet durch Manifestationen des Nervensystems bei Ratten, die mit einer stark gereinigten, Sulfonamidguanidin enthaltenden Diät gefüttert waren (S.M.N.) veranlassten die Verfasser zu folgenden Schlussfolgerungen:

1) Den Tieren wurde 1:5 Leberpulver, das der Diät im Verhältnis von 10% beigemischt war, verabreicht. Dieses Pulver hat eine nicht vollständige Schutzwirkung gegen das Auftreten der S.M.N. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu mit teilweise gereinigten Leberextrakten erzielten Ergebnissen.

2) Im Verlauf der S.M.N. sinkt der Grundmetabolismus beträchtlich bis zu Durchschnittswerten von —65,5%.

5) Im Gegensatz zu bei Mangel anderer Vitamine gemachten Beobachtungen beschleunigt experimenteller Hyperthyroidismus nicht das Auftreten der S.M.N. und kein Tier, das mit jodkaseinhaltiger Diät gefüttert wurde, wurde von der S.M.N. befallen.

4) Die von den Verfassern erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Hyperthyroidismus eine gewisse Bedeutung bei der Entstehung der S.M.N. hat oder doch wenigstens ihre Entstehung möglich macht.

Negli ultimi 25 anni, sono stati pubblicati numerosi lavori sperimentali e clinici sui rapporti fra la funzione della tiroide ed il metabolismo delle vitamine. E' stato pertanto possibile giungere alla conclusione generale che l'ipertiroidismo, prodotto sia sperimentalmente che osservato in casi clinici, aumenta il fabbisogno di numerose vitamine (¹).

Anche di recente uno stato di ipertiroidismo sperimentale, provocato con la somministrazione nella dieta di polvere di tiroide o di caseina iodata, è stato sfruttato con successo allo scopo di accelerare la comparsa ed aumentare la gravità dei sintomi della carenza di alcuni fattori sia idrosolubili che liposolubili, come ad esempio della vitamina B₁₂ (^{2,3}) e della vitamina E (⁴).

Dal momento che uno stato di ipertiroidismo sperimentale, attraverso la esaltazione del metabolismo dell'animale, è capace, come abbiamo detto, di abbreviare il periodo di deplezione e di accelerare quindi la comparsa di una carenza alimentare aumentando il consumo del fattore o dei fattori studiati, nel presente lavoro ci siamo proposti di studiare le relazioni fra l'ipertiroidismo sperimentale e la sindrome mortale caratterizzata da manifestazioni a carico del sistema nervoso (S.M.N.) descritta nei lavori precedenti (^{5,6,7}).

TECNICA SPERIMENTALE.

Sono state usate le seguenti diete:

Dieta A1

Caseina priva di fattori idrosolubili	g	180
Saccarosio	g	670
Miscela salina sec. Osborne e Mendel	g	40

Burro	g	90
Olio di fegato di merluzzo	g	20

Ad ogni Kg della dieta suddetta venivano aggiunte le seguenti sostanze ad attività vitaminica:

Tiamina HCl	mg	10
Riboflavina	mg	20
Piridossina	mg	10
Acido nicotinico	mg	100
Pantotenato di calcio	mg	100
Acido p-aminobenzoico	mg	100
Acido ascorbico	mg	100
Colina HCl	mg	200
Inositolo	mg	200
Menadione sodio bisolfito	mg	50
Alfa-tocoferolo	mg	100
Linoleato di etile	g	10

Dieta A2

Dieta A7

Dieta A1	g	1000	Dieta A2	g	950
Acido folico	mg	5	Feci essiccate e polverizzate di		
Solfonamidoguanidina	g	20	animali ad alimentazione		
			normale	g	50

Dieta A14

Dieta A2	g	1000
Protamone (*)	g	0,5

A ciascun Kg di questa dieta venivano aggiunte le seguenti sostanze ad attività vitaminica (la quantità di alcuni di questi fattori è superiore a quella presente nella dieta A1 e normalmente contenuta in altre diete sintetiche, per sopperire all'aumentato fabbisogno di esse da parte di animali resi ipertiroidei alimentandoli con una dieta contenente caseina iodata):

Tiamina HCl	mg	100
Riboflavina	mg	20
Piridossina	mg	10
Acido nicotinico	mg	100
Pantotenato di calcio	mg	100
Acido p-aminobenzoico	mg	100

(*) Protamone = caseina iodata, fornito da Cerophyl Lab. Kansas City, U.S.A.

Acido ascorbico	mg	100
Colina HCl	g	1
Inositolo	mg	200
Menadione sodio bisolfito	mg	50
Alfa-tocoferolo	mg	100
Linoleato di etile	g	10

Dieta A15

Dieta A2	g	950
Protamone	g	0,5
Feci essiccate e polverizzate di animali ad alimentazione normale	g	50

Dieta A16

Dieta A2	g	900
Polvere di fegato 1:5 (*)	g	100

Dieta A17

Dieta A2	g	900
Protamone	g	0,5
Polvere di fegato 1:5 (*)	g	100

Dieta A18

Dieta A2	g	850
Protamone	g	0,5
Polvere di fegato 1:5	g	100
Feci essiccate e polverizzate di animali ad alimentazione normale	g	50

Le feci usate per il confezionamento delle diete venivano raccolte e trattate secondo le modalità descritte nel lavoro precedente (7).

Quando le diete contenevano feci essiccate e polverizzate, o polvere di fegato, veniva contemporaneamente sottratta da esse, durante il confezionamento, la stessa quantità in peso di saccarosio allo scopo di non alterare la percentuale di solfonamidoguanidina presente nella dieta.

Un gruppo di 100 ratti albinici dei due sessi e del peso di circa 40 grammi, provenienti dall'allevamento del nostro Istituto, sono stati suddivisi in 8 gruppi, seguendo il metodo del sorteggio e curando che in ciascun gruppo fosse compreso un ugual numero di ratti dei due sessi.

Gli animali di ciascun gruppo hanno ricevuto ad libitum una delle diete sopraelencate che sono state distribuite tra i gruppi secondo il seguente schema:

Gruppo I°	10 animali	Dieta A1
Gruppo II°	10 animali	Dieta A2
Gruppo III°	10 animali	Dieta A7
Gruppo IV°	10 animali	Dieta A14
Gruppo V°	20 animali	Dieta A15

(*) Polvere di fegato totale essiccato nel vuoto a bassa temperatura.

Gruppo VI ^o	10 animali	Dieta A16
Gruppo VII ^o	20 animali	Dieta A17
Gruppo VIII ^o	10 animali	Dieta A18

Gli animali venivano pesati una volta alla settimana e osservati ogni giorno per rilevare eventuali segni patologici; quando essi presentavano i primi sintomi della S.M.N. venivano posti in gabbie individuali e sorvegliati fino alla morte. Di tutti gli animali venuti a morte per qualsiasi ragione veniva eseguita l'autopsia: gli organi venivano pesati e fissati per il successivo esame istologico (*).

L'esperimento non è stato interrotto fino a che tutti gli animali impiegati non sono venuti a morte.

Dopo circa tre mesi dall'inizio dell'esperimento è stato misurato il metabolismo basale di tutti gli animali sopravvissuti usando un apparecchio a circuito chiuso. Per la misura del metabolismo basale è stato preso in considerazione solamente il consumo di ossigeno; l'anidride carbonica ed il vapore acqueo venivano assorbiti con calce sodata e cloruro di calcio rispettivamente; la circolazione dell'aria era assicurata da una pompa; la temperatura del sistema veniva mantenuta costante tra 24° e 26° C. Durante il corso dell'esperimento è stato inoltre misurato il metabolismo basale degli animali che presentavano i primi sintomi della S.M.N. Le misurazioni del metabolismo basale venivano, naturalmente, eseguite su animali a digiuno da 24 ore e sempre nello stesso periodo della giornata.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

I risultati osservati sono riportati nella Tabella I per quello che riguarda l'insorgenza della S.M.N. Anche nel presente lavoro, come in quello precedente, per la stesura della Tabella abbiamo ritenuto opportuno distinguere gli animali morti durante i primi 20 giorni dell'esperimento, da quelli che hanno sopravvissuto oltre tale periodo di tempo, arbitrariamente stabilito, in modo da escludere quegli animali che non resistevano al cambiamento di ambiente e di alimentazione. Sia la sopravvivenza media, sia la percentuale di mortalità sono state calcolate tenendo conto soltanto degli animali che avevano superato il primo periodo di adattamento; di questi sono inoltre stati indicati, in giorni, dall'inizio dell'esperimento, i limiti estremi della sopravvivenza per fornire un quadro della durata della vita dei ratti di ciascun gruppo.

(*) I risultati di tale studio saranno pubblicati in altro lavoro.

I primi tre gruppi, I^o, II^o III^o, sono gruppi di controllo necessari a stabilire che l'andamento dell'esperimento non fosse differente da quello delle esperienze precedenti; questi gruppi erano inoltre necessari per avere dei dati di riferimento circa il metabolismo basale degli animali impiegati. Gli altri gruppi di animali sono stati alimentati con diete che contenevano tutte, ad eccezione della Dieta A16, caseina iodata.

Come è noto questa sostanza possiede una attività praticamente uguale a quella della polvere di tiroide poichè in essa sono contenute diiodotirosina e tiroxina, dimostrabili mediante idrolisi e frazionamento di questa caseina iodata. Le diete A17 e A18, somministrate ai gruppi VII^o e VIII^o, contenevano, oltre la caseina iodata, anche polvere di fegato intero 1:5 nella quantità del 10%. E' noto che la polvere di fegato aggiunta in questa proporzione, è capace di proteggere i ratti dall'alta mortalità per tireotossicosi provocata in essi dalla azione della polvere di tiroide o della caseina iodata aggiunte alla dieta (⁸,⁹). Il gruppo VI^o riceveva invece la dieta A16, contenente la sola polvere di fegato, allo scopo di accertare se questa avesse una attività preventiva sulla S.M.N. in modo da poterne tener conto nella valutazione dei risultati dei gruppi VII^o e VIII^o. Finalmente al gruppo V^o è stata somministrata la dieta A15

TABELLA II

Gruppi	Dieta	Numero degli animali	Valori medi del M. B. g O ₂ /100g/1h	%
Gruppo I	A1	10	0,191	— —
Gruppo II	A2	6	0,139	— 27,2
Gruppo III	A7	8	0,178	— 6,8
Gruppo IV	A14	4	0,392	+ 105,8
Gruppo V	A15	7	0,359	+ 87,9
Gruppo VI	A16	9	0,216	+ 13,0
Gruppo VII	A17	15	0,295	+ 54,4
Gruppo VIII	A18	7	0,349	+ 82,7
Animali con S.M.N.		9	0,066	— 65,8

Valori medi del metabolismo basale nei vari gruppi di ratti in esperimento.

contenente, oltre la caseina iodata, anche feci essiccate e polverizzate di animali ad alimentazione normale, per controllare se queste conservassero la loro attività protettiva contro la S.M.N. anche per i ratti ipertiroidici; le feci erano inoltre presenti nella dieta A18, di cui si è parlato sopra, per poter osservare il comportamento di un gruppo di animali che ricevevano polvere di fegato, feci e caseina iodata.

Per accertarsi del grado di ipertiroidismo raggiunto, è stata eseguita una misurazione del metabolismo basale di tutti gli animali ancora viventi intorno al 90° giorno dall'inizio dell'esperimento. Un quadro generale dei risultati ottenuti è rappresentato nella Tabella II nella quale sono riportati, per ciascun gruppo di animali, i valori medi del consumo di ossigeno espressi in g di O₂ per 100 g di peso corporeo e per ora.

Il valore del metabolismo basale del gruppo I° è da considerarsi normale: corrisponde infatti ai valori medi per il ratto adulto normale riportati da altri AA. (10). Negli animali alimentati con la dieta A2, come era da aspettarsi data la capacità della solfonamidoguanidina di indurre nel ratto un marcato ipotiroidismo, il metabolismo basale è diminuito del 27,2%, dato che si accorda perfettamente con le osservazioni di MACKENZIE e di ASTWOOD et al. su ratti della stessa età alimentati con la dieta standard naturale di Mc COLLUM contenente solfonamidoguanidina nella stessa percentuale (11,12). Il metabolismo basale degli animali dei gruppi III° e IV° non si discosta dalla normalità nonostante che le diete ad essi somministrate contenessero solfonamidoguanidina nella solita percentuale del 2%. La polvere di fegato, in maggior misura, e le feci essiccate, mescolate per lunghi periodi alla dieta, sembrano avere quindi la capacità di contrastare l'ipotiroidismo provocato dalla solfonamidoguanidina riportando a valori normali il metabolismo basale; l'aspetto macroscopico ed istologico della ghiandola rimangono però invariati conservandosi il caratteristico ingrossamento, la riduzione della sostanza colloide e l'aumento di spessore dell'epitelio (*). Il metabolismo basale è invece aumentato in maniera notevole in tutti i gruppi di animali che ricevevano una dieta contenente caseina iodata, con una punta massima per il gruppo IV° la cui dieta conteneva solo caseina iodata, senza polvere di fegato o di feci.

Un ultimo dato importante ci ha fornito la misura del metabolismo basale degli animali che presentavano i primi segni della S.M.N.: è stato messo in evidenza un costante e marcatissimo abbassamento di esso che raggiunge in media —65,5%.

La S.M.N. è insorta praticamente in tutti gli animali del gruppo II°

(*) Dati non pubblicati.

che hanno superato la fase iniziale di adattamento alle condizioni sperimentali, confermando così i risultati ottenuti negli esperimenti precedenti; anche gli altri due gruppi di controllo I° e III° hanno confermato i dati dei precedenti lavori.

Il 30% degli animali del gruppo VI°, che venivano alimentati con la dieta A16, contenente solfonamidoguanidina e polvere di fegato, hanno presentato la S.M.N. La mortalità per S.M.N. di questo gruppo è chiaramente inferiore a quella del gruppo di controllo che riceveva nella dieta la sola solfonamidoguanidina; ne risulta quindi che la polvere di fegato intero aggiunta alla dieta nell'ammontare del 10% ha una parziale attività protettiva contro l'insorgenza della S.M.N., attività che viene evidentemente perduta nel corso dei processi di purificazione degli estratti di fegato iniettabili, dal momento che questi, come è stato dimostrato negli esperimenti precedenti (6), non la possiedono.

Nessuno degli animali, appartenenti ai gruppi che ricevevano nella dieta caseina iodata, è morto con sintomi della S.M.N.; è vero che gli animali dei gruppi IV° e V° hanno presentato una sopravvivenza media piuttosto bassa, pure essendo alcuni di essi arrivati a vivere più a lungo di 500 giorni; è vero ancora che i gruppi V° e VIII° ricevevano con la dieta feci di animali normali ed erano quindi adeguatamente protetti contro l'insorgenza della S.M.N. e che una protezione parziale contro questa era assicurata anche agli animali del gruppo VII° dalla presenza nella dieta A17 di polvere di fegato; tuttavia il fatto che costantemente in tutti i gruppi che ricevevano caseina iodata nella dieta nessun animale sia venuto a morte per S.M.N., ci sembra ugualmente suggestivo tanto più tenendo presenti i valori medi del metabolismo basale per i vari gruppi in esperimento.

Gli animali alimentati con la dieta A2 contenente il 2% di solfonamidoguanidina presentano infatti un chiaro stato di ipotiroidismo ed il loro metabolismo basale si abbassa in modo estremamente grave all'insorgere dei primi sintomi della S.M.N.; mentre le sostanze che aggiunte a questa stessa dieta hanno una attività protettiva completa o parziale contro la S. M. N., hanno anche il potere di contrastare lo stato di ipotiroidismo legato all'azione della solfonamidoguanidina riconducendo il metabolismo basale a valori assai vicini alla norma. Inoltre nel corso di esperienze condotte anche in altri campi (***) abbiamo potuto constatare che l'aggiunta di streptomina o di succinilsulfatiazolo alla stessa dieta purificata A1 non ha mai provocato negli animali trattati la S.M.N. Queste due sostanze, come è noto, possiedono la capacità di inibire lo svi-

(**) Dati non pubblicati.

luppo della flora intestinale in maniera simile alla solfonamidoguanidina ma non hanno alcuna azione sulla tiroide. Queste osservazioni, unite alla mancata comparsa della S.M.N. negli animali con ipertiroidismo sperimentale, potrebbero indicare che uno stato di ipotiroidismo abbia una qualche importanza nella produzione della S.M.N., ferme rimanendo le altre condizioni di cui si è discusso nei precedenti lavori, o che per lo meno questo stato di ipotiroidismo ne favorisca il manifestarsi.

CONCLUSIONI.

1) La polvere di fegato intero 1:5 somministrata agli animali mescolata con la dieta nella proporzione del 10%, possiede una attività protettiva non completa contro l'insorgenza della S.M.N. Questa attività viene perduta durante il procedimento di purificazione per la preparazione degli estratti di fegato iniettabili.

2) Nel corso della S. M. N. il metabolismo basale si abbassa notevolmente raggiungendo una diminuzione media del 65,5%.

3) Contrariamente a quanto avviene per molte carenze di fattori vitaminici, l'ipertiroidismo sperimentale non accelera la comparsa della S. M. N., anzi nessuno degli animali che ricevevano nella dieta caseina iodata è stato colpito da tale malattia.

4) I risultati ottenuti nel presente lavoro fanno pensare che uno stato di ipotiroidismo abbia una certa importanza nella genesi della S. M. N., o che per lo meno renda possibile il suo insorgere.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) DRILL V. A.: *Physiol. Rev.*, 23, 355, 1943.
- (2) FROST D. V., FRICKE H. H., SPRUTH H. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 72, 102, 1949.
- (3) FROST D. V., FRICKE H. H., SPRUTH H. C.: *J. Nutrition*, 49, 107, 1953.
- (4) TENTORI L., TOSCHI G., VIVALDI G.: *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, XXIX, 90, 1953.
- (5) TENTORI L., VIVALDI G.: *Rend. Ist. Sup. Sanità*, XIII, 670, 1950.
- (6) TENTORI L., VIVALDI G.: *Rend. Ist. Sup. Sanità*, XIV, 216, 1951.
- (7) TENTORI L., VIVALDI G.: *Rend. Ist. Sup. Sanità*, in corso di stampa.
- (8) ERSHOFF B. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 64, 500, 1947.
- (9) ERSHOFF B. H., Mc WILLIAMS H. B.: *Science*, 108, 632, 1948.
- (10) MACKENZIE C. G., MACKENZIE J. B.: *Endocrinology*, 32, 185, 1943.
- (10) GRIFFITH J. Q., FARRIS E. J.: *The rat*. Lippincott Co., 1942, pag. 185.
- (11) MACKENZIE C. G., MACKENZIE J. B.: *Endocrinology*, 32, 185, 1943.
- (12) ASTWOOD E. B., SULLIVAN A. B., TYSLOWITZ R.: *Endocrinology*, 32, 210, 1943.