

29. AZIONE DI ALCUNI REGIMI DIETETICI SULLA RESISTENZA DEL MUS MUSCULUS ALLA INTOSSICAZIONE ARSENOBENZOLICA.

E' noto come spesso varino, da laboratorio a laboratorio, le cifre riguardanti la tossicità degli arsenobenzoli, pur sperimentando con lo stesso preparato, con la stessa specie animale, e con la medesima tecnica.

Certamente numerosi sono i fattori che influiscono sull'indice di tossicità (d. m. l.) di questi prodotti chemioterapici, ma il ruolo che gioca il fattore alimentare negli animali, che vengono sottoposti a queste prove, è senza dubbio essenziale. Numerosi ricercatori si sono occupati dell'argomento e nella grande maggioranza sono d'accordo su questo fatto.

Wien ⁽¹⁾ nel 1936 studiando su ratti in carenza vitaminica, ha notato dei fatti molto interessanti. Mentre la dose di 400 mgr. pro-Kg. di neoarsfenamina uccideva l'80 % dei ratti in deficienza di vitamina A o D, la stessa dose, inoculata a controlli della stessa covata e con lo stesso regime alimentare più carotene o ergosterina irradiata, ne uccideva solo il 40 %. La carenza di vitamina B non dimostrava invece una influenza così accentuata, benchè evidente. Infatti la d.m.l. che per i ratti deficienti di vitamina B, era di mgr. 385 di neoarsfenamina pro Kg., arrivava sino a mgr. 15 pro Kg. nei ratti controllo trattati con lievito di birra.

Ma non le sole vitamine proteggono gli animali dall'intossicazione arsenobenzolica. Beerman ⁽²⁾ ha studiato l'effetto di varie diete nel prevenire i disturbi epatici da intossicazione arsenobenzolica, e Craven ⁽³⁾, sperimentando nei cani, ha notato l'efficacia di una dieta ricca di grassi e di proteine, capace di proteggere il fegato da disturbi dovuti all'arsenobenzolo in circolo.

Hooper, Collis e Wright nel 1921 dimostrarono che diete a base di pane bianco e latte aumentano la resistenza degli animali alla neoarsfenamina ed alla arsfenamina, spiegando doversi trattare di una protezione da

parte del fegato, ed hanno fin da allora raccomandato l'accurato controllo della dieta nei giorni precedenti la somministrazione del farmaco.

Wien (⁴) ha dimostrato che mentre 8 mgr. di Neosalvarsan per 14 gr. di peso corporeo uccideva il 56 % dei topolini alimentati con pane e latte, la stessa dose uccideva il 78 % dei topolini nutriti con cariossidi di grano. La d.m.l. di neoarsfenamina, per topolini alimentati con pane e latte, era superiore del 10 % a quella per i topi alimentati con sola avena.

Wien faceva però notare che la differenza non era tanto dovuta al latte in sè, perchè topolini trattati con pane ed una soluzione di lattosio dimostravano un eguale comportamento all'intossicazione, quanto ad un apporto extra di carboidrati o forse ad un principio tossico esistente nell'avena.

Nel presente lavoro si è voluto indagare quale azione esplicassero nell'intossicazione da arsenobenzoli alcune diete, e particolarmente quella ricca di fegato crudo.

E' noto come il fegato agisca disintossicando, e come alcuni metodi per diminuire la tossicità degli arsenobenzoli, così diffusi in terapia, possibilmente senza alterarne l'efficacia curativa, siano basati appunto su quest'azione. Rebaudi (⁵) basandosi sull'azione disintossicante dei tessuti organici ridotti allo stato di aminoacidi (Figari, Sivori, Menniti) e partendo dal concetto che l'insufficienza epatica abbia grande parte nei fenomeni di intolleranza agli arsenobenzoli, scioglie il farmaco in una soluzione di aminoacidi epatici, prima di inocularla.

Savulescu (⁶) scioglie l'arsenobenzolo in una soluzione di deidrolato di sodio, poichè i sali biliari facilitano la eliminazione di alcuni veleni, che il fegato è deputato a distruggere.

Inoltre le originali ricerche della scuola di Sato all'Università Imperiale di Tokio (⁷) sembrano fornire degli argomenti in favore di un ormone epatico antitossico (detoxicating hormon of the liver) che è stato denominato yakriton, dal vocabolo giapponese yakrit che significa fegato, ed è stato adoperato per iniezione sottocutanea, per aumentare la resistenza degli animali alla intossicazione arsenobenzolica.

Le mie esperienze venivano così condotte. Gli animali (*mus musculus*) giunti in laboratorio da allevamenti di campagna, venivano divisi in gruppi e mantenuti alla temperatura di 18-20° C. Al primo gruppo veniva som-

ministrata un'alimentazione composta di: acqua, pane secco, verdura *ad libitum* (dieta A). Agli animali del secondo gruppo veniva aggiunta una razione di carne di cavallo (muscolo) diminuendosi nel contempo la razione del pane e della verdura senza mai abolirla (dieta B).

Gli animali del terzo gruppo ricevevano oltre il pane e l'erba anche fegato crudo di cavallo *ad libitum*, cibo che era sempre molto appetito (dieta C).

Gli animali del quarto gruppo ricevevano verdura ed una pappa così composta: Ovoalbumina gr. 9 - Caseina gr. 9 - Amido gr. 54 - Strutto gr. 15 - Burro gr. 9 - Lievito di birra secco gr. 5 - Miscela salina di Osborne e Mendel gr. 4. Questa pappa, ben accetta ai topolini specie nei primi giorni, può considerarsi completa dal punto di vista dietetico in base alle attuali conoscenze sulle necessità alimentari di proteine, grassi, idrati di carbonio, minerali e vitamine (dieta D).

Tutti e quattro i gruppi venivano tenuti ai regimi alimentari descritti per una settimana. Ho curato di scegliere per l'esperienza elementi dello stesso sesso ma mi è stato impossibile prenderli di peso uguale, come avrei desiderato di fare, poichè è noto, dalle ricerche di Durham Gaddum e Marchall ⁽⁸⁾, che topolini di peso uniforme danno i migliori risultati.

Per tutte queste prove di tossicità si è creduto opportuno servirsi di un prodotto arsenobenzolico tipo 914 in polvere, confezionato in fiale; di tale prodotto si era già dimostrata l'elevata tossicità.

Il giorno della inoculazione gli animali venivano tenuti a digiuno alimentare per quattro ore e quindi venivano pesati.

L'iniezione endovenosa, veniva eseguita accuratamente in non meno di 50" con una siringa da tuberculina, in una delle vene della coda del topolino, le quali venivano rese turgide con la strofinazione di un batuffolo di ovatta leggermente intriso di toluolo.

E' noto come la tossicità degli arsenobenzoli in soluzione aumenti rapidamente, se esposta all'aria.

Morrel e Chapman ⁽⁹⁾ hanno riscontrato per il ratto un aumento di tossicità di circa il 56 % dopo solo 25 minuti di esposizione all'aria. Wien ⁽¹⁾ ⁽⁴⁾, sperimentando su topi, ha notato un aumento di tossicità di circa il 17,5 % dopo 15 minuti di esposizione all'aria. Per questo tutti i ricercatori hanno escogitato, per proteggere la soluzione durante

il periodo delle inoculazioni endovenose, vari sistemi spesso però molto complicati e non alla portata di tutti i laboratori.

Abitualmente, nel controllo della tossicità di questi prodotti, si adopera l'accorgimento di Morrel e Chapman, che ho semplificato col seguente dispositivo. Con questo sono state praticate numerosissime iniezioni endo-

venose e si è potuto constatare che la soluzione è sufficientemente protetta per circa un'ora.

La sostanza rapidamente pesata su microbilancia, viene disciolta in un cilindro tarato, sterile ed asciutto nella quantità voluta di acqua bidistillata di recente, e portata in un piccolo matraccio sterile che subito si chiude con un tappo di gomma a tre vie, che porta in uno dei fori un imbutino di vetro, nell'altro una canna di vetro, previamente sterilizzata, che va a pescare nella soluzione (vedi fig. 1). In A si versa dolcemente dell'olio di vasellina purissi-

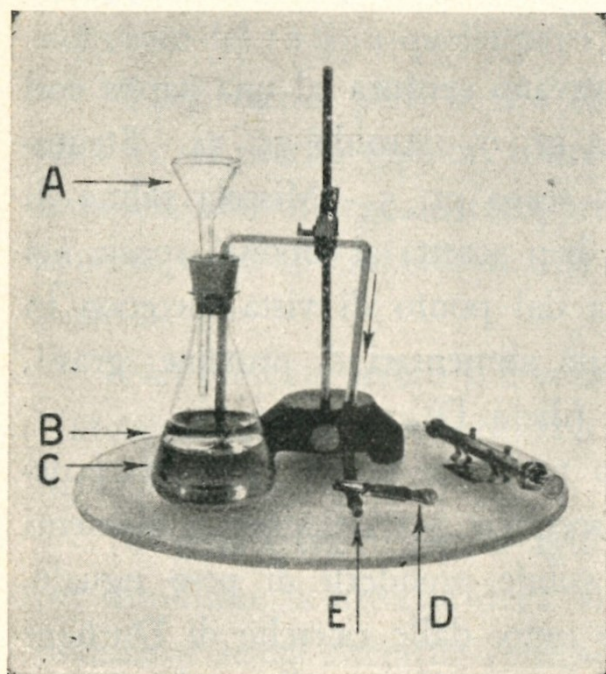


FIG. 1.

mo B che si stratifica sulla soluzione C, mentre l'aria fuoriesce dal terzo foro del tappo. Così la soluzione rimane sempre protetta dallo strato di olio.

Aperto il morsetto D, si aspira con una siringa, innestata in E, la quantità di liquido voluto; quindi, chiuso il morsetto D, si toglie la siringa a cui si innesta un ago molto sottile e si esegue la inoculazione endovenosa.

Subito dopo l'iniezione, veniva messo di nuovo il cibo nei recipienti, e gli animali erano tenuti in osservazione per cinque giorni. Si teneva conto per il calcolo della mortalità, degli animali la cui autopsia metteva macroscopicamente in evidenza lesioni renali, epatiche evidenti o tali da poter escludere che la morte fosse dovuta ad altra causa.

I risultati, come mostra il grafico riassuntivo (fig. 2), sono stati interessanti.

Nelle seguenti tabelle sono riportati, raggruppati, i protocolli delle diverse esperienze.

TABELLA I.

Topo ♂ a Dieta A	Peso in grammi	Soluz. 0,40 % cc. inoculati	Esito	Topo ♂ a Dieta A	Peso in grammi	Soluz. 0,40 % cc. inoculati	Esito
1	25,1	1,25	Muore	20	23,8	0,85	Vive
2	20,6	1,03	"	21	17	1,19	"
3	23,1	1,15	Vive	22	18,7	0,93	"
4	20,7	1,03	"	23	18,5	0,92	Muore
5	18,7	0,93	Muore	24	26,8	1,34	"
6	24,1	1,20	Vive	25	25,8	1,29	"
7	22,1	1,10	Muore	26	14,3	0,71	Vive
8	25	1,25	Vive	27	23,6	1,18	"
9	23,2	1,16	"	28	28,4	1,42	Muore
10	21	1,05	"	29	16,8	0,84	"
11	21	1,05	"	30	24,4	1,22	"
12	26	1,30	Muore	31	18	0,90	Vive
13	23,7	1,18	"	32	18	0,90	Muore
14	16,8	0,84	"	33	18	0,90	Vive
15	19,5	0,97	Vive	34	23,6	1,18	"
16	17,1	0,85	"	35	22	1,10	"
17	18,7	0,93	"	36	19	0,95	"
18	16,6	0,83	Muore	37	24	1,20	Muore
19	25,5	1,27	"	38	16,7	0,83	"

TABELLA I-a.

Topo ♂ a Dieta A	Peso in grammi	Soluz. 0,80 % cc. inoculati	Esito	Topo ♂ a Dieta A	Peso in grammi	Soluz. 0,80 % cc. inoculati	Esito
39	24,1	1,20	Muore	47	26	1,30	Muore
40	22,3	1,12	"	48	20	1,—	"
41	17	0,85	"	49	22	1,10	"
42	23,5	1,17	"	50	20	1,—	"
43	19	0,95	"	51	20	1,—	"
44	22,5	1,12	"	52	18	0,90	"
45	18	0,90	"	53	18	0,90	"
46	20	1,—	"				

TABELLA II.

Topo ♂ a Dieta B	Peso in grammi	Soluz. 0,40 % cc. inoculati	Esito	Topo ♂ a Dieta B	Peso in grammi	Soluz. 0,40 % cc. inoculati	Esito
54	18	0,90	Vive	62	18	0,90	Vive
55	17,20	0,86	"	63	23,2	1,16	"
56	16,4	0,82	Muore	64	21,8	1,09	"
57	19,5	0,97	"	65	24,5	1,22	"
58	17	0,85	"	66	18,6	0,93	Muore
59	19	0,95	"	67	17	0,85	Vive
60	15,5	0,77	Vive	68	20	1,—	Muore
61	21	1,05	"	69	17,8	0,89	Vive

TABELLA II-a.

Topo ♂ a Dieta B	Peso in grammi	Soluz. 0,80 % cc. inoculati	Esito	Topo ♂ a Dieta B	Peso in grammi	Soluz. 0,80 % cc. inoculati	Esito
70	22	1,10	Muore	76	19	0,95	Muore
71	20	1,—	"	77	23	1,15	"
72	18	0,90	"	78	18	0,90	"
73	24	1,20	"	79	20	1,—	"
74	23	1,15	"	80	16	0,80	"
75	21	1,05	"	81	22	1,10	"

TABELLA III.

Topo ♂ a Dieta C	Peso in grammi	Soluz. 0,40 % cc. inoculati	Esito	Topo ♂ a Dieta C	Peso in grammi	Soluz. 0,40 % cc. inoculati	Esito
82	15,8	0,79	Vive	94	17,4	0,87	Vive
83	16	0,80	"	95	15,7	0,78	"
84	22	1,10	"	96	15,5	0,77	"
85	16,9	0,83	Muore	97	17	0,85	Muore
86	16,5	0,82	Vive	98	22,5	1,12	"
87	19,7	0,98	"	99	17,4	0,87	Vive
88	22	1,10	"	100	19,4	0,97	Muore
89	25,7	1,28	"	101	21	1,05	Vive
90	19	0,95	"	102	24,2	1,21	"
91	23,1	1,16	"	103	17	0,85	"
92	21,3	1,07	"	104	22,6	1,13	"
93	24,1	1,20	"	105	21,3	1,07	"

TABELLA III-a.

Topo ♂ a Dieta C	Peso in grammi	Soluz. 0,80 % cc. inoculati	Esito	Topo ♂ a Dieta C	Peso in grammi	Soluz. 0,80 % cc. inoculati	Esito
106	14	0,70	Muore	110	20	1,—	Muore
107	22	1,10	"	111	25	1,25	"
108	15	0,75	"	112	30	1,50	"
109	18	0,90	"	113	22	1,10	"

TABELLA IV.

Topo ♂ a Dieta D	Peso in grammi	Soluz. 0,40 % cc. inoculati	Esito	Topo ♂ a Dieta D	Peso in grammi	Soluz. 0,40 % cc. inoculati	Esito
114	24,5	1,22	Vive	123	22	1,10	Vive
115	26	1,30	"	124	20	1,—	"
116	25	1,25	"	125	22,5	1,12	"
117	27,5	1,37	"	126	23,2	1,16	"
118	22,5	1,12	Muore	127	21,7	1,09	"
119	22,4	1,12	Vive	128	19,5	0,92	"
120	23,8	1,19	"	129	29,4	1,47	"
121	16	0,80	Muore	130	16,8	0,84	"
122	18	0,90	Vive				

TABELLA IV-a.

Topo ♂ a Dieta D	Peso in grammi	Soluz. 0,80 % cc. inoculati	Esito	Topo ♂ a Dieta D	Peso in grammi	Soluz. 0,80 % cc. inoculati	Esito
131	16	0,80	Muore	135	18	0,90	Muore
132	18	0,90	"	136	18	0,90	"
133	20	1,—	"	137	24	1,20	"
134	22	1,10	"				

CONCLUSIONI.

Dall'esame delle tabelle I, II, III, IV, e dal grafico (fig. 2) che, nei riguardi della percentuale di mortalità, ne riassume i risultati per la dose di gr. 0,20/Kg., si rileva come la dieta D, dieta armonica, ricca di vitamine, proteine, grassi, carboidrati e minerali dia la più bassa percentuale di mortalità; questo dato concorda con le ricerche degli altri Autori.

Pure bassa è la percentuale di mortalità osservata con la dieta a base di fegato crudo (dieta C). Viceversa molto più elevata è stata la mortalità con dieta a base di carne (dieta B). Confrontando la composizione della dieta D con quella C si può osservare che quest'ultima ha, nei confronti della prima, una evidente deficienza di grassi, ma soprattutto di idrati di carbonio i quali, secondo le ricerche di Pranter (¹⁰), esercitano un'azione favorevole sulla capacità disintossicante dell'organismo nei riguardi dei prodotti arsenobenzolici. L'Autore ha infatti osservato che il glucosio diminuisce la tossicità del Salvarsan. Volendo spiegare il meccanismo di questa azione, si è supposto che fosse dovuta a modificazioni della permeabilità della membrana cellulare con conseguente alterazione nell'assorbimento e nella eliminazione del farmaco.

Una deficienza di grassi e di idrati di carbonio pressochè uguale a quella della dieta a base di fegato (C) esisteva nella dieta a base di carne (B), colla quale però la mortalità dei topi fu notevolmente superiore.

Da questi risultati sperimentali sorge il quesito: quale fu o furono i fattori che differenziarono così, nei loro effetti, la dieta C da quella B,

tenuto anche conto della elevata tossicità, già nota, del preparato arsenobenzolico usato per le ricerche? Si può pensare subito al differente apporto quantitativo di vitamine, le quali, presenti in maggior copia nella dieta a base di fegato, hanno potuto compensare qualche possibile deficit, rialzando così il potere di resistenza dell'organismo.

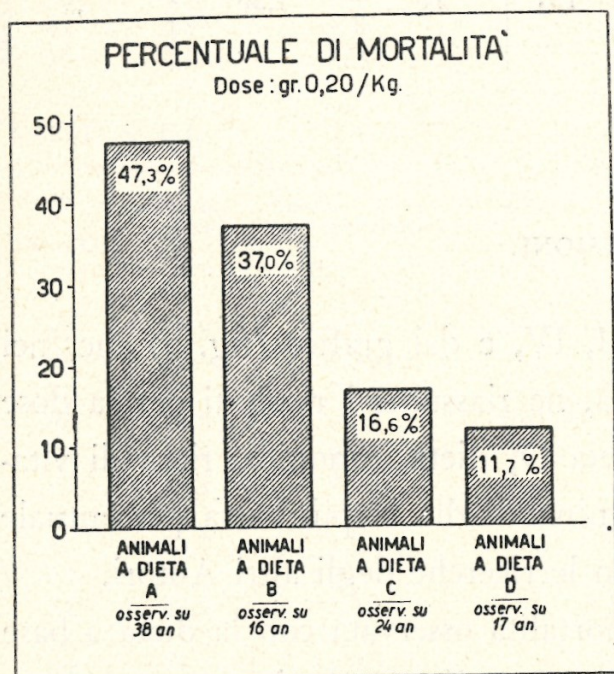


FIG. 2.

Ma si può anche pensare alla esistenza di un qualche fattore specifico del fegato, assente nei muscoli. Ed infatti ad una condizione particolare, intrinseca del fegato, è facile rivolgere l'attenzione tenendo conto del fatto che dagli Autori giapponesi, come si è già ricordato, è stato isolato da questo organo un ormone specifico ad azione disintossicante, il quale, adoperato per iniezione sottocutanea, avrebbe aumentato la tolleranza agli arsenobenzoli.

Successive ricerche saranno da me rivolte a chiarire possibilmente a quale fattore, in prevalenza, si debba attribuire l'azione svolta dalla dieta « epatica » sulla resistenza alla intossicazione da arsenobenzolo.

Inoltre l'esame delle tabelle I-a, II-a, III-a, IV-a, dimostra che nessun regime alimentare ha potuto salvare da morte topolini iniettati con gr. 0,40/Kg. Questo risultato è evidentemente in relazione con il fatto che il preparato usato dava negli animali a dieta A evidentemente incompleta (tabella I), ben il 47,3 % di mortalità già alla dose di gr. 0,20/Kg.

Dalle suesposte ricerche sono emersi alcuni fatti che conducono a conclusioni pratiche importanti e sulle quali pertanto è opportuno richiamare l'attenzione.

Data la variabile resistenza degli animali agli arsenobenzoli in rapporto col regime dietetico, e poichè è impossibile che l'adattamento ad un

regime si compia nel breve tempo di poche ore (infatti alcune Farmacopee consigliano che gli animali debbano essere « ben nutriti il giorno che precede l'esperienza ») sarebbe opportuno che l'alimentazione prescelta fosse somministrata ai topolini almeno una settimana prima della inoculazione.

Data inoltre la variabile resistenza al prodotto tossico da parte di lotti di animali di diversa origine, o di lotti della stessa origine ma messi in esperimento in tempi diversi, sarebbe opportuno che ogni prova di controllo fosse eseguita in confronto con un prodotto campione previamente selezionato, ed usato contemporaneamente e con la stessa tecnica del prodotto in esame.

RIASSUNTO

L'Autore fa notare la grande importanza che assume il regime alimentare degli animali che servono per la determinazione della tossicità degli arsenobenzoli.

Dimostra come una dieta di pane, verdura e fegato crudo di cavallo diminuisca la percentuale di mortalità nei topolini inoculati con un arsenobenzolo tipo 914, rispetto ad una dieta di sola verdura e pane, o di verdura pane e carne (muscolo di cavallo). Ottiene la più bassa percentuale di mortalità con una dieta completa e bene equilibrata.

Descrive un semplice dispositivo per proteggere le soluzioni arsenobenzoliche dal contatto dell'aria.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WIEN - Quart. Journ. Pharm. Pharmacol., 8, 631 (1935); idem, 9, 48 (1936).
- (²) BEERMAN - Amer. J. Siph. Neurol., 18, 190 (1934).
- (³) CRAVEN - Bull. Johns Hopkins Hosp., 48, 131 (1931).
- (⁴) WIEN - Quart. J. Pharm. Pharmacol., 8, 631 (1935).
- (⁵) REBAUDI - Riforma Medica, 16 (1933); Rinnov. Medico, 5 (1933); Rinnov. Medico, 11 (1934).

- (⁶) SAVULESCU - Bull. Soc. Hop. Bucarest, 120 (1930).
(⁷) VARAV - Presse Médicale, 105, 2118 (1936).
(⁸) DURHAM, GADDUM and MARCHAL - Med. Res. Counc., Spec. Rep., Series 128 (1929).
(⁹) CHAPMAN and MORREL - J. Pharmacol., 48, 35 (1933).
(¹⁰) PRANTER - Wien. Klin. Wscht., 34, 183 (1921).
-