

6. - GLI EFFETTI DELLA DIETA LIPIDICA SULLA COAGULAZIONE DEL SANGUE (*)

E' stato affermato che la coagulazione del sangue è accelerata dall'ingestione di grassi (WALDRON, BEIDELMAN e DUNCAN, 1951; O'BRIEN 1955-1956; FULLERTON, DAVIS e ANASTASOPOULOS, 1953). O'BRIEN (1956) è giunto a dire che « è cosa accertata che un pasto a base di grassi accelera la coagulazione del sangue ». D'altra parte esistono anche opinioni contrarie (TULLOCH e WRIGHT 1954; MANNING e WALFORD 1954; HALL 1956). Il grasso alimentare è stato ritenuto un fattore importante nella genesi dell'ateroma (KEYS, 1952). E' stato anche affermato che la somministrazione di grassi contenenti grandi quantità di acidi grassi insaturi riduce il colesterolo del siero (KINSELL e MICHAELS 1955; MALMROS e WIGAND 1955; BRONTE STEWART, ANTONIS, EALES e BROCK 1956). Per queste ragioni ci è sembrato importante sottoporre ad una rivalutazione gli effetti della somministrazione di differenti tipi di grassi sulla coagulazione del sangue.

MATERIALE

Tutti i tests sono stati eseguiti su pazienti ricoverati. Si trattava di convalescenti da varie malattie — per lo più pazienti con ulcera peptica, ipertensione non complicata, malattie infettive (p. e. polmonite, pielite, meningite), malattie cutanee, cardiache e cerebrali (compreso l'ateroma). Sono stati esclusi pazienti con uremia, ittero, malattie del sangue o emorragiche, pazienti in trattamento con anticoagulanti o cortisone, o con scompenso cardiaco che non fosse molto lieve. Ai pazienti fu chiesto se si sentivano di prendere una colazione ad elevato o a basso contenuto in grassi. Quelli che acconsentivano furono assegnati a caso ad uno o all'altro gruppo.

(*) Conferenza tenuta nell'Aula Magna dell'Istituto Superiore di Sanità il 18 dicembre 1956.

METODI

Cibi somministrati:

Cibi poveri di grassi: questi consistevano in pane e marmellata, porridge, té e frutta. Furono permessi zucchero e latte scremato. Il contenuto in grassi era inferiore a 5 grammi.

Olio: Insieme alla colazione povera di grassi fu dato da bere ai pazienti dell'olio. Negli esperimenti in cui veniva determinato il consumo di protrombina in provette siliconate, furono usati 90 cm³ di una miscela di olio di semi di girasole e olio di *Clupea pilchardus* (numero di iodio 137). Negli altri esperimenti furono dati 120 cm³ di olio di semi di girasole (numero di iodio 128). Questi olii furono scelti soprattutto per il loro alto contenuto in acidi grassi insaturi.

Cibi ricchi di grassi: Negli esperimenti del consumo di protrombina, a 4 pazienti furono date 6 once di panna al 40% e a 3 pazienti 7 once di panna al 40% insieme ad una colazione povera di grassi. Ad altri 7 pazienti fu somministrata una colazione contenente 80 grammi di grassi (uova e pancetta, pane e burro e panna). In tutti gli altri esperimenti la dieta ricca di grassi conteneva almeno 100 grammi di grasso, il quale consisteva in pancetta grassa fritta con una o due uova, pane e burro, 60 cm³ di panna al 40% e 180 cm³ di latte. Ai pazienti che rifiutavano la pancetta per ragioni religiose, fu dato altro burro e uova. Ogni paziente fu sorvegliato attentamente per controllare che tutta la dieta venisse consumata. Qualcuno si rifiutò di continuare all'ultimo o agli ultimi due rotolini di burro!

Per quanto fu possibile, fu studiato nello stesso giorno un ugual numero di pazienti per ciascuno dei tre gruppi dietetici (di solito due per ogni gruppo).

PRELEVAMENTO DEL SANGUE

Tutti i pazienti erano digiuni dalle 8,30 della sera; i campioni di sangue a digiuno furono raccolti tra le 8 e le 9 del giorno seguente. Fu quindi somministrato il cibo, e poi null'altro finchè non fu prelevato l'ultimo campione di sangue.

Negli esperimenti per il consumo della protrombina furono impiegati aghi calibro 20 e siringhe completamente di vetro, sterilizzate a secco. Negli altri esperimenti non furono usate siringhe, ma soltanto aghi calibro 18, e il sangue sgorgante spontaneamente venne raccolto diretta-

mente nella provetta. Il sangue ottenuto con punture imperfette non venne usato.

TESTS DI COAGULAZIONE

a) Tempo di coagulazione secondo LEE e WHITE in provette siliconate:

Sei provette siliconate ($3'' \times 3/8''$) venivano riempite rapidamente con 1 cm^3 di sangue. Le provette venivano lasciate a sé per 10 minuti e quindi scosse leggermente ogni minuto. Come punto finale della coagulazione fu considerato quello in cui si poteva capovolgere completamente la provetta. Il tempo di coagulazione di cui si teneva conto era la media dei tempi di coagulazione delle provette sottoposte alle scosse periodiche.

b) Tempo di coagulazione del plasma citrato ricalcificato (« calcium time »).

Il plasma veniva ottenuto mediante aggiunta di citrato di sodio al 3,8% (una parte su dieci di sangue) e centrifugazione a diverse velocità. Si aveva così:

Plasma centrifugato a bassa velocità: 1500 g.p.m. per 10 minuti.

Plasma centrifugato ad alta velocità: 3000 g.p.m. per 45 minuti.

Plasma centrifugato ad altissima velocità: questo fu ottenuto dal plasma centrifugato a bassa velocità per mezzo di una centrifugazione a 15000 g.p.m. per 15 minuti. Il plasma veniva quindi ricalcificato con un ugual volume di cloruro di calcio m/40. Quattro provette venivano usate per ogni test, e si teneva conto della media.

c) Consumo di protrombina.

Questo veniva determinato sul siero ottenuto dalle provette impiegate per la prova di Lee e White e sul plasma citrato ricalcificato secondo la tecnica descritta precedentemente (MERSKEY, 1950). I risultati venivano espressi sotto forma di indice, come segue: Indice di consumo di

$$\text{protrombina (P.C.I.)\%} = \frac{\text{tempo di protrombina del plasma}}{\text{tempo di protrombina del siero}} \times 100$$

d) Formazione della trombina in provette siliconate.

Questo test fu effettuato su singoli campioni di plasma centrifugato ad alta velocità secondo il metodo descritto da O'BRIEN (1955). In questa prova si indica come tempo di fibrinogeno il più breve tempo di coagulazione ottenuto per ogni campione di fibrinogeno. Il tempo di for-

mazione della trombina è l'intervallo che passa tra la ricalcificazione del plasma e la coagulazione nei campioni di fibrinogeno.

e) Formazione della tromboplastina ematica.

Questo test fu effettuato secondo la tecnica descritta da BIGGS e MACFARLANE (1953). Tre componenti sono necessari per questo test e cioè piastrine, plasma adsorbito (« alumina plasma ») e siero. A due di questi componenti, ottenuti da pazienti a digiuno, furono aggiunti campioni del terzo componente, ottenuti sia a digiuno che dopo i pasti.

1) Piastrine: vennero esaminati quattro campioni di piastrine per ciascuna di queste due condizioni, e cioè a digiuno e dopo il pasto.

2) Plasma adsorbito: fu esaminato plasma adsorbito nelle diluizioni 1:5 e 1:25, ottenuto da tre campioni di ciascun tipo di sangue.

3) Siero: il siero fu ottenuto da 18 pazienti a digiuno. A 9 di questi pazienti fu somministrata una dieta povera di grassi e agli altri 9 una dieta ricca di grassi. Il siero fu ottenuto quattro ore più tardi, e conservato a 37°C per 24 ore, diluito 1:10 con soluzione fisiologica e conservato a -20°C fino al momento della prova.

f) Il fattore V veniva determinato in base alla variazione del tempo di protrombina in un solo stadio dovuta all'azione di plasma citrato diluito 1:10 e 1:50 su plasma umano ossalato e invecchiato.

Per lo studio del fattore V furono esaminati campioni di plasma di pazienti del gruppo a dieta povera di grassi, a dieta povera di grassi più olio e a dieta ricca di grassi.

g) Il fattore VII veniva determinato sul plasma e sul siero mediante il metodo di KOLLER, LOELIGER e DUCKERT (1954). Il siero venne preparato come per il test di formazione della tromboplastina.

h) Tempo di protrombina accelerato in un solo stadio (tempo di « stypven »). Veniva usato veleno di vipera Russel (« stypven ») diluito 1:20.000. Si mescolavano in parti uguali plasma centrifugato ad alta velocità (o plasma diluito 1:4 con soluzione fisiologica allo 0,85%), soluzione fisiologica, stypven e calcio m/40, e venivano registrati i tempi di coagulazione. Il calcio veniva aggiunto un minuto dopo che lo stypven era stato mescolato con il plasma. Per ciascun gruppo di esperimenti eseguiti su sangue prelevato a digiuno e dopo il pasto, veniva diluita una bottiglia differente di stypven (proveniente dallo stesso lotto), in quanto lo stypven diluito sembra perdere d'attività anche se conservato a 4°C. Tutte le prove vennero eseguite in doppio. Tutte le prove di coagulazione furono eseguite a 37°C.

I tempi di coagulazione venivano registrati da personale tecnico, che era, per quanto possibile, all'oscuro dei risultati che potevano derivare da ciascun esperimento. Per ciascuna prova di ciascun paziente, i campioni di sangue a digiuno e quelli successivi venivano esaminati dallo stesso tecnico.

ANALISI STATISTICA

Venne valutata la significanza delle modificazioni della coagulabilità del sangue per mezzo del test t di Student e fu attribuito un grado di probabilità ai risultati di ciascun esperimento e a ciascun metodo di valutazione della coagulabilità.

La significanza fu misurata in due modi.

Nel primo, ogni serie veniva considerata come un unico esperimento di osservazioni accoppiate e un unico valore veniva ottenuto dalla differenza tra i campioni prelevati a digiuno e dopo il pasto. Il valore t veniva calcolato dalla formula

$$t = \bar{x} \sqrt{\frac{n(n-1)}{\sum x^2 - \frac{\sum x^2}{n}}}$$

in cui $x_1 x_2 x_3 \dots x_n$ sono i valori delle differenze tra i campioni prelevati a digiuno e quelli prelevati dopo il pasto in ciascun paziente, n è il numero delle osservazioni abbinate, $\bar{x}$ è la differenza media

$$[\bar{x} = \frac{1}{n} \sum (p.p - d.p.)] (*)$$

Da questo valore per t , è stato ricavato un grado di significanza indicato con P_1 , che esprime la probabilità che la media delle differenze non sia sensibilmente differente da zero.

Nel secondo caso venivano confrontate le differenze medie tra le osservazioni abbinate per i pazienti tenuti a dieta ricca di grassi o a dieta priva di grassi più olio, con le differenze medie per i pazienti tenuti a dieta povera di grassi. Il valore di t venne calcolato per mezzo della formula

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

(*) p.p. = valori ottenuti dai campioni prelevati a digiuno.
d.p. = valori ottenuti dai campioni prelevati dopo il pasto.

in cui $\bar{x}_1$ è la differenza media delle serie con grasso o con olio e $\bar{x}_2$ la differenza media delle serie a dieta povera di grasso, e s_1 e s_2 la varianza rispettiva della serie indicata dall'indice.

Da questo valore di t fu ottenuto un grado di significanza, indicato con P_2 , che esprime la probabilità che le differenze nelle serie a dieta ricca di grassi o povera di grassi più olio siano tratte dalla stessa popolazione di differenze incontrate nella serie a dieta povera di grassi. Questo dato è sembrato un mezzo valido per confrontare i valori, in quanto non c'era alcun criterio sicuro per raggruppare il tipo di pasto per ciascun paziente.

P_2 prende quindi in considerazione qualunque effetto di un pasto di controllo e la varianza di una controllata serie di osservazioni. E' un test molto più sicuro di significanza e può tener conto di un gran numero di circostanze non controllate altrimenti. Si può obiettare che, dove nelle serie di controllo dei campioni pre- e postprandiali non sono risultate differenze significative, queste avrebbero dovuto essere trascurate. E' un'obiezione valida, e per questa ragione sono stati riportati i valori di P_1 e P_2 .

Un valore di P inferiore a 0,05 è stato scelto come grado minimo di significanza.

RISULTATI

a) Tempo di coagulazione del sangue secondo Lee e White in provette siliconate.

I risultati di questa prova sono indicati nella tabella 1.

TABELLA 1

Tempo di coagulazione del sangue in toto secondo Lee e White in provette siliconate (in minuti)

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	25		26		25	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media	33,6	33,4	32,3	29,1	33,6	33,6
P_1	0,8		0,03		> 0,9	
P_2	—		> 0,1		> 0,9	

Le modificazioni determinate dall'olio appaiono significative per il P_1 , ma il P_2 per l'olio non è significativo.

b) Tempo di ricalcificazione (« calcium time ») del plasma.

I risultati di queste prove sono indicati nelle tabelle 2, 3, 4.

Non sono state osservate modificazioni significative nel gruppo dei soggetti trattati con diete povere o ricche di grasso. L'olio sembra deter-

TABELLA 2

Tempo di coagulazione del plasma ricalcificato centrifugato a bassa velocità in provette di vetro (in secondi)

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	25		26		25	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media . . .	154,0	142,2	145,8	149,8	150,9	141,8
P_1	> 0,05		0,5		0,2	
P_2	—		> 0,5 (aumento)		> 0,7	

TABELLA 3

Tempo di coagulazione del plasma ricalcificato centrifugato ad alta velocità in provette siliconate (in secondi)

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	21		20		21	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media . . .	302,0	280,1	315,2	363,2	287,3	302,9
P_1	0,3		0,02 (aumento)		0,6	
P_2	—		< 0,02 (aumento)		> 0,2	

TABELLA 4

Tempo di coagulazione del plasma ricalcificato centrifugato ad altissima velocità in provette di vetro (in secondi)

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	25		26		25	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media	220	213,2	208,1	181,4	215,5	199,3
P ₁	0,4		0,03		0,2	
P ₂	—		> 0,1		> 0,4	

minare un prolungamento del tempo di coagulazione del plasma centrifugato ad alta velocità in provette siliconate e una diminuzione del tempo nei campioni ottenuti per centrifugazione ad altissima velocità in provette di vetro! P₂ è significativo nel primo gruppo, ma non nel secondo.

A questo punto è sembrato che gran parte delle nostre difficoltà nell'ottenere risultati significativi risiedesse nelle variazioni molto estese tra i risultati dei singoli tests. Per questa ragione abbiamo provato a misurare i tempi di coagulazione secondo Lee e White in 20 provette invece di 6 e il tempo di ricalcificazione nel plasma centrifugato ad altissima

TABELLA 5

Tempo di coagulazione del sangue in toto secondo Lee e White in provette siliconate (in minuti). Per ogni test si usarono 20 provette.

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	12		12		14	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media	37,7	34,9	40,1	33,1	35,9	40,1
P ₁	> 0,2		< 0,02		> 0,1	
P ₂	—		> 0,2		> 0,5	

velocità in 16 provette invece di 4. Furono esaminati altri 38 pazienti, aumentando il numero delle provette impiegate sia prima sia dopo il pasto. I risultati sono indicati nelle tabelle 5 e 6.

TABELLA 6

Tempo di coagulazione del plasma ricalcificato centrifugato ad altissima velocità in provette di vetro (in secondi). Per ogni test si usarono 16 provette.

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	12		12		14	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media . . .	306,8	350,3	351,1	342,4	338,6	324,9
P ₁	> 0,1		> 0,7		> 0,8	
P ₂	—		> 0,2		> 0,2	

Si può vedere come nella tabella 5 il valore di P₁ è ancora significativo per l'olio, mentre P₂ non è significativo. Il pasto ricco di grassi non determina un effetto significativo nella tabella 5, e non ci sono differenze significative nella tabella 6.

I risultati indicati nelle tabelle 1 e 5 sono stati combinati, come pure quelli delle tabelle 4 e 6, e questi risultati combinati sono stati riportati nelle tabelle 7 e 8, rispettivamente. In queste tabelle combinate sono ri-

TABELLA 7

Tempo di coagulazione del sangue in toto secondo Lee e White in provette siliconate (in minuti). Questa tabella contiene i risultati combinati delle tabelle 1 e 5.

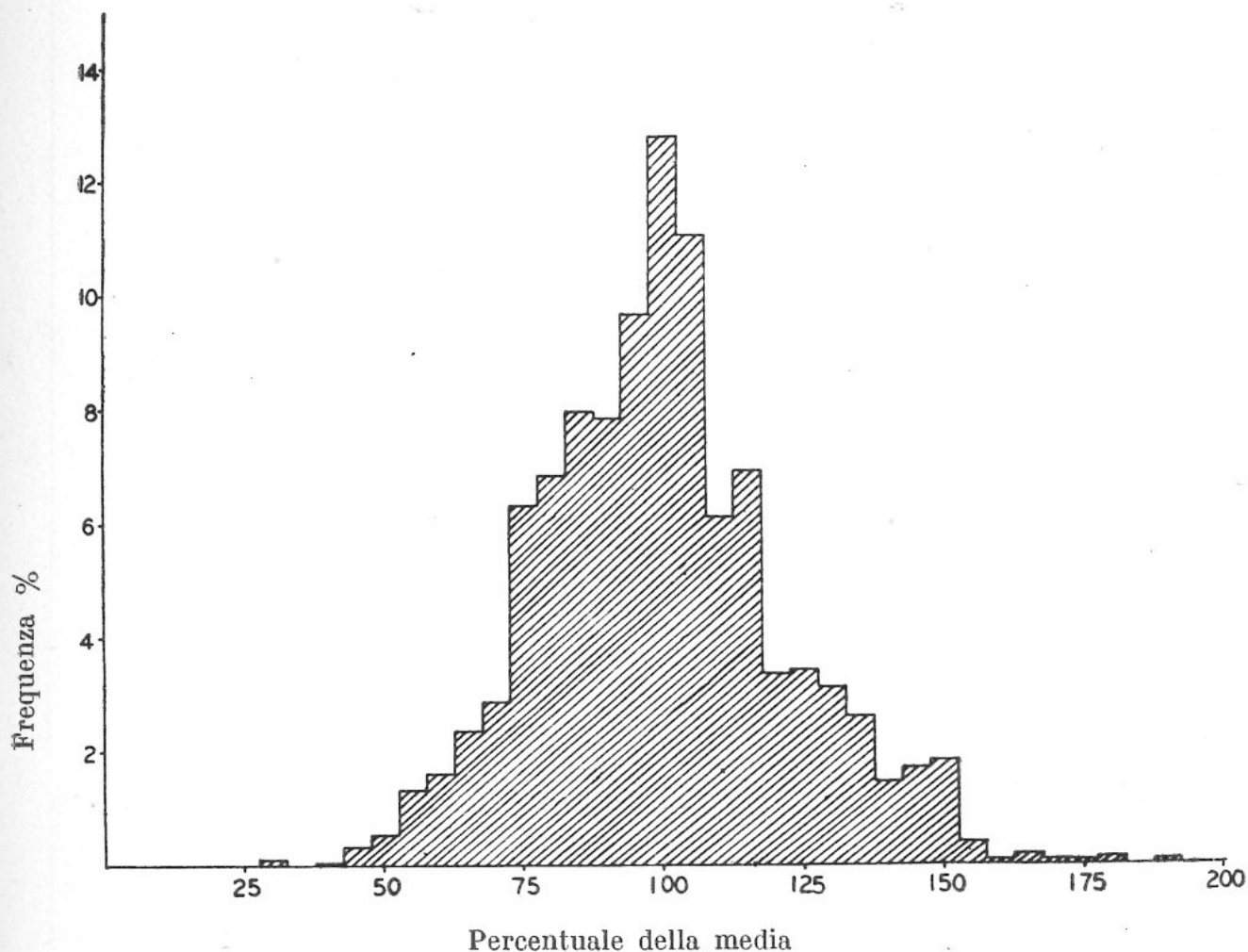
Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	37		38		39	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media . . .	34,9	34,0	34,3	30,5	34,4	35,7
P ₁	> 0,4		< 0,01		> 0,4	
P ₂	—		> 0,1		> 0,3	

TABELLA 8

Tempo di coagulazione del plasma ricalcificato centrifugato ad altissima velocità in provette di vetro. Questa tabella contiene i risultati combinati delle tabelle 4 e 6.

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	37		38		39	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media	247,6	257,5	253,2	232,2	259,4	247,9
P ₁	0,4		> 0,05		> 0,9	
P ₂	—		> 0,05		> 0,1	

Fig. 1.



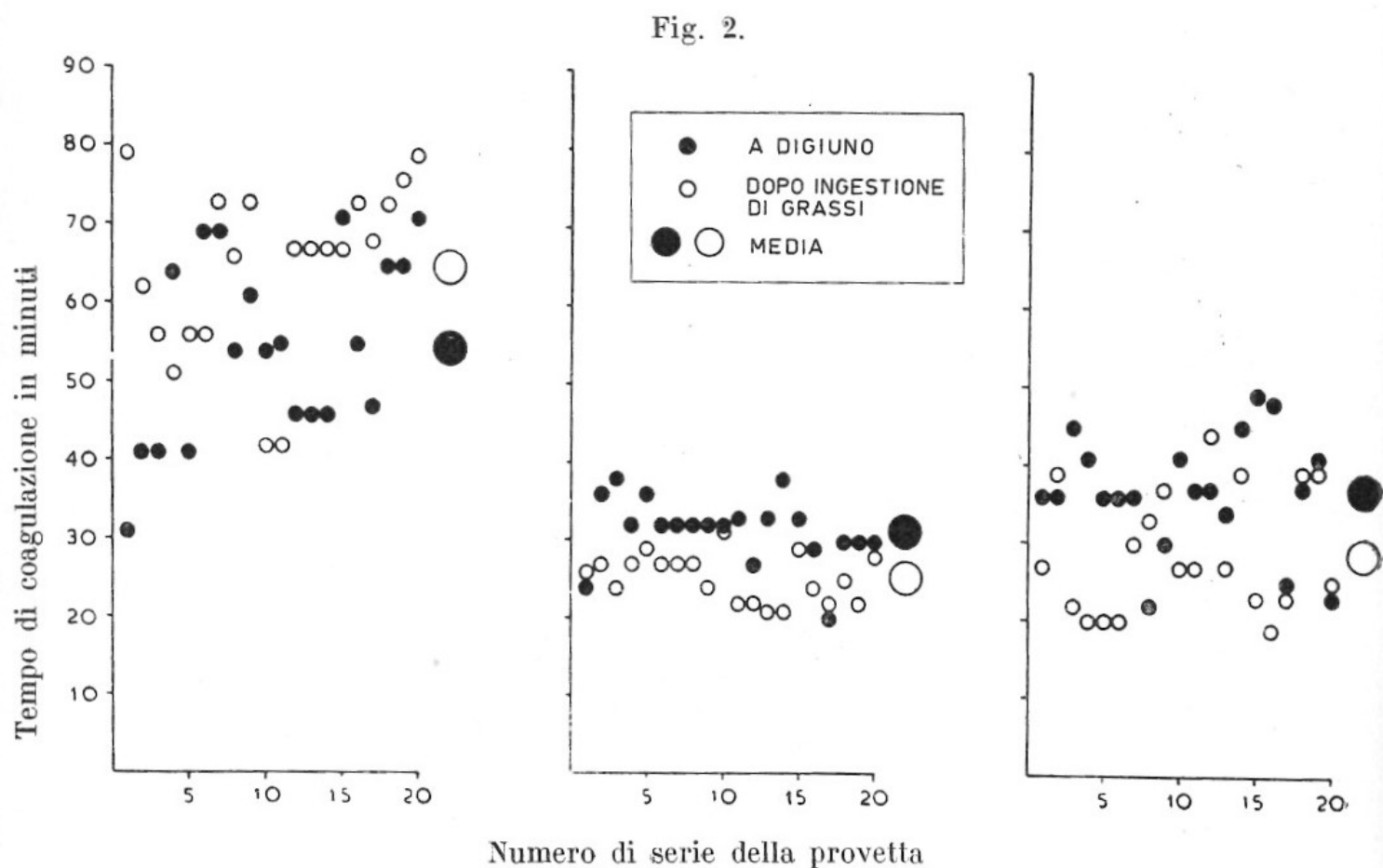
portate le medie delle prove con 6 e 20 provette per il tempo di coagulazione secondo Lee e White (o delle prove con 4 e 16 provette per il tempo di ricalcificazione).

Ancora una volta l'olio sembra determinare una diminuzione significativa del tempo di coagulazione secondo Lee e White, quando viene considerato P_1 da solo. Il valore di P_2 non è significativo. Non ci sono variazioni significative del tempo di ricalcificazione.

Per dimostrare l'ampia variabilità nelle singole provette nella determinazione del tempo di coagulazione secondo Lee e White, è stato costruito un diagramma in base a tutti i valori ottenuti nelle singole letture del test delle 20 provette (figura 1). La media delle 20 provette è stata presa come la media reale e ciascun valore delle singole provette è espresso come percentuale di questa media.

In questa serie di 1520 provette, il 25,9% dei valori riscontrati era compreso fra il 95-105% del valore medio.

Un altro metodo per dimostrare l'estrema variabilità nelle differenti provette è indicato nella figura 2. Sono riportati i singoli valori delle



provette in tre casi. Ciascuna delle 20 provette è stata registrata separatamente prima e dopo una dieta ricca di grassi. Si può vedere come la variazione non sia dovuta all'ordine di riempimento delle provette, ma a variazioni delle singole provette. Si può vedere facilmente come i ri-

sultati possono variare entro limiti molto estesi, a secondo della provetta o delle provette che sono state scelte a caso. Il primo diagramma nella figura 2 indica un'ampia variabilità, il secondo è il migliore che siamo riusciti ad ottenere e il terzo è di tipo intermedio.

c) Consumo di protrombina.

I risultati delle prove del consumo di protrombina sono indicati nelle tabelle 9 e 10.

TABELLA 9

Indice % del consumo di protrombina del sangue in toto coagulato in provette siliconate.

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	7		7		14	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media . . .	60,0	75,9	67,6	78,0	50,1	77,3

TABELLA 10

Indice % del consumo di protrombina del plasma ricalcificato centrifugato ad altissima velocità in provette di vetro.

Dieta	Povera di grassi		Ricca di grassi	
Numero dei pazienti	14		15	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media . . .	64,5	76,8	66,6	60,7
P ₁	> 0,1		> 0,3	
P ₂	—		> 0,05	

La quantità di protrombina residua è elevata in tutti questi tests. Il plasma lipemico non sembra consumare maggiore quantità di protrombina durante la coagulazione rispetto ai campioni di controllo.

d) Formazione della trombina in provette siliconate.

I risultati di questa prova sono indicati nella tabella 11. Le medie di tutti i tests sono state combinate nella figura 3.

Fig. 3.

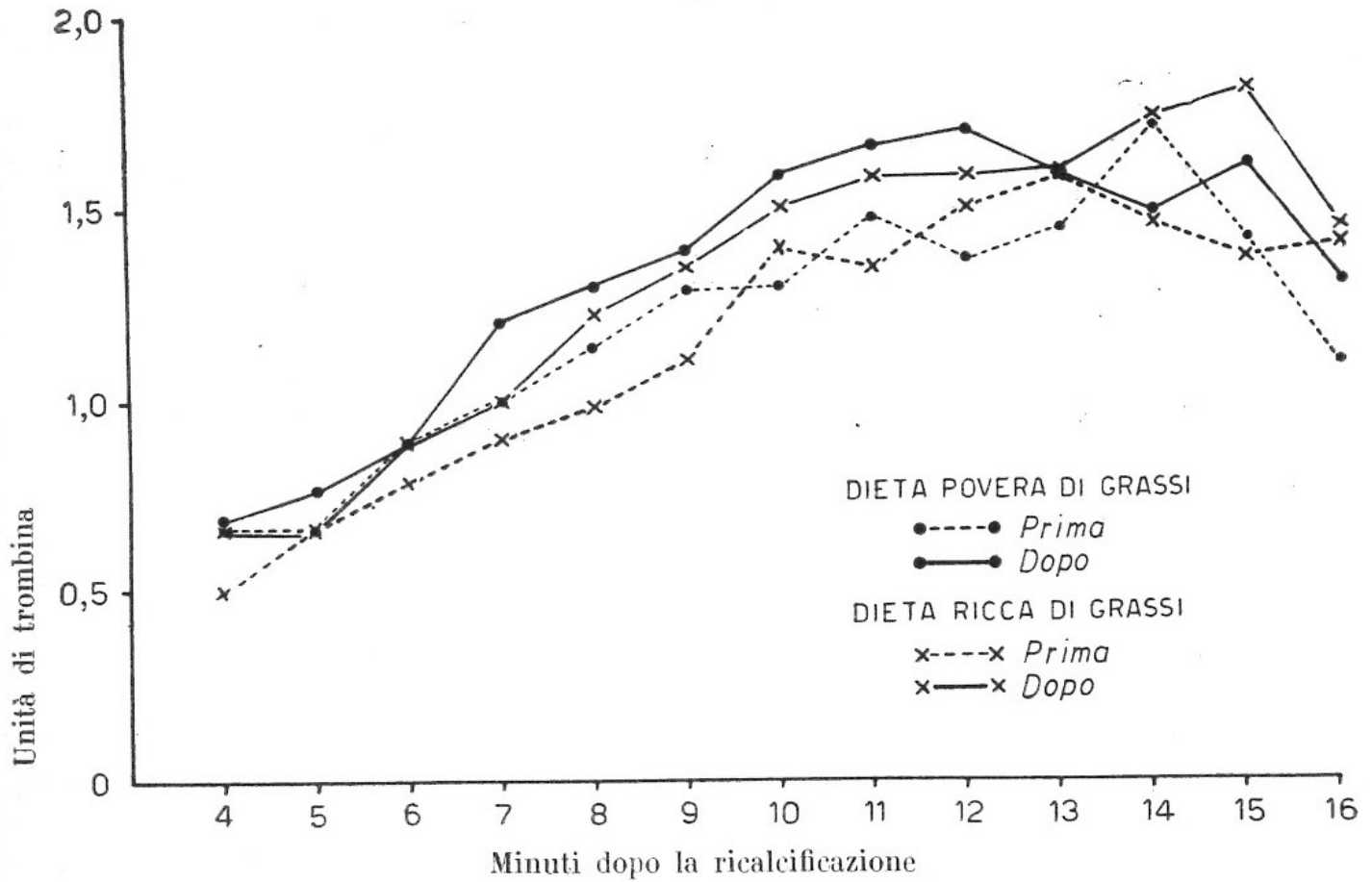


TABELLA 11

Test di formazione della trombina del plasma ricalcificato centrifugato ad alta velocità in provette siliconate.

Dieta	Tempo di formazione dalla trombina (in minuti)				Tempo di fibrinogeno (in secondi)			
	Povera di grassi		Ricca di grassi		Povera di grassi		Ricca di grassi	
Numero dei pazienti	11		12		11		12	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
Media	12,4	14,1	13,8	13,8	55,0	50,8	51,8	47,4
P ₁	0,3		> 0,9		0,4		0,2	
P ₂	—		> 0,3		—		> 0,9	

Non sono state osservate differenze significative in nessuna delle serie esaminate.

e) Formazione della tromboplastina ematica.

Non hanno potuto essere dimostrate differenze di attività tra piastrine, plasmi adsorbiti (« alumina plasma »), o siero ottenuti da sangue a digiuno o lipemico.

f) Fattore V. Non sono state trovate differenze significative di attività del fattore V nei tre gruppi di pazienti esaminati.

g) Fattore VII. Non sono state trovate differenze significative di attività del fattore VII nei due gruppi di pazienti esaminati.

h) Tempi di stypven:

I risultati di questo test sono indicati nella tabella 12.

TABELLA 12

Tempi di protrombina accelerati in un tempo (tempo di stypven) del plasma centrifugato ad alta velocità in provette siliconate.

Dieta	Povera di grassi		Con olio		Ricca di grassi	
N. dei pazienti	21		22		22	
	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore	a digiuno	dopo 4 ore
	Plasma non diluito					
Media	28,5	27,9	29,5	29,6	28,8	25,9
P ₁	> 0,5		> 0,9		0.01	
P ₂	—		> 0,6		> 0.05	
	Plasma diluito					
Media	47,1	46,4	46,7	40,6	44,4	38,3
P ₁	> 0,6		< 0,01		< 0,01	
P ₂	—		0,02		0,05	

Si può vedere come P_1 fosse significativo con la dieta ricca di grassi, sia per il plasma diluito sia per quello non diluito, e lo fosse anche per la dieta con l'olio per il plasma diluito. Prendendo in considerazione P_2 , erano significativi i valori della dieta ricca di grasso e della dieta con l'olio nel plasma diluito, ma non nel plasma non diluito. Non soltanto i risultati finali erano significativi, ma c'era anche una considerevole costanza nei risultati, in quanto il plasma lipemico per grasso o olio aveva quasi invariabilmente un tempo di stypven più breve del plasma a digiuno. Questi risultati concordanti erano in marcato contrasto con i risultati incostanti e fortemente variabili ottenuti in tutti gli altri tests usati in questa serie di ricerche.

DISCUSSIONE.

I risultati riportati in questo lavoro non confermano le affermazioni secondo le quali l'ingestione di grassi misti animali e vegetali accelera la coagulazione. Salvo poche eccezioni, sono stati ottenuti risultati non costanti con tutti i tests usati, all'infuori di quelli in cui venne determinato il tempo di stypven.

Alcuni Autori presentano i risultati di tutti questi tests di coagulazione in percentuali della norma e parlano di « coagulabilità globale ». Questo vorrebbe probabilmente significare l'aggiunta dell'effetto del grasso e dell'olio nel test del tempo di stypven, in cui i risultati sembrano significativi, a tutti gli altri tests (in cui i risultati sono in genere non significativi). Questo, secondo il nostro punto di vista, confonderebbe i risultati e non aggiungerebbe nulla al valore di queste prove.

E' possibile che la nostra scelta di campioni « lipemici » quattro ore dopo l'ingestione di grasso non determini in realtà il grado più alto di effetto del grasso. Ignorando per il momento l'aspetto tecnico, è possibile che campioni prelevati ogni ora avrebbero potuto rivelare modificazioni della coagulazione. Un grande numero di campioni di plasma prelevati dopo 4 ore era macroscopicamente lipemico e i tests della coagulazione erano, in questi campioni, poco differenti da quelli che non erano manifestamente lipemici. Sia FULLERTON e coll. (1953) sia O'BRIEN (1955) affermano di aver osservato un'accelerazione della coagulazione a questa ora dopo il pasto. Noi abbiamo l'impressione che questa scelta del campione a quattro ore di intervallo non possa spiegare la mancata dimostrazione di modificazioni della coagulazione del sangue dopo ingestione di grassi.

Tutti i nostri tests sono stati eseguiti su pazienti ricoverati in ospedale. Parecchi altri ricercatori hanno usato individui sani. Non possiamo

negare la possibilità che questo fatto spieghi la mancata dimostrazione da parte nostra di un effetto sulla coagulazione, ma lo consideriamo molto improbabile. Noi ci siamo preoccupati di limitarci a pazienti convalescenti e di evitare quelli le cui malattie sono notoriamente associate ad una coagulazione anormale o ad uno stato emorragico. Potrebbe venir obiettato che era molto più importante vedere se il grasso accelera la coagulazione in soggetti malati più che in soggetti sani. Noi consideriamo anche questo fattore come poco importante con ogni probabilità.

Escludendo per il momento la tabella 12, si può vedere che in due tests, il tempo di coagulazione secondo Lee e White (tabelle 1, 5, 7) e il tempo di ricalcificazione (tabella 4), ci sono state significative diminuzioni nel caso della dieta con olio. In un altro test del tempo di ricalcificazione (tabella 3) vi è stato un significativo prolungamento. All'infuori dell'ultima eccezione, queste significanze sono venute meno quando noi abbiamo tenuto conto delle modificazioni occorse nella serie della dieta a basso contenuto di grassi. Se noi ignoriamo P_2 , potremmo concludere che l'ingestione di elevate quantità di grasso non ha effetto sulla coagulazione, mentre l'ingestione d'olio ne può avere. P_2 non modifica la conclusione generale cui si è giunti nella tabella 12.

Abbiamo l'impressione che troppo poca attenzione sia stata dedicata in passato ai fattori che possono influire sul tempo di coagulazione. Questi fattori possono presentarsi:

- (1) in rapporto al paziente;
- (2) durante la puntura venosa;
- (3) durante la determinazione del tempo di coagulazione.

Dai nostri studi risulta che le variazioni dovute a (1) e (2) sono molto più importanti di quelle dovute a (3).

Le variazioni dovute a (3) possono essere considerate come segue:

a) Tempo di coagulazione secondo Lee e White:

Le condizioni del test devono essere standardizzate. La puntura venosa deve essere perfetta, la velocità del flusso (o di riempimento della siringa) non deve variare oltre limiti piuttosto rigidi. Le provette devono avere lo stesso diametro, devono essere riempite con lo stesso volume di sangue e scosse in maniera uniforme. La temperatura deve essere controllata. Lo stesso osservatore dovrebbe fare tutte le osservazioni in uno stesso esperimento o in una parte di uno stesso esperimento.

L'impiego della media di due provette per misurare il tempo di coagulazione secondo Lee e White non tiene conto delle ampie variazioni nel-

le singole provette. Nei nostri esperimenti, approssimativamente solo una provetta su quattro rientrava entro il $\pm 5\%$ della media apparentemente reale. Quando vengono usate 20 provette, le variazioni sono ampie, ma la media è presumibilmente abbastanza vicina ai valori reali. Alcuni Autori usano 4 provette, e scuotono le prime due finchè si ha la coagulazione, dopo di che scuotono le due successive e prendono la media delle ultime due. Questo procedimento era stato tentato in esperimenti preliminari, ma in parecchie occasioni il contenuto della terza o della quarta provetta non scosse fu trovato coagulato al primo esame. Non essendovi un punto finale accettabile, questo metodo è stato abbandonato. Il punto finale deve essere definito esattamente e ciò non è sempre facile, perchè ci sono parecchi punti finali « accettabili », per esempio:

1) il primo segno di coagulazione nella provetta. Questo può essere a volte osservato, ma non in tutti i casi;

2) la mancanza di spostamento del sangue in seguito a leggere scosse;

3) una coagulazione che permetta di capovolgere completamente la provetta;

4) in alcuni casi si può vedere in poco tempo che un coagulo si è formato alla interfaccia aria-sangue, e che tale coagulo impedisce lo scorrimento del sangue quando si capovolge la provetta, ma il sangue sottostante è ancora fluido. Una piccola scossa della provetta dimostrerà subito che il sangue non è coagulato completamente. In alcune provette la coagulazione sembra sia ritardata quasi indefinitamente. Tutto quel che uno può ragionevolmente fare, è di prendere uno di questi punti finali e di usarlo sempre

Nelle provette di vetro i valori (in minuti) non variano molto. In condizioni che determinano un prolungamento del tempo di coagulazione, le variazioni sono notevoli anche se si tiene conto del maggior numero possibile di variabili. Negli emofilitici con tempo di coagulazione prolungato, le singole provette possono fornire valori da 30 minuti a parecchie ore. Nelle provette siliconate il tempo di coagulazione varia in maniera analoga. Non è difficile capire perchè avvenga questo. Quanto è necessario perchè il sangue coaguli è una piccola quantità di trombina. La grande quantità di protrombina residua in queste condizioni dimostra l'incompletezza del processo di coagulazione.

b) Tempo di ricalcificazione (« calcium time »).

Questo è un altro dato della coagulazione con un grande numero di fattori variabili. Influiscono sul tempo di ricalcificazione: il tempo che

intercorre dalla puntura venosa all'esecuzione del test; il tempo in cui il plasma rimane nel bagnomaria; la temperatura e l'influenza dei vari gradi di centrifugazione. Il punto finale è un po' più facile da determinare sebbene ancora una volta possano aversi numerosi valori. La variabilità in tests ripetuti sullo stesso plasma è notevole.

c) Il test di formazione della trombina.

Allo scopo di ottenere risultati significativi con questo test, O'BRIEN (1955) ritenne essenziale usare plasma povero di piastrine raccolto in provette siliconate. Con questo metodo artificiale, la formazione della trombina è lenta, così che non sorprende se il plateau della formazione di trombina è ampio. Questo è stato chiaramente dimostrato da PITNEY e DACIE (1953), e risulta chiaramente dalla figura 3. Si può vedere come si formi molto poca trombina. Differenze di 5-10 secondi a questi livelli rappresentano solo quantità infinitesimali di trombina. Eppure sono queste differenze che devono essere usate in tale test per dimostrare l'effetto dei grassi sulla coagulazione.

Il tempo di coagulazione secondo LEE e WHITE in provette siliconate, il tempo di ricalcificazione di plasmi poveri e ricchi di piastrine in provette siliconate e non siliconate e il test di formazione della trombina sono alcuni dei tests che sono stati usati da altri per dimostrare l'effetto dei grassi sulla coagulazione. In questa serie di ricerche tutti questi tests hanno fornito risultati praticamente negativi. Inoltre noi riteniamo che gli errori di tecnica inerenti a questi tests siano così grandi e i risultati così variabili che le alterazioni determinate dalla somministrazione di grassi dovrebbero essere molto marcate e costanti per essere considerate significative.

A questa serie di tests noi abbiamo aggiunto i tests del consumo della protrombina e della formazione della tromboplastina ematica. I nostri risultati negativi con questi due tests confermano i risultati di MANNING e WALFORD (1954) e di HALL (1956). Solo i risultati ottenuti con il tempo di stypven sono stati costanti e riproducibili.

Noi abbiamo l'impressione che si dovrebbe fare una netta distinzione tra i risultati dei tests in cui il grasso è stato aggiunto in vitro e di quelli in cui il grasso è stato aggiunto in vivo. Non è difficile mostrare che il grasso aggiunto in vitro influisce sulla coagulazione. POOLE (1955) ha mostrato come il grasso abbrevi il tempo di coagulazione. E' stato pure mostrato che la panna può abolire la mancanza di consumo di protrombina del plasma privo di piastrine ricalcificato (MERSKEY 1956). MACFARLANE, TREVAN e ATTWOOD (1941) hanno mostrato come la panna può abbreviare il tempo di stypven. Nessuno di questi tests in

vitro può provare, però, l'effetto della lipemia alimentare sulla coagulazione.

Nel nostro caso l'accorciamento del tempo di stypven dopo un pasto grasso è l'unico test che ha dato risultati positivi. Noi ci troviamo d'accordo con FULLERTON e coll. (1953) là dove essi dicono che questi reperti « non possono essere interpretati come indicativi di un effettivo aumento della coagulabilità durante la lipemia. L'illazione che la tromboplastina naturale è influenzata dalla lipemia in maniera simile al veleno di vipera non è giustificata ». HALL (1956) ha considerato le cose in un modo diverso, mostrando che l'accelerazione del tempo di stypven è importante solo in assenza di piastrine e che il grasso semplicemente riconduce il tempo di stypven prolungato al punto in cui si trovava prima che le piastrine venissero allontanate. In altre parole, non è stato dimostrato un reale effetto supplementare. Si può pensare che esistano zone della circolazione prive di piastrine perchè trattenute per qualche effetto filtrante. In queste zone i lipidi alimentari possono essere importanti. Ma queste non sono che supposizioni. I nostri risultati con lo stypven confermano i reperti di O'BRIEN (1956) e sono contrari alle conclusioni raggiunte da MACLAGAN e BILLIMORIA (1956). Questi ultimi hanno osservato, in tests in vitro, che solo un gruppo di fosfolipidi, contenuti quasi esclusivamente nei prodotti del latte, è importante. I grassi di montone e di bovini, il rosso d'uovo, l'olio d'oliva e di fegato di merluzzo sono inattivi. Questo fatto dimostra ancora una volta le conclusioni differenti che possono venir raggiunte con l'impiego di tests in vivo e in vitro e col variare le condizioni in cui le prove vengono eseguite.

Recentemente, dei grassi contenenti grandi quantità di acidi grassi insaturi sono stati impiegati per abbassare il colesterolo del siero. I risultati del tempo di stypven ricordati più sopra sembrerebbero quasi applicabili ai grassi contenenti piccole o grandi quantità di acidi grassi insaturi. Si potrebbe così affermare che gli acidi grassi insaturi sono pericolosi (dal punto di vista della coagulazione) come gli acidi grassi saturi. In vista dei nostri risultati negativi con tutti gli altri tests usati, noi crediamo che per il momento non ci siano prove sufficienti per considerare un dato tipo di grassi come causa della coagulazione accelerata.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI

E' stato fatto un tentativo di confermare i dati secondo i quali la somministrazione di grassi animali misti abbrevia il tempo di coagulazione del sangue, e nello stesso tempo di determinare l'effetto della somministrazione di grassi ricchi di acidi grassi insaturi.

Ai pazienti sono stati somministrati tre tipi di pasti: a) poveri di grassi; b) poveri di grassi più un olio contenente una grande quantità di acidi grassi insaturi; c) ricchi di grassi.

I tempi di coagulazione sono stati determinati in ciascuna serie prima e quattro ore dopo il pasto.

I tests eseguiti sono stati i seguenti:

Tempo di coagulazione del sangue in toto in provette siliconate, tempo di ricalcificazione del plasma contenente un numero variabile di piastrine, test di formazione della trombina, test di formazione della tromboplastina, consumo di protrombina e tempo di protrombina accelerato in un tempo (tempo di stypven).

All'infuori del tempo di stypven, nè i pasti ricchi nè quelli poveri di grassi produssero modificazioni significative della coagulazione. I pasti contenenti ol'io (considerati senza relazione con i pasti poveri di grassi) produssero riduzioni significative del tempo di coagulazione nella prova di Lee e White e risultati incostanti nelle prove dei tempi di ricalcificazione. Considerando queste modificazioni insieme a quelle determinate dai pasti poveri di grassi, quasi tutte queste differenze vengono a cadere.

Il tempo di stypven era significativamente più breve nel gruppo dell'olio e nel gruppo dell'alto contenuto di grassi, quando veniva usato plasma diluito. Non fu possibile dimostrare questa differenza per l'olio quando veniva usato plasma non diluito.

Sono da considerare le seguenti variabili:

1) inerenti al paziente e non in relazione con il contenuto di grassi nella dieta;

2) durante la puntura venosa;

3) durante la determinazione del tempo di coagulazione. Tutti questi punti sono importanti, ma i primi due sono molto più importanti del terzo.

La misura del tempo di stypven è sensibile alla presenza di grasso nel plasma. Questo può venir dimostrato sia per i grassi saturi sia per quelli insaturi.

L'importanza di quest'ultimo fenomeno nella medicina clinica deve essere ancora valutato.

Desideriamo esprimere i nostri ringraziamenti per tutta l'assistenza ricevuta in questo studio:

al Professor J. F. Brock e al Professor F. Forman, nell'Istituto dei quali questo lavoro è stato compiuto;

alle tecniche di laboratorio dott.ssa J. Ethelston, dott.ssa E. Scholtz, Miss Lucy Kaplan, Miss Cecile Hoberman, Miss Suzanne Tromp, Miss Brenda Factor e al tecnico di laboratorio Mr. M. Boshof, per il loro lungo e paziente lavoro;

al Dr. M. B. Bowdle e a Mr. J. R. Darroch, per una considerevole assistenza nell'analisi statistica;

al Dr. D. McKenzie, per l'attrezzatura di laboratorio messa a disposizione;

ai membri del Research Fund della Università di Cape Town e al South African Council for Scientific and Industrial Research, per i fondi necessari per le ricerche;

agli innumerevoli pazienti che si sono prestati volontariamente agli esperimenti di alimentazione;

al Sovrintendente del Groote Schuur Hospital, per i mezzi messi a nostra disposizione.

Direttore responsabile: Prof. DOMENICO MAROTTA

Reg. Stampa - Trib. di Roma n. 1534 del 14 luglio 1956