

8. V. G. LONGO. — Il metodo delle 10 dosi mortali in respirazione artificiale come criterio dell'elettività dell'azione curarica.

Riassunto. — L'Autore propone una nuova tecnica di controllo e di assaggio dei curari e delle sostanze curarizzanti, basata sul margine che esiste nei mammiferi fra la dose paralizzante che culmina con l'arresto della respirazione e quella tossica che provoca la morte per azione sul sistema cardiovascolare e nervoso. Questo metodo, che consiste nel mantenere gli animali in respirazione artificiale iniettando loro 10 dosi tossiche del prodotto da saggiare, appare come assolutamente specifico dell'azione curarizzante.

Résumé. — L'A. propose une nouvelle technique de mesure et de contrôle pour les curares et les substances curarisantes. Cette technique est basée sur la marge qui existe entre l'action curarisante qui se traduit par l'arrêt respiratoire et la dose toxique qui provoque la mort en agissant sur le système cardio vasculaire et nerveux. La méthode qui consiste à maintenir en vie par la respiration artificielle des animaux à qui l'on a injecté 10 fois la dose mortelle de la substance à apprécier, s'avère comme absolument spécifique de l'action curarisante.

Summary. — A new technique for measuring and controlling the action of curares and curarising substances is proposed. This method is based on the margin which exists between the curarising action which terminates in the stopping of respiration and the toxic dose which causes death by its action on the cardio-vascular and nervous systems. The method, which consists of injecting 10 times the toxic dose of the products to be tested into the animals maintained with artificial respiration is absolutely specific for the curarising action.

Zusammenfassung. — Der Autor schlägt eine neue Technik zur Kontrolle und zur Anwendung von Curare und curarewirksamen Substanzen vor. Sie stützt sich auf das Intervall, das bei den Säugetieren zwischen der lähmenden Dosis, die Blockierung der Atmung zur Folge hat und der toxischen Dosis, die den Tod durch Aktion auf das Herzgefäß- und Nervensystem hervorruft, liegt Diese Methode, die darin besteht, die Tiere unter künstlicher Atmung zu belassen, nachdem man ihnen zehn letale Dosen der zu prüfenden Substanz injiziert, scheint absolut spezifisch für die curarisierende Wirkung zu sein.

Tra la dose paralizzante del curaro (morte per paralisi respiratoria) e la dose che provoca la morte per azione sul sistema cardio-vascolare e nervoso, esiste un margine che può essere più o meno considerevole e che caratterizza l'elettività dell'azione curarizzante.

Già nel 1811 Brodie e nel 1814 Waterton avevano usato la respirazione artificiale per far sopravvivere animali cui era stato iniettato del curaro. Tillie ⁽¹⁾ è stato uno dei primi a studiare sistematicamente l'azione specifica di forti dosi di curarina in animali sottoposti a respirazione artificiale.

Per quarant'anni poi fisiologi e farmacologi hanno quasi del tutto abbandonato lo studio del curaro sui mammiferi, analizzando nella rana le azioni sulla trasmissione neuromuscolare. La rana, animale a sangue freddo, presenta una reattività particolare: infatti alcuni prodotti che si sono rivelati curarizzanti per i mammiferi (succinilcolina) esercitano su quest'animale un'azione prevalentemente nicotinica, e al contrario, parecchi farmaci che nei mammiferi, e in specie nell'uomo, hanno effetti diversi, nella rana presentano proprietà curarizzanti (aconitina, veratrina, chinino, colina).

Col crescente impiego clinico del curaro, così largamente usato ora nel campo dell'anestesia, si imponevano nuovi e più rigorosi metodi di ricerca e di controllo.

Holaday, allo scopo di saggiare diversi preparati per ottenere in clinica un prodotto di attività costante (Intocostin) ha descritto il metodo dell'« Head - drop ». Iniettando ad un coniglio il prodotto si ricerca la dose che fa abbassare la testa al livello del suolo. Il metodo presenta il vantaggio della semplicità e dà la possibilità di rifare la prova, a distanza di qualche giorno, più volte sullo stesso animale. Questo metodo si può utilmente usare per comparare differenti alcaloidi naturali e prodotti di sintesi, ma è necessario secondo noi aggiungervi altre prove poichè una tecnica così semplice non è specifica dei curari, manifestandosi positiva anche nelle prove fatte con farmaci depressivi il midollo e i centri.

Bovet e coll. ⁽²⁾ nel 1946, descrivendo i primi prodotti curarizzanti di sintesi che presentavano nei mammiferi un'azione veramente elettiva,

⁽¹⁾ J. TILLIE, Arch. exp. Path., 27, 1 (1890).

L'autore, usando la curarina di Boehm, trovò una dose minima curarizzante di 0,2 mg/kg per il coniglio e iniettando 2, 5 e 10 dosi curarizzanti in respirazione artificiale osservò altresì la durata della curarizzazione e gli effetti sulla pressione.

Mg/kg	Durata della curarizzazione in R. A.
0.4	10 minuti
1.0	25 minuti
2.0	75 minuti

⁽²⁾ D. BOVET, F. DEPIERRE e Y. LESTRANGE, C. R. Ac. Sc., 225, 74 (1947).

hanno aggiunto al metodo head-drop un'altra prova che, realizzata ugualmente sul coniglio, permette di studiare l'elettività e la durata dell'azione, elementi fondamentali necessari per riconoscere la caratteristica curarizzante di un prodotto. Questi autori consigliano di somministrare al coniglio in R. A. dosi crescenti di prodotto osservandone la durata di azione e il limite massimo di tolleranza. Se questo metodo non basta per inquadrare le caratteristiche di un nuovo farmaco e se non dispensa da uno studio più dettagliato che si può fare sul cane, ha il vantaggio di permettere una buona discriminazione tra differenti tipi di prodotti. Senza pretendere dunque che questo criterio sia assolutamente specifico, essi propongono un nuovo metodo di controllo: un curaro, secondo questi autori, si può considerare tale se il coniglio in respirazione artificiale ne sopporta più di 10 dosi mortali.

Bovet e coll. hanno nelle loro prove, senza considerare gli effetti tardivi dell'iniezione dei vari prodotti, osservato solamente la sopravvivenza momentanea, considerando come limite massimo una sopravvivenza di otto ore in respirazione artificiale.

Riprendendo queste prove noi abbiamo preferito di considerare soprattutto gli effetti tardivi in rapporto anche ad eventuali lesioni sugli organi destinati alla distruzione e all'allontanamento dei prodotti dall'organismo, e abbiamo modificato le condizioni dell'esperienza in modo da far sopravvivere l'animale e da seguirlo in tutto il periodo successivo alla curarizzazione.

PARTE SPERIMENTALE

Tecnica: Quando si prevedeva che la durata della curarizzazione non sorpassasse le 3 ore, si è praticata l'intubazione mediante un catetere (n. 12 ch.) privo della punta. Negli altri casi il coniglio viene tracheotomizzato all'altezza del 5-6 anello tracheale e intubato stabilmente mediante una legatura che fissa un tubo di vetro alla trachea. Le dosi di curaro si somministrano endovena e durante o subito dopo l'iniezione si incomincia la respirazione artificiale con una pompa tipo Palmer che inietta aria nei polmoni 30 volte al minuto. Durante la curarizzazione, specie se prolungata, il coniglio viene riscaldato mediante una comune fonte di calore. Il tempo di durata della curarizzazione viene valutato in base alla ricomparsa del riflesso corneale; ad ogni modo sono stati pure notati il riapparire dei primi movimenti e il momento in cui viene sospesa la respirazione artificiale. Al coniglio poi viene suturata la trachea con uno o due punti di seta, e cucita la pelle con grappette.

La tecnica suddescritta è indicata per un primo studio dei prodotti di cui si ricerca l'azione curarizzante.

Dopo aver determinato la dose che provoca nel 50% dei conigli trattati l'head-drop e la dose tossica (D. T.₅₀), si iniettano sistematicamente all'animale in respirazione artificiale dieci dosi mortali del prodotto in esame e si osserva, se il coniglio sopravvive, la durata della respirazione artificiale fino al completo ripristino dell'attività spontanea.

Allo studio delle 10 dosi abbiamo aggiunto, quando i prodotti si presentavano come particolarmente interessanti, quello di dosi più forti in modo che fosse possibile tracciare delle curve di durata. Il risultato ottenuto permette di trovare con i differenti curari dei risultati che non erano prevedibili nel coniglio normale e con le prove sul cane in anestesia cloralosica.

La respirazione artificiale negli avvelenamenti provocati da farmaci appartenenti a differenti gruppi farmacologici. — Abbiamo anche voluto fare delle esperienze, al di fuori della serie dei curari, su differenti gruppi di farmaci di cui si conosce dalla letteratura che la loro tossicità può essere diminuita dalla respirazione artificiale.

Noi, mettendoci nelle stesse condizioni sperimentali, abbiamo esaminato da questo punto di vista:

1) Nel gruppo degli anestetici generali, un barbiturico, il 5 etil, 5 (1 metil butil) tiobarbiturato di sodio (Nesdonal, Pentothal).

2) La stricnina.

3) I termini più semplici della serie dei prodotti contenenti uno o più gruppi ammonio quaternario: il bromuro di tetrametilammonio e lo ioduro di tetraetilammonio.

Per nessuno di questi prodotti la protezione ha raggiunto o superato le cinque dosi mortali.

1) La respirazione artificiale protegge molto scarsamente gli animali intossicati dagli ipnotici. Difatti, iniettando dosi crescenti di 5 etil 5-(1-metilbutil)tiobarbiturato di sodio (Pentothal, Nesdonal) si constata che la respirazione artificiale protratta per 5 ore protegge l'animale da due dosi mortali. Ma non riesce a salvare il coniglio trattato con 10 o solo 5 dosi mortali. Il fatto assume maggior risalto se si pensa che, somministrando dosi appropriate del farmaco (20,30 mg/kg), si riesce a provocare nel coniglio un quadro sintomatologico del tutto simile all'head-drop.

2) Vecchi lavori di Vulpian ⁽³⁾ e di Gaglio ⁽⁴⁾ misero in evidenza la possibilità di far sopravvivere cani trattati con parecchie dosi mortali di stricnina sia mediante la respirazione artificiale (Vulpian) sia evitando

⁽³⁾ A. VULPIAN, Leçons sur l'action physiologique des substances toxiques, Paris, 1882, p. 483.

⁽⁴⁾ G. GAGLIO, Annali di chimica e farmacologia, 7, 162, (1888).

l'ipertermia che secondo Gaglio è la causa principale della morte degli animali.

Abbiamo voluto riprendere questi lavori usando come animale di esperimento il coniglio e siamo riusciti a proteggere mediante la respirazione artificiale tre conigli su cinque dalla somministrazione di $3\frac{1}{2}$ dosi mortali di stricnina ottenendone l'assoluta sopravvivenza. Non è stata mai notata ipertermia (tab. I).

TABELLA I.

STRICNINA

Coniglio normale		Coniglio in respirazione artificiale	
Mg/kg V.E.		Mg/kg V.E.	
0,4	Sopravvissuti 3 su 3	1	In respirazione artificiale per 1 ora, sopravvissuti * 3 su 3.
0,5	Sopravvissuti 2 su 3	1,5	In respirazione artificiale per 2 ore, sopravvissuti * 3 su 3.
0,6	Sopravvissuti 0 su 3	2	In respirazione artificiale per 3 ore, sopravvissuti * 3 su 5 ⁽¹⁾ .

(¹) I due conigli trattati con 3 mg/kg sono morti dopo 3 ore di respirazione artificiale. In uno poco prima della morte sopravvenne una intensa salivazione.

(*) Più di un mese.

La differenza tra le nostre ricerche e quelle di Gaglio sarà dovuta al fatto che il meccanismo della morte non è lo stesso nel coniglio e nel cane.

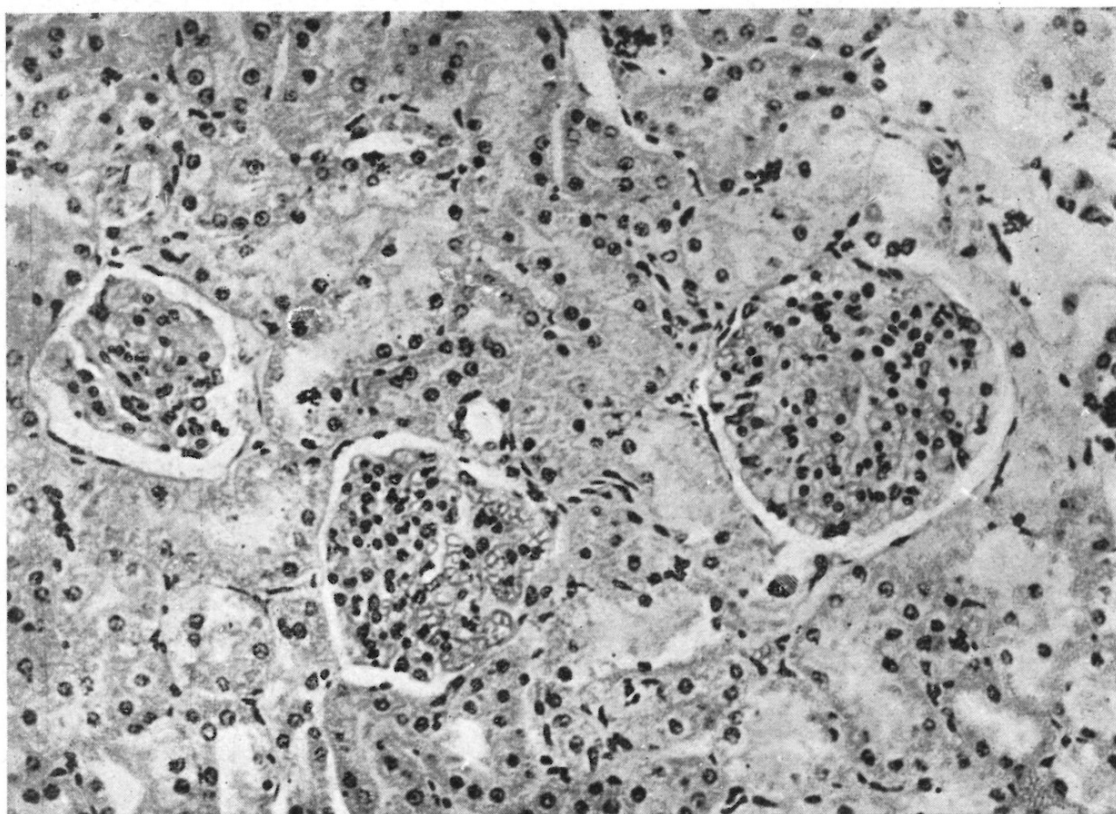
3) I termini più semplici della serie degli ammoni quaternari dimostrano la scarsa elettività della loro azione curarizzante sui mammiferi. Con il bromuro di tetrametilammonio, per esempio, non siamo riusciti a provocare nel coniglio l'head-drop classico ma solo salivazione (1,2 mg/kg.), disturbi paretici (3,4 mg/kg.) e infine morte con 5 mg/kg.

La respirazione artificiale riesce a salvare il coniglio da 2 dosi mortali di bromuro di tetrametilammonio mentre la somministrazione di 5 dosi mortali provoca una paralisi respiratoria irreversibile anche dopo 9 ore di respirazione artificiale, paralisi probabilmente dovuta a intossicazione dei centri.

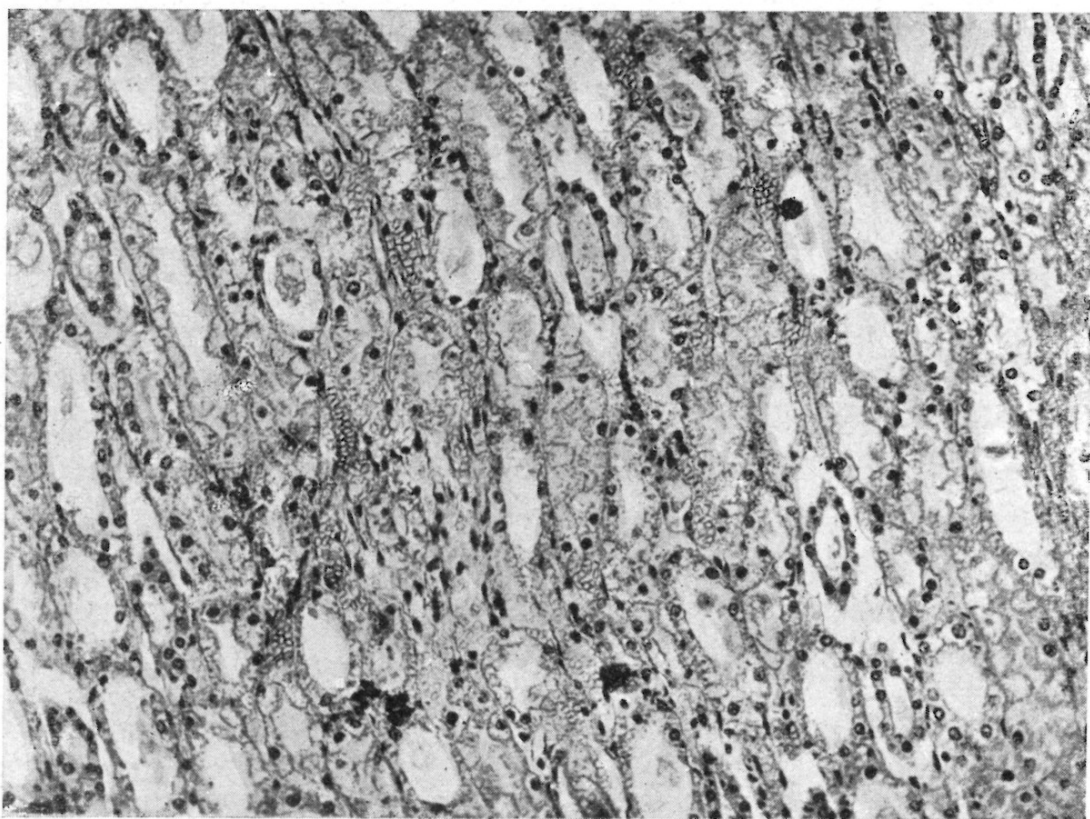
Trattando dei conigli con lo ioduro di tetraetilammonio siamo riusciti a provocare un head-drop (*) iniettando una dose di 75 mg/kg (dose

(*) Vogliamo notare a questo proposito che già Simon, in un suo articolo sullo studio delle caratteristiche del fosfato di tri-tetraetil ammonio, riconobbe in questo prodotto qualità curarizzanti e descrisse nel coniglio la sintomatologia classica della curarizzazione segnalando specificatamente l'abbassarsi della testa a livello del suolo. [Vedi I. SIMON, Arch. Int. Pharm. Thér., 47, 75 (1934)].

FIG. 1.



Lesioni renali provocate da forti dosi di d-tubocurarina. Coniglio che ha ricevuto 10 mg/kg. (50 dosi mortali) di d-tubocurarina e morto dopo due giorni dal trattamento. Rigonfiamento torbido dei glomeruli, degenerazione dell'epitelio tubulare (X 250).



Lesioni renali provocate da forti dosi di d-tubocurarina. Coniglio trattato con 40 mg/kg. di d-tubocurarina (200 dosi mortali) e morto durante la curarizzazione dopo 12 ore di respirazione artificiale. Degenerazione e sfaldamento dell'epitelio tubulare (X 200)

Si è visto dunque che sia col 2259 F. che col C₁₀ si è potuta ottenere la sopravvivenza assoluta di conigli che sono rimasti curarizzati da 7 a 9 ore. Fatto questo che mette bene in evidenza la tossicità secondaria minima di questi prodotti.

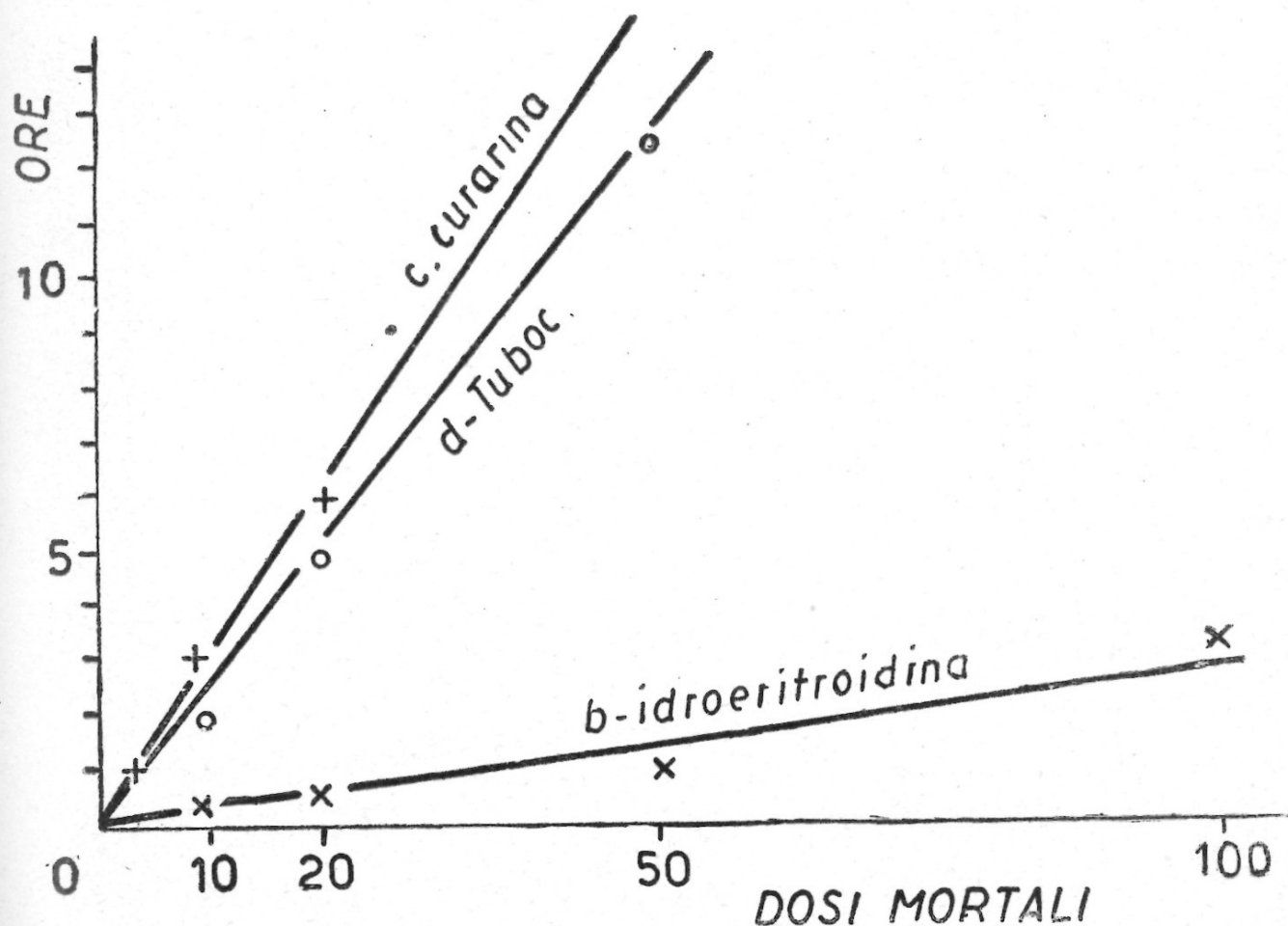


FIG. 2.

Come si può osservare dall'andamento delle curve (Fig. 2 e 3) la durata della curarizzazione è assai diversa sia che si tratti di curari naturali che di sintesi. La rapida eliminazione di alcuni curari di sintesi sembra avere molteplici cause, secondo il prodotto considerato: se per tutti interviene la velocità di eliminazione e l'assenza di azioni tossiche sugli emuntori, per alcuni che contengono la funzione estere (302 I. S., 362 I. S.) la distruzione enzimatica da colinesterasi appare come un elemento importante nella loro degradazione.

Nel caso della β -diidroeritroidina la brevità della sua azione in confronto con la tubocurarina è già stata menzionata da Unna, Kniazuk e Greslin ⁽⁵⁾.

CONCLUSIONI

Benchè già dal 1811 sia stato notato da Brodie che i mammiferi possono essere protetti da dosi elevate di curaro se tenuti in respirazione artificiale, dimostrando così che esiste un margine fra la dose

⁽⁵⁾ K. UNNA, M. KNIAZUK e J. G. GRESLIN, J. Pharmacol., 80, 39 (1944).

TABELLA II.

DURATA DELLA CURARIZZAZIONE NEL CONIGLIO SOTTOPOSTO A FORTI DOSI
DI CURARI NATURALI E DI SINTESI

	Mg/kg V.e.		Dosi mortali in respirazione artificiale							Osservazioni
	Dose H.D.	Dose M.	10	20	50	100	200	400		
d-tubocurarina. . . .	0,18	0,20	2 h	5 h	+ 12 h	+ 12 h	Morto dopo 12 h di R. A.	Morto dopo 60 h di R. A.	Sopravvivenza dei conigli trattati fino a 20D.M.	
B-Iidroeritroidina . . .	2	3	15 m	40 m	1 h 10	1 h 50	—	—	Sopravvivenza di tutti i conigli.	
2559 F.	0,45	0,5	1 h 45	4 h	7 h	9 h	14 h	—	Sopravvivenza dei conigli trattati fino a 100 dosi mortali.	
302 I.S.	3	4	20 m	35 m	1 h 15	2 h	—	—	Sopravvivenza di tutti i conigli.	
362 I.S.	0,8	1,5	20 m	35 m	1 h 15	2 h	—	—	Sopravvivenza di tutti i conigli.	
C ₁₀	0,3	0,4	45 m	2 h 30	7 h	—	—	—	Sopravvivenza di tutti i conigli.	

paralizzante che si traduce con l'arresto della respirazione e quella tossica che agisce sul sistema cardiovascolare e nervoso, durante quasi quarant'anni fisiologi e farmacologi si sono limitati a studiare la curarizzazione di preferenza sulla rana che reagisce in modo del tutto particolare.

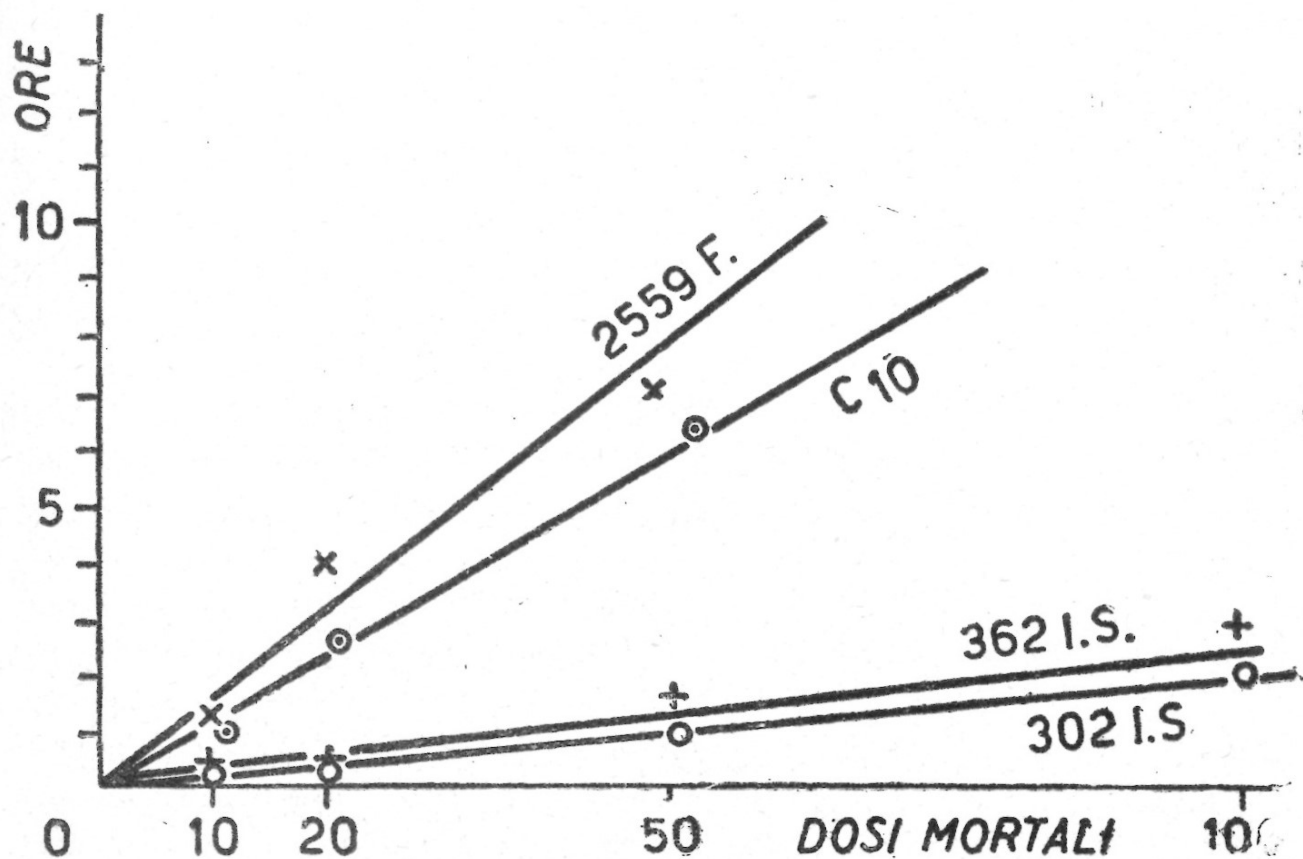


FIG. 3.

In questi ultimi anni, dinanzi allo sviluppo preso in clinica dell'impiego del curaro, si è sentita la necessità di tecniche più specifiche e sicure dell'attività curarizzante. E' così che Holaday ha descritto il metodo dell'« head-drop » ormai internazionalmente adottato ed a cui, pur apprezzandone la semplicità e la sicurezza, si può rimproverare la non assoluta specificità, poichè esso non permette di separare i prodotti unicamente curarizzanti da quelli depressivi il midollo e i centri.

In seguito alle ricerche di Bovet e dei suoi collaboratori, abbiamo voluto noi stessi perfezionare ed estendere la tecnica da loro proposta. Moltiplicando per dieci la dose tossica mortale di un farmaco curarizzante e mantenendo il coniglio in respirazione artificiale abbiamo potuto distinguere inequivocabilmente quei farmaci ad azione unicamente curarica da quelli ad azione più complessa e constatare come questo nuovo testo permette di seguire tutta l'evoluzione della curarizzazione e di valutarne, l'animale restando in vita, le più lontane conseguenze.