

14. Salvatore GUARINO. — Alcune osservazioni sul dosaggio dei curari sul muscolo retto addominale di rana.

Riassunto. — Sono state studiate le migliori condizioni per potere eseguire un dosaggio biologico del curaro sulla preparazione: acetilcolina/muscolo retto addominale. Il metodo risulta sensibile e preciso, oltre ad essere semplice, ed ha permesso di stabilire che nell'urina di un cane si trovava anche il 50% della quantità iniettata di 2559 F.

Resumé. L'A. décrit les conditions dans lesquelles peut être réalisé un dosage biologique du curare reposant sur l'antagonisme présenté vis à vis de l'acetylcholine sur le muscle droit abdominal de la grenouille. Avec cette méthode, qui est à la fois sensible et précise, on a pu retrouver dans les urines du chien 50% de la quantité de 2559 F. injectée.

Summary. — The best conditions for estimating curare by means of a biological method using acetylcholine on the rectus abdominis muscle have been studied. The method described has been found to be sensitive and precise and at the same time simple. Using this method it has been established that in the urine of a dog 50% of the given dose of 2559 F. can be recovered.

Zusammenfassung. — Es wurden die besten Bedingungen zur biologischen Bestimmung des Curare beim Studium der Aktion auf den Musculus rectus abdominis zusammen mit dem Acetylcholin untersucht. Die Methode erweist sich als empfindlich und genau und ist dabei einfach. Sie erlaubte, festzustellen, dass im Urin eines Hundes 50% einer injizierten Dosis 2559 F. zu finden waren.

Quantunque con la scoperta dei curari sintetici sia diminuita l'importanza di un metodo biologico per il dosaggio del curaro, pure rimangono molti problemi, ad esempio quelli legati alla distruzione organica ed alla eliminazione dei curari sintetici, per cui un preciso metodo di dosaggio riesce utile e necessario.

Da quando Griffith e Johnson ⁽¹⁾ proposero di applicare in chirurgia le proprietà rilascianti della tubocurarina, sono stati proposti alcuni metodi di dosaggio biologico: ricorderemo quello di Chou (1947) ⁽²⁾, modificato da West ⁽³⁾ che si avvale della preparazione di Büllbring ⁽⁴⁾ del nervo frenico isolato-diaframma.

⁽¹⁾ H. R. GRIFFITH e G. H. JOHNSON, *Anesthesiology*, 3, 418 (1942).

⁽²⁾ T. C. CHOU, *Brit. J. Pharmacol.*, 2, 1 (1947).

⁽³⁾ G. B. WEST, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 20, 518 (1947).

Recentemente De Jalón (5) ha pubblicato un metodo molto semplice basato sulla diminuzione della contrattura da acetilcolina del muscolo retto addominale della rana.

Avvalendoci dell'esperienza acquisita nel saggio dell'attività curarica di nuovi composti curarici di sintesi, e tenendo conto delle conclusioni di altri studi che abbiamo eseguito sulla contrattura da acetilcolina (6) e sull'antagonismo acetilcolina-curaro (7), abbiamo visto quali erano le condizioni ottime per potere eseguire un saggio dell'attività curarica sulla preparazione del muscolo retto addominale. La tecnica descritta permette di avere differenti applicazioni per il dosaggio del 2559 F. Noi citeremo qui unicamente un esempio in cui l'abbiamo applicata al dosaggio del 2559 F. nell'urina, dopo l'iniezione di una dose massiva ad un cane.

1) *La contrazione con l'acetilcolina deve essere lasciata continuare fino a che il muscolo raggiunga la massima altezza di contrazione.* — In altro studio (6) abbiamo sottolineato la necessità di considerare in una contrazione di acetilcolina, la velocità della contrazione oltre che l'altezza raggiunta; infatti l'espressione matematica della curva che si ottiene registrano la contrazione su un chimografo è:

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{h - x_1}{h - x_2} \quad (1)$$

la quale espressione mette in evidenza che vi sono due variabili, x , cioè l'ampiezza della contrazione, e t , cioè il tempo impiegato per la contrazione x . Poichè la velocità può essere indipendente dall'altro fattore considerato, cioè l'altezza di contrazione, si deduce che se si cambia il Ringer ed es. dopo 2' dall'inizio della contrazione, non si possono distinguere gli effetti sulla velocità da quelli sull'ampiezza di contrazione. Il 2559 F. diminuisce la contrattura acetilcolinica a valori corrispondenti a una più piccola quantità di acetilcolina, cioè influisce sulla costante k della relazione (1), diminuendola solo proporzionalmente alla più piccola ampiezza di contrazione; non è così però delle contrazioni postcurariche dopo una forte dose del 2559 F.; in queste si ha che la stessa altezza viene raggiunta con una velocità molto più piccola, cioè con un valore della costante k minore. Ripetendo le contrazioni con acetilcolina pura, la costante k torna gradualmente verso il valore della contrazione che si è avuto con l'acetilcolina prima dell'aggiunta del curaro.

(4) E. BÜLBRING, Brit. J. Pharmacol., 1, 38 (1946).

(5) G. DE JALÓN, Quart. J. Pharm. Pharmacol., 20, 28 (1947).

(6) S. GUARINO, questi Rendiconti.

(7) S. GUARINO e D. BOVET, questi Rendiconti.

In presenza di forti quantità di curaro, la contrazione con acetilcolina viene fortemente diminuita; in tal caso il massimo della contrazione viene raggiunto dopo un tempo molto lungo, e può essere utile in tal caso calcolarlo approssimativamente con l'aiuto della relazione (1). E' chiaro che il vero valore di h è quello per cui i valori della costante calcolati sui diversi valori dei tempi sono approssimativamente eguali.

L'ordine di attività dei vari curari sulle rane non è lo stesso che sui mammiferi. Ad esempio mentre per diminuire all'effetto di 0,4 mg/l di acetilcolina una quantità di 0,8 mg/l, occorrono 1,9 mg/l di 2559 F., ne sono sufficienti 0,18 mg/l di d-tubocurarina e 0,07 di β -diidroeritroidina, mentre sui mammiferi la β -diidroeritroidina è meno attiva degli altri due curari.

E' chiaro che nel dosaggio biologico verrà scelto per il confronto e il campionamento una soluzione nota di quello stesso curaro che si suppone esistere nella soluzione di cui si vuol conoscere la concentrazione.

2) *Convienne usare la più piccola quantità possibile di acetilcolina.* — Il curaro agisce sulla acetilcolina impedendo che essa reagisca con i ricettori del muscolo e poichè l'antagonismo è reciproco, fissandosi tutte e due le sostanze sugli stessi ricettori, una stessa quantità di curaro sembra avere un'azione più forte quanto più piccola è la quantità di acetilcolina in soluzione.

3) *Occorre usare piccole quantità di curaro per evitare l'effetto depressorio.* — Dallo studio dell'antagonismo del curaro verso l'acetilcolina si è dimostrato che una parte del curaro si fissa più stabilmente ai ricettori; cioè che una parte dell'azione curarica è dovuta al fenomeno dello spostamento dell'equilibrio dell'acetilcolina con i ricettori, ed una parte alla fissazione stabile ai ricettori. Difatti usando una forte quantità di curaro, si nota che nella successiva contrazione (oltre ad essere diminuita la velocità) è diminuita anche l'ampiezza. Ripetendo le contrazioni con la sola acetilcolina, il muscolo progressivamente ritorna alla normalità. Usando quantità piccole di curaro, questo fatto della depressione post-curarica è trascurabile.

4) *Le contrazioni con l'acetilcolina riescono più regolari se eseguite ogni trenta minuti.* — Abbiamo visto che questo è il tempo optimum in modo da evitare fatica al muscolo e assicurare un buon lavaggio della preparazione, e aspettare che il muscolo torni da sè stesso alla linea di riposo.

Non è stata usata la sensibilizzazione del muscolo con l'eserina, perchè in questo caso il muscolo sensibilizzato perde progressivamente la sensibilizzazione, e ogni volta, anche con la sola acetilcolina senza curaro, l'ampiezza di contrazione è progressivamente più piccola. Inoltre

l'eserina, inibendo la colinesterasi e impedendo la distruzione dell'acetilcolina, altera l'equilibrio acetilcolina-curaro.

5) *E' opportuno un diagramma preliminare dell'azione delle varie concentrazioni di curaro sulla concentrazione usata di acetilcolina.* — Come principio del dosaggio si è adottato quello di usare la più piccola quantità della soluzione di curaro di cui si vuol conoscere il contenuto, aggiungendo una certa quantità di questa soluzione 5' prima di una contrazione, ed osservando l'effetto ottenuto. Conoscendo da un diagramma preliminare, ottenuto con concentrazioni note di curaro, a quale quantità di curaro corrisponde l'effetto provocato, si aggiungeranno nelle successive contrazioni al muscolo quantità variabili di una soluzione nota di curaro, che diano effetti un pò più grande e un pò meno grande di quello ottenuto con la soluzione da esaminare. In queste condizioni, essendo i due valori molto vicini, è legittimo calcolare il valore della soluzione ignota da un diagramma che abbia sull'ascissa i logaritmi della concentrazione e sull'ordinata la percentuale della diminuzione di contrazione. Il principio del dosaggio è quindi confrontabile a quello di una determinazione fotometrica, in cui si calcola il valore della concentrazione di una soluzione riportando il valore trovato dell'assorbimento della luce su un diagramma che ha sugli assi da una parte l'assorbimento e dall'altra le concentrazioni.

Procedimento del dosaggio. — Il muscolo retto addominale di Rana Temporaria viene sospeso ad un sistema isotonico di registrazione, in un bagno ossigenato di sol. Ringer (*), che è in quantità variabile secondo la sensibilità che si vuole ottenere. Dopo aver lasciato in riposo il muscolo per circa mezz'ora si esegue la prima contrazione con 0,4 mg/l di acetilcolina. Si aspetta da cinque a dieci minuti che la contrazione raggiunga il suo massimo, poi si cambia il Ringer una volta, e dopo 15' una seconda volta. Il muscolo così torna alla posizione di riposo. In genere una contrazione successiva viene eseguita dopo 30' dalla fine della precedente.

Si esegue una seconda contrazione con la stessa quantità di acetilcolina, e se il risultato non è paragonabile a quello della prima, se ne esegue ancora una terza. Infine si aggiunge 5' prima della successiva contrazione una quantità misurata della soluzione di cui si vuol conoscere il contenuto in curaro. Il curaro provoca una diminuzione dell'ampiezza di contrazione, e questa diminuzione si valuta approssimativamente, mediante il diagramma costruito in precedenza con concentrazioni note dello stesso curaro. Quindi nelle successive contrazioni si aggiunge un pò più e un pò meno di questa quantità di curaro, mediante una soluzione nota, sempre 5 minuti prima della contrazione. Il valore della con-

(*) $\frac{0}{100}$ NaCl g 6,5; KCl 0,2; CaCl_2 0,18; Na_2HPO_4 0,5.

centrazione della soluzione ignota si ha per interpolazione da un diagramma che porti sull'ordinata il per cento della diminuzione e sull'ascissa il logaritmo della concentrazione.

Applicazione pratica-dosaggio del 2559 F. nell'urina. — In un cane del peso di kg 12,2 si sono iniettati 122 mg di 2559 F. e. v. Subito dopo l'iniezione si è praticata la respirazione artificiale per mezzo di una pompa. Il cane è rimasto curarizzato per tre ore. Dall'inizio alla fine della curarizzazione si è raccolta l'urina direttamente dalla vescica. Su questa urina (63 cm³) si è eseguito direttamente il metodo esposto, per conoscere la concentrazione del curaro. Il risultato ha dimostrato che sono stati eliminati 61 mg, corrispondenti al 50% della quantità di curaro iniettata al cane.

Sensibilità del metodo. — La sensibilità del metodo dipende naturalmente dal volume del Ringer adoperato. Con un volume di 10 cm³ si può apprezzare bene fino a una concentrazione di 2559 F. di 0,002 mg per cm³ della soluzione da esaminare.

Data la sicurezza della determinazione, il metodo ha anche una precisione notevole. Le variazioni sperimentali trovate nei differenti dosaggi sono risultate costantemente inferiori al 5%.
