

MBLsc-B77/7

ISTIT

Dott FRANCESCO ARCURI

LA FOSFATASI DEL SIERO NEGLI ITTERI

Ricerche «in vitro» sull'azione dei sali biliari e dell'acido ascorbico sulla fosfatasi del siero.

Estratto dall'ARCHIVIO
PER LO STUDIO DELLA FISIOPATO-
LOGIA E CLINICA DEL RICAMBIO
Anno X - Fasc. 4



ne di
do Ro-
DITTA TIPOGRAFIA
ROMA - emolitici e di
E. e GUTMANN A.,
in 23 su 25 casi di
entata, con valori
tendevano ad essere
lori inferiori in 35

LA FOSFATASI DEL SIERO NEGLI ITTERI

RICERCHE *IN VITRO*
SULL'AZIONE DEI SALI BILIARI E DELL'ACIDO ASCORBICO
SULLA FOSFATASI DEL SIERO

Dott. FRANCESCO ARCURI, Assistente

Nel corso di determinazioni della glicerofosfatasi eseguite su numerosi sieri, allo scopo di fissare il valore medio-normale di questa attività fermentativa, ho avuto occasione di notare come a sieri di soggetti affetti da ittero di varia natura corrispondesse un potere fosfatasico molto elevato. La costanza di questa osservazione e il fatto che l'attività fermentativa di qualcuno di questi sieri si discostasse assai dalla norma, mi ha spinto a rivedere la letteratura in proposito ed a intraprendere alcune ricerche sull'argomento.

La costatazione di una attività fosfatasica elevata nei sieri di itterici non è recente; risale al 1930, anno in cui ROBERTS segnalò per il primo di aver riscontrato un notevole aumento della fosfatasi negli itteri da ostruzione, mentre in quelli catarrali ed epatotossici i valori si mantenevano pressocchè normali. Da queste ricerche sorse la speranza, che invero non è stata confermata dalle successive osservazioni di possedere un mezzo diagnostico che, a complemento della Reazione di H. v. d. Berg e dei dati clinici, riuscisse a differenziare i vari tipi di ittero. Dopo ROBERTS, AUSTONI e COGGI, usando il metodo Kay, confermarono l'aumento della fosfatasi negli itteri da occlusione trovando valori normali o quasi negli itteri emolitici ed epatotossici. Alle stesse conclusioni pervennero le ricerche di ROTHMANN, MERANZE D. e MERANZE T. che studiarono, con il metodo Roberts il fermento nel siero di 29 itteri meccanici, di 8 itteri emolitici e di 23 itteri epatotossici, e le ricerche di FLOOD, GUTMANN E. e GUTMANN A., i quali dimostrarono, usando il metodo Bodanski, che in 23 su 25 casi di ostruzione coledocica la fosfatasi era nettamente aumentata, con valori superiori alle 10 Unità; negli itteri epatitici i valori tendevano ad essere elevati, ma di solito non superavano le 10 Unità (valori inferiori in 35

su 47 casi); nelle cirrosi epatiche ottennero valori variabili e senza apparente relazione con lo studio della malattia; un leggero aumento nei carcinomi metastatici del fegato e normalità in tre casi di ittero emolitico e in due di ittero da atresia congenita delle vie biliari. Nonostante questa ultima contraddizione, agli AA. il metodo sembra utilizzabile per distinguere la natura degli itteri.

A conclusione incerta, e quindi inutili per la pratica differenziale, sono le ricerche di ARMSTRONG, KING e HARRIS e quelle di HERBERT; i primi in itteri epatocellulari trovarono valori solo di poco aumentati; il secondo trovò negli itteri meccanici valori alti e negli itteri tossici od infettivi valori talvolta normali, talvolta fortemente aumentati. Anche GIORDANO, WICHELM e PRESTRUD da ricerche eseguite su 41 itteri di differente natura concludono che almeno per ora il dosaggio della fosfatasi nel siero non può essere usato allo scopo di differenziare gli itteri da ostruzione da quelli di altra natura. Allo stesso modo, incerti sono i risultati delle ricerche di CANTAROW e NELSON, i quali riscontrarono negli itteri da occlusione (31 casi) il maggior numero di valori alti di fosfatasi nel siero, in confronto ai 22 casi di itteri da epatite da essi studiati contemporaneamente; giustamente osservano che se nel 24 % degli itteri meccanici i valori furono inferiori alle 10 unità Bodanski e che questa percentuale negli itteri epatitici si eleva al 36,6 %, ciò è insufficiente per valorizzare il metodo nella diagnosi differenziale delle itterizie. Decisamente contrarie all'utilità pratica del dosaggio del fermento negli itteri, sarebbero le osservazioni di GREENE, SHATTUCK e KAPLOWITZ che ritrovarono la fosfatasi in aumento negli itteri catarrali, negli itteri meccanici e nella cirrosi epatica, mentre valori normali sarebbero stati riscontrati negli itteri emolitici.

Della stessa opinione sono FIESSINGER e BOYER i quali, anche usando per le loro ricerche un metodo differente (il metodo Kay), giudicano del tutto inutile la ricerca dell'attività del fermento per la differenziazione degli itteri meccanici dagli itteri epatitici.

Anche le ricerche recenti di ANGELERI e PESCARMONA concludono nel non attribuire alla ricerca della fosfatasi nel siero degli itterici alcun valore pratico per la diagnosi differenziale, potendosi ritrovare valori molto alti in qualsiasi tipo di ittero, compreso gli emolitici. Gli AA. hanno adoperato il metodo Kay, fissando come valore normale le oscillazioni comprese tra le 0,20 e le 0,22 unità Kay.

Contemporaneamente eseguirono dosaggi nel sangue della bilirubina e dei sali biliari, dimostrando come nessun rapporto esista tra bilirubinemia e aumento della fosfatasi nel siero, mentre un certo rapporto sembra potersi esprimere dal confronto dell'aumento dei sali biliari nel sangue con l'aumento della fosfatasi.

Non meno contraddittorie sono le ricerche sperimentali intese a spiegare o a riprodurre il singolare comportamento della fosfatasi negli itteri. Contraddittorie, sia perchè non esiste tra esse un assoluto accordo, giungendo talora a risultati opposti, sia perchè sono, alcune tra esse, in disaccordo con i dati riguardanti le ricerche cliniche. STEWART, MC COOL e CANTAROW praticando la legatura del coledoco in animali non riuscirono a determinare un aumento della fosfatasi nel siero, mentre BODANSKI e JAFFE prima a THANNHAUSER, REICHEL, GRATTAN e MADDOCK dopo riscontrarono alte cifre di fosfatasi sul siero di animali a cui era stata praticata l'occlusione delle vie biliari. Questi ultimi ricercatori riuscirono a precisare che l'aumento massimo si ottiene dopo due settimane dall'operazione, ed inoltre che l'aumento del fermento non è di natura quantitativa ma dipende da una vera attivazione. Infatti i sieri di animali a cui era stato occluso il coledoco subivano, per mezzo dell'acido ascorbico una attivazione solo del 130 %, mentre prima dell'operazione si aveva un incremento nell'attivazione del 2000 %. Ricorderemo a questo proposito come ad opera degli stessi AA. è stato nel 1937 dimostrato che l'acido ascorbico attiva la glicerosfosfatasi del siero, e che ad essi è dovuto un metodo che, a mezzo dell'acido ascorbico, permette di distinguere fra un aumento di attività della fosfatasi e aumento di quantità del fermento.

All'aumento della fosfataseemia negli itteri sono state date interpretazioni molto diverse. ROBERTS fa derivare l'aumento del fermento nel sangue degli itteri da occlusione dal passaggio nel sangue della fosfatasi presente nella bile; ma poichè questo non sarebbe sufficiente per spiegare i valori molto elevati, anche dal mancato aumento di eliminazione del fermento per via urinaria. Si otterrebbe così negli itteri occlusivi accanto a una normale eliminazione un apporto di fermento nel sangue, cioè una relativa ritenzione dell'enzima. AUSTONI e COGGI spiegano l'iperfosfataseemia come un segno « precoce e premonitore » di un alterato metabolismo minerale. Con la derivazione all'esterno della bile questi AA. riscontrano, con un aumento della fosfataseemia, una alterazione dell'equilibrio calcio-fosforo; alterazione che conduce, a lungo andare, a manifeste lesioni scheletriche per un insufficiente assorbimento del calcio dall'intestino, assorbimento che è condizionato in gran parte dalla presenza della bile. È noto, infatti, da ricerche anche precedenti quelle dei due AA. (DOYON, PAWLOW, ecc.) come la esclusione della bile dall'intestino indotta sperimentalmente per mezzo della legatura del coledoco o di fistola biliare determini vere alterazioni scheletriche consistenti in rammollimenti, osteoporosi e decalcificazioni.

Ma a queste due interpretazioni della iperfosfataseemia negli itteri si può facilmente opporre quanto è risultato dalle successive ricerche, e cioè

che l'iperfosfatemia non è esclusiva degli itteri da ritenzione ma si riscontra, più o meno, in tutti gli itteri e talvolta in epatopatie non itterigene (cirrosi). Anzi a questo dato si attennero FIESSINGER e BOYER per formulare l'ipotesi che la iperfosfatemia è legata all'insufficienza epatica; ipotesi che non regge di fronte al dato di cirrosi con fosfatemia normale. Infine, tra gli AA. che si sono occupati dell'argomento, ANGELERI e PESCARMONA formulano anche essi una ipotesi basata sul dato — da essi riscontrato — di un certo rapporto fra concentrazione dei sali biliari nel sangue e fosfatemia. Negli itteri da essi studiati, mentre nessuna relazione esiste fra bilirubinemia e valore della fosfatasi, l'aumento della concentrazione dei sali biliari nel sangue che precede sempre la iperfosfatemia ha un certo rapporto con essa, specie se si osservano separatamente i dati riguardanti gli itteri meccanici da quelli epatotossici. Poichè i sali biliari *in vitro* (TAKATA, AUSTONI e COGGI) inibiscono la fosfatasi, secondo gli AA. si può pensare che *in vivo* avvenga una iperproduzione del fermento che compensa, per così dire, l'inibizione prodotta dai sali biliari; inibizione che potrebbe a lungo causare alterazioni del ricambio calcio-fosforo. Ma si può opporre a questa ipotesi che l'iperfosfatemia non è solo esponente di processi di ossificazioni o di un ricambio minerale attivo, ma si riscontra molto spesso in particolari condizioni o in malattie in cui si hanno appunto profonde turbe minerali, in cui non si può supporre che l'aumento della fosfatasi sia il fattore che impedisca le turbe del ricambio minerale.

Allo stato delle ricerche fin qui eseguite nessuna spiegazione, quindi, che regga a una critica può esprimersi e si rendono necessarie ulteriori esperienze. Si può solo affermare, per le brillanti esperienze di THANNHAUSER e coll., che l'aumento della fosfatemia negli itteri non è di natura quantitativa ma dipende da una attivazione del fermento. Proprio a questo punto ho rivolto la mia attenzione, proponendomi di ricercare sull'azione dell'acido ascorbico in rapporto alla inibizione della fosfatasi operata *in vitro* sul siero dai sali biliari.

L'azione inibente sulla glicerofosfatasi prodotta dai sali biliari fu, come dicemmo, trovata per primo da TAKATA, che studiò questo effetto sulla fosfatasi dell'osso, del fegato e del rene dimostrando che questa inibizione è tanto più accentuata quanto più abbondante è il contenuto di sali biliari negli estratti; successivamente questo fenomeno fu confermato sul siero di AUSTONI e COGGI e da THANNHAUSER e coll.

Io ho ripreso queste esperienze, facendo agire sul siero (un cc.) dosi crescenti di bilirubina, glicocolato e taurocolato di sodio a dosi da 0,5 mmgr. fino a 10 mmgr. Ho sperimentato successivamente l'azione dell'acido ascorbico sul siero che era stato già in contatto con i sali biliari. A questo

scopo su uno stesso siero ho istituito le seguenti prove: 1) aggiunta dell'acido ascorbico in quantità opportuna (5 mmgr.) al siero; 2) aggiunta dell'acido ascorbico dopo che il siero era stato in contatto con quantità sempre eguali (5 mmgr.) di taurocolato di sodio, per un tempo costante (30').

La tecnica usata per la determinazione della fosfatasi del siero è fondamentalmente quella di Kay. In altro nostro lavoro essa è descritta per esteso; qui mi limiterò a precisare che la bilirubina, il glicocolato e il taurocolato di sodio furono diluiti nel substrato in cui successivamente si aggiungeva il siero. L'attivazione della fosfatasi con acido ascorbico è stata raggiunta aggiungendo al substrato mmgr. 5 di acido ascorbico Bayer. Nonostante quanto affermino THANNHAUSER e Coll., già questa quantità dà con i reattivi usati per la determinazione del fosforo (molibdato, idrochinone e solfito) una debole colorazione azzurra che tradotta colorimetricamente in mmgr. di fosforo corrisponde a mmgr. 0,004. Questa colorazione non altera, però, come è facile comprendere i valori finali, poichè la determinazione della fosfatasi è il risultato di una sottrazione del quantitativo di fosforo ritrovato nel siero immediatamente inattivato da quello tenuto in incubazione. Per non turbare il ph del substrato ho preventivamente neutralizzato l'acido ascorbico con NaCh N/10 — secondo il metodo degli AA. americani.

Nessun effetto ho potuto mettere in evidenza trattando il siero con dosi crescenti di bilirubina; riporto in tabella alcune delle esperienze eseguite su tre sieri a diversa attività fosfataseica (tab. I).

TABELLA I.

BILIRUBINA	ATTIVITÀ FOSFATASICA		
	SIERO I	SIERO II	SIERO III
mmgr. 0	0,130	0,150	0,165
» 0,5	0,130	0,150	0,165
» 1	0,135	0,151	0,162
» 1,5	0,132	0,149	0,163
» 2	0,130	0,152	0,168
» 2,5	0,133	0,154	0,159
» 3	0,138	0,148	0,155
» 3,5	0,137	0,150	0,164
» 4	0,133	0,152	0,160
» 4,5	0,134	0,157	0,166
» 5	0,130	0,153	0,162
» 10	0,131	0,153	0,163

Le oscillazioni dei valori della fosfatasi sono di tale modestia da rientrare nell'errore di determinazione; nessun rapporto vi è tra concentrazione della bilirubina e valore della fosfatasi.

Con l'aggiunta di taurocolato e di glicocolato di sodio al siero si è ottenuto invece una diminuzione dell'attività fosfataseica che è in rapporto diretto alla concentrazione dei sali (tab. II-III).

TABELLA II.

GLICOCOLATO DI SODIO	ATTIVITÀ FOSFATASICA		
	SIERO I	SIERO II	SIERO III
mmgr. 0	0,153	0,172	0,194
» 0,5	0,152	0,172	0,194
» 1	0,150	0,172	0,192
» 1,5	0,150	0,171	0,193
» 2	0,142	0,162	0,192
» 2,5	0,140	0,163	0,184
» 3	0,141	0,163	0,180
» 3,5	0,138	0,152	0,173
» 4	0,138	0,152	0,172
» 4,5	0,135	0,142	0,170
» 5	0,135	0,143	0,170
» 10	0,130	0,132	0,166

TABELLA III.

TAUROCOLATO DI SODIO	ATTIVITÀ FOSFATASICA		
	SIERO I	SIERO II	SIERO III
mmgr. 0	0,146	0,157	0,241
» 0,5	0,140	0,153	0,238
» 1	0,142	0,150	0,230
» 1,5	0,135	0,150	0,232
» 2	0,130	0,145	0,230
» 2,5	0,130	0,142	0,230
» 3	0,132	0,143	0,224
» 3,5	0,130	0,145	0,220
» 4	0,120	0,141	0,184
» 4,5	0,120	0,140	0,184
» 5	0,092	0,132	0,150
» 10	0,080	0,121	0,138

Si può osservare come il taurocolato espliciti una azione inibente sulla fosfatasi del siero, forse più marcata, alle stesse concentrazioni, del glicocolato, e come le ultime concentrazioni sono quelle che danno veramente un effetto inibente. A deboli concentrazioni (fino a mmgr. 1,5) non

si hanno decisive influenze sull'attività del fermento. Ora, sebbene gli esperimenti *in vitro* non siano del tutto confrontabili con ciò che succede nell'organismo vivente, pure vi sarebbe da far rilevare come le concentrazioni di sali biliari che *in vitro* incominciano a inibire l'attività della fosfatasi non si riscontrano che di rado negli itteri. Infatti i più alti valori della colalemia sono stati trovati nell'ittero meccanico e le cifre ritrovate dai vari AA. vanno da un minimo di 100 mmgr. ‰ (CHABROL e BENARD) ad un massimo di 1350 mmgr. ‰ (GIORDANO e LEVI). Nelle nostre esperienze una decisa inibizione del fermento inizia a concentrazioni di mmgr. 2 per cc. circa, sia per il glicocolato che per il taurocolato; ossia a concentrazioni ‰ di 2000 mgr. Per gli esperimenti eseguiti *in vitro* da TAKATA e da AUSTONI e COGGI furono usate quantità molto notevoli di sali biliari. AUSTONI e COGGI, infatti, fanno agire su un cc. di siero soluzioni di taurocolato e di glicocolato di sodio all'1 % e al 0,25 %, usando progressive quantità (cc. 0,5-1, 1,5) di queste soluzioni. L'effetto inibitorio è evidente usando cc. 1 di queste soluzioni, ossia rispettivamente 100 mmgr. di sostanza o 25 mmgr. per cc. di siero. Praticamente quantità molto notevoli che nel siero itterico non si ritrovano mai.

L'azione dell'acido ascorbico sulla fosfatasi del siero, che era stato già a contatto con il taurocolato è stata nelle mie esperienze quasi eguale a quella operata sul siero senza l'aggiunta del sale; ossia attivazione — salvo trascurabili variazioni — della stessa entità (Tab. IV).

TABELLA IV.

		ATTIVITÀ FOSFATASICA		
	SIERO	SIERO + TAURUC. mmgr. 5	SIERO	SIERO + TAURUC.
			+ ACIDO ASCORB. mmgr. 5	+ ACIDO ASCORB. mmgr. 5
I	0,163	0,091	0,756	0,746
II	0,184	0,124	0,620	0,586
III	0,156	0,138	0,564	0,560
IV	0,221	0,184	0,842	0,849
V	0,178	0,102	0,684	0,688
VI	0,143	0,098	0,764	0,762
VII	0,162	0,122	0,654	0,652
VIII	0,148	0,112	0,684	0,672
IX	0,241	0,128	0,848	0,852
X	0,384	0,245	0,794	0,796
XI	0,232	0,124	0,846	0,842
XII	0,136	0,096	0,566	0,544
XIII	0,212	0,116	0,691	0,694
XIV	0,132	0,107	0,864	0,862
XV	0,146	0,096	0,562	0,560

Possiamo così concludere che la fosfataseemia è stata ritrovata elevata sia negli itteri ostruttivi che negli itteri di altra natura. Che l'azione sulla fosfatasi dei sali biliari *in vitro* è decisamente inibente, però a concentrazioni molto maggiori di quelle che si ritrovano negli itteri, e che questa azione è reversibile. Nell'organismo possono esistere dei meccanismi attivatori che si oppongono all'azione inibente dei sali biliari, meccanismi la cui natura potrebbe essere molto vicina a quella operata *in vitro* dall'acido ascorbico, che per alcuni autori può considerarsi come il cofamento delle fosfatasi.

(Pervenuto in Redazione
il 14 maggio 1942-XX)

RIASSUNTO. — La fosfataseemia è stata ritrovata elevata sia negli itteri ostruttivi che negli itteri di altra natura. L'azione inibente dei sali biliari sulla fosfatasi del siero è di natura reversibile, come l'A. dimostra con il metodo all'acido ascorbico.

BIBLIOGRAFIA

- ANGELERI e PESCARMONA, « Min. Med. », n. 18, 425, 1939.
ARCURI e FILIPPON, « Ormoni », n. 7, 399, 1941.
ARMSTRONG, KING e HARRIS, « C.M.A.J. », v. 31, p. 14, 1934.
AUSTONI e COGGLI, « Presse Med. », n. 82, p. 1594, 1934.
BODANSKI e JAFFÉ, « Proc. Soc. exp. biol. », 31, 1179, 1934.
CANTAROW e NELSON, « Arch. of intern. Med. », v. 59, n. 6, 1937.
CHABROL e BENARD, cit. da MICHELI, « XLI Congr. Med. Int. », Bologna 1935.
FIESSINGER e BOYER, « Rev. Med. Chir. mal. du foie », v. 10, 1935.
FLOOD, GUTMANN E. e GUTMANN A., « Arch. of intern. Med. », vol. 59, 1937.
GIORDANO, WICHELM e PRESTRUD, « Am. J. Clin. Path. », 9, n. 2, 1939.
GREENE, SHATTUCK e KAPLOWITZ, cit. da ANGELERI e PESCARMONA.
HERBERT, « Brit. J. exp. Path. », v. 16, 1935.
ROTHMANN, MERANZE D. e MERANZE T., « Am. J. Med. Sc. », v. 192, 1936.
STEWART, MC COOL e CANTAROW, cit. da CANTAROW e NELSON.
TAKANA, « J. of Biol. », v. 14, 1931.
THANNHAUSER, REICHEL, GRATTAN e MADDOCK, « J. of Bioch. Chem. », 121, 709, 1937 e 121, 727, 1937.

98018

61.0478

